

NACHWEIS DER EXPRESSION LEUKOZYTÄRER ZYTOKINE IM CORPUS LUTEUM DER HÜNDIN ZU DEFINIERTEN STADIEN IM DIÖSTRUS



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

EVA ENGEL

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 3-89687-660-0

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE
www.vvb-ips.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

**Nachweis der Expression leukozytärer Zytokine im Corpus
luteum der Hündin zu definierten Stadien im Diöstrus**

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

Eingereicht von

Eva Engel

Tierärztin aus Eppelborn (Saarland)

Gießen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Burkhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2004

**Meinen Eltern
und
meiner Oma gewidmet**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
2	LITERATURÜBERSICHT	8
2.1	Steuerung und Morphologie des Corpus luteum der Hündin.....	8
2.1.1	Einteilung des Reproduktionszyklus	8
2.1.2	Regulation der Lutealphase bei der Hündin	9
2.1.3	Morphologisch-histologischer Aufbau des Corpus luteum.....	10
2.2	Zytokine.....	12
2.2.1	Interleukin-1 beta (IL-1 β)	14
2.2.1.1	Allgemeine Bedeutung von IL-1 β im Immunsystem und Wirkung in endokrinen Organen	14
2.2.1.2	Beziehungen von IL-1 β zur Corpus luteum-Funktion	15
2.2.2	Interleukin-2 (IL-2)	23
2.2.2.1	Allgemeine Bedeutung von IL-2 im Immunsystem	23
2.2.2.2	Beziehungen von IL-2 zur Corpus luteum-Funktion.....	24
2.2.3	Interleukin-4 (IL-4)	25
2.2.3.1	Allgemeine Bedeutung von IL-4 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	25
2.2.3.2	Beziehungen von IL-4 zur Corpus luteum-Funktion.....	26
2.2.4	Interleukin-6 (IL-6)	27
2.2.4.1	Allgemeine Bedeutung von IL-6 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	27
2.2.4.2	Beziehungen von IL-6 zur Corpus luteum-Funktion.....	29
2.2.5	Interleukin-8 (IL-8)	32
2.2.5.1	Allgemeine Bedeutung von IL-8 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	32
2.2.5.2	Beziehungen von IL-8 zur Corpus luteum-Funktion.....	34
2.2.6	Interleukin-10 (IL-10)	35
2.2.6.1	Allgemeine Bedeutung von IL-10 im Immunsystem	35
2.2.6.2	Beziehungen von IL-10 zur Corpus luteum-Funktion.....	36
2.2.7	Interleukin-12 (IL-12)	36
2.2.7.1	Allgemeine Bedeutung von IL-12 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	36
2.2.7.2	Beziehungen von IL-12 zur Corpus luteum-Funktion.....	38
2.2.8	Tumor-Nekrose-Factor-alpha (TNF- α).....	38
2.2.8.1	Allgemeine Bedeutung von TNF- α im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	38
2.2.8.2	Beziehungen von TNF- α zur Corpus luteum-Funktion	39
2.2.9	Interferon-gamma (IFN- γ).....	49
2.2.9.1	Allgemeine Bedeutung von IFN- γ im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	49
2.2.9.2	Beziehungen von IFN- γ zur Corpus luteum-Funktion	50
2.2.10	Transforming-Growth-Factor-beta 1 (TGF- β 1)	54
2.2.10.1	Allgemeine Bedeutung von TGF- β 1 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem	54
2.2.10.2	Beziehungen von TGF- β 1 zur Corpus luteum-Funktion.....	55

2.2.11	Zusammenfassende Übersicht der Effekte von Zytokinen im CL	58
3	MATERIAL UND METHODEN	61
3.1	Versuchsdesign.....	61
3.2	Spendertiere.....	61
3.3	Bestimmung des Ovulationszeitpunktes und Gewinnung der Blutproben.....	62
3.4	Bestimmung von Progesteron im Blutplasma	62
3.5	Ovariohysterektomie (OHE)	63
3.6	Konservierung der Corpora lutea (CL)	63
3.7	RNA-Isolierung	64
3.7.1	Durchführung	64
3.8	Bestimmung der RNA-Konzentration und Herstellung einer RNA-Gebrauchsverdünnung.....	66
3.9	DNase-Behandlung	66
3.9.1	Durchführung	66
3.10	Reverse Transkription (RT-PCR)	67
3.10.1	Durchführung	67
3.11	Amplifikation (PCR)	68
3.11.1	Durchführung der PCR (in Anlehnung an ein Protokoll von GRÖNE et al. 1999).....	71
3.11.2	Primer	72
3.12	Agarosegelelektrophorese	75
3.12.1	Durchführung	75
3.12.2	Auswertung der Agarosegele	76
3.13	Auswertung der Ergebnisse.....	76
3.14	Kontrollen	76
3.14.1	Positivkontrolle	76
3.14.1.1	Lymphozytenstimulationstest (LTT) zur Gewinnung einer Positivkontrolle	77
3.14.1.1.1	Lymphozytenisolierung mittels einstufiger Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation	77
3.14.1.1.2	Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung.....	78
3.14.1.1.3	Stimulationsparameter.....	78
3.14.1.2	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).....	79
3.14.2	Negativkontrolle.....	80
3.15	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	81
3.16	Immunhistologische Untersuchungen	81
3.17	Materialien und Geräte	82
3.17.1	Primer	82
3.17.2	Puffer und Lösungen	82
3.17.3	Reagenzien	83
3.17.4	Auflistung der Geräte	84
4	ERGEBNISSE	86
4.1	Progesteronkonzentrationen im Blutplasma	86
4.2	Untersuchungen zur Expression der mRNA mittels RT-PCR	88
4.2.1	Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TNF- α und TGF- β 1	88
4.2.2	Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-6 und IFN- γ	95
4.2.3	Untersuchungen zur Expression des Zytokins IL-4	101

4.2.4	Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-1 β und IL-2	102
4.2.5	Gesamtübersicht zu den Ergebnissen aus der RT-PCR im CL der Hündin	107
4.3	Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Produkte	108
4.3.1	Sequenzierung des Amplikons von IL-8	108
4.3.2	Sequenzierung des Amplikons von IL-10	109
4.3.3	Sequenzierung des Amplikons von IL-12 p40 Subunit	110
4.3.4	Sequenzierung des Amplikons von TNF- α	110
4.3.5	Sequenzierung des Amplikons von TGF- β 1	111
4.3.6	Sequenzierung des Amplikons von IL-4 aus der Positivkontrolle	111
4.3.7	Sequenzierung des Amplikons von IFN- γ	112
4.3.8	Sequenzierung des Amplikons von IL-1 β	112
4.3.9	Sequenzierung des Amplikons von IL-2	112
4.3.10	Sequenzierung des Amplikons von GAPDH	113
4.3.11	Sequenzierung des Amplikons von IL-6	113
4.4	Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen	113
5	DISKUSSION	114
5.1	Diskussion des Versuchsaufbaus	114
5.2	Diskussion der Methodik	115
5.3	Diskussion der Ergebnisse	117
5.3.1	Nachweis der Expression von IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TNF α und TGF- β 1	117
5.3.2	Expression von IL-4	122
5.3.3	Untersuchungen zur Expression von IL-6 und IFN- γ	122
5.3.4	Expression von IL-1 β und IL-2	124
6	ZUSAMMENFASSUNG	125
7	SUMMARY	128
8	LITERATURVERZEICHNIS	130
9	ANHANG	169
9.1	Verlauf der Progesteronkonzentrationen (P ₄ ; ng/ml) im Blutplasma als Indikator für den Zeitpunkt der Ovulation	169
9.2	komplette Sequenzen der untersuchten Zytokine	171

Abkürzungen

ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
AP-1	Aktivator-Protein-1 (Transkriptionsfaktor)
AS	Antisense (-Primer)
bp	Basenpaare
cAMP	cyklisches Adenosin-Monophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CD4	T-Helfer-Lymphozyten
CD8	T-Suppressor-Lymphozyten
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	spezifischer Transkriptionsfaktor der Leber
CL	Corpus luteum
Con A	Concanavalin A
DEPC	Diethylpyrrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)
H ₂ O	Wasser
hCG	humanes Choriongonadotropin
HSD (3 α -; 20 α -)	Hydroxysteroiddehydrogenase
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin Like Growth Factor 1
IL	Interleukin
IL-1 Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1 Rt	Interleukin-1 Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IRF-1	Interferon Regulatory Factor-1
JAK1 bzw. 2	Janus Kinase Familie 1 bzw. 2
kD	Kilodalton
LH	luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC I/II	Major Histokompatibilitäts Komplex Klasse I/II
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NF (-IL-6; - κ B)	Nukleärer Transkriptionsfaktor
NK-Zellen	Natural Killer-Zellen
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxidsynthase
OXT	Oxytozin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PGF _{2α}	Prostaglandin F-2 alpha
PLA ₂ /PLC	Phospholipase A ₂ / Phospholipase C
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
p.ov.	post ovulationem
PRL	Prolaktin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S-Primer	Sense-Primer
SMAD	Similar Mutations of Mothers against Decapentaplegic
STAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TGF-β1	Transforming-Growth-Factor-beta 1
TGF-βIR/TGF-βIIR	Transforming-Growth-Factor-βI Rezeptor/TGF-βII Rezeptor
Th1-Zellen	T-Helfer 1-Lymphozyten
Th2-Zellen	T-Helfer 2-Lymphozyten
TNF-α	Tumor-Nekrose-Factor-alpha
TNF-RI/II	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor I/II
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 EINLEITUNG

Der Zyklus der Hündin weist im Vergleich zu anderen Haussäugetieren zahlreiche Besonderheiten auf. Insbesondere sind die der lutealen Regression zugrundeliegenden Regelmechanismen noch weitgehend unklar. Im Gegensatz zu den Gegebenheiten anderer Haussäugetiere, wie z.B. bei Pferd und Rind, ist die Luteolyse nicht durch Faktoren uterinen Ursprungs beeinflusst, und nur unmittelbar in der Phase des präpartalen Abfalls von Progesteron scheint Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) als ein endogener luteolytischer Faktor zu wirken. Auch ein Mangel der beiden luteotropen Hormone, Prolaktin und LH, kann bei der graviden und ingraviden Hündin nicht für die luteale Regression verantwortlich gemacht werden.

HOFFMANN et al. (1996) verweisen daher auf mögliche parakrine und/oder autokrine Steuerungsmechanismen. Dazu durchgeführte Untersuchungen haben erstmals eine solche Rolle für luteales Progesteron und Estradiol-17 β erkennen lassen, nachdem Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum (CL) der Hündin sowohl immunhistochemisch als auch mittels der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen werden konnten (DE CARVALHO PAPA 2001). In vorausgegangenen immunhistologischen Untersuchungen konnte auch die Anwesenheit von CD8-positiven Lymphozyten und Major-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II (MHC II) –Antigen exprimierenden Zellen in besonders hoher Zahl zum Zeitpunkt der einsetzenden Luteolyse nachgewiesen werden (BÜSGES 2003).

Dies legt die Vermutung nahe, dass beim Hund Zytokine, die von diesen Immunzellen sezerniert werden, an der Differenzierung, Aufrechterhaltung und Regression des CL beteiligt sein können. Diese Folgerung basiert u.a. auf Untersuchungen bei anderen Spezies, die gezeigt haben, dass bestimmte Zytokine eine bedeutende Funktion nicht nur in der Phase der Follikulogenese, der Ovulation und bei der Regulation der Steroidbiosynthese haben, sondern auch in der Phase der Anbildung, Funktionserhaltung und Regression des CL. Dabei können Zytokine sowohl die Lutealfunktion fördernde (z.B. IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α und TGF- β) als auch hemmende Wirkungen (z.B. IL-1 β , IFN- γ , TNF- α und TGF- β) ausüben.

Im Hinblick auf diese Beobachtungen divergierender Wirkungen unterschiedlicher Zytokine und fehlender Hinweise in der Literatur hinsichtlich des Einflusses der Zytokine auf die Funktionalität des CL der Hündin, war das Ziel der vorliegenden Untersuchung, durch Darstellung der Expression eines breiten Spektrums an Zytokinen (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ und TGF- β 1) erste Informationen über deren Expression und damit

möglichen Bedeutung bei der Regulation der Gelbkörperfunktion bei der Hündin zu erhalten.
Die Untersuchungsmethode der Wahl stellte dabei die RT-PCR dar.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Steuerung und Morphologie des Corpus luteum der Hündin

2.1.1 Einteilung des Reproduktionszyklus

Der Zyklus des domestizierten Hundes wird als asaisonal und monöstrisch bezeichnet, da er keine jahreszeitlichen Abhängigkeiten mehr erkennen läßt und sich jeder sexuell aktiven Phase mit nur einem ovariellen Zyklus ein Zeitraum der Sexualruhe anschließt.

Nach FELDMAN & NELSON (1987) läßt sich der Zyklus einteilen in:

a) Proöstrus:

Dieser umfasst den Zeitraum vom Beginn der proöstrischen Blutung bis zum Beginn der Sexualakzeptanz und dauert ca. 3-16 Tage. Die Plasmakonzentration von Estradiol-17 β steigt in dieser Zeitspanne bis auf Maximalwerte von 100 pg/ml an, was mit einer Ödematisierung der Vulva sowie einer Hyperämie und Proliferation der Vaginalschleimhaut verbunden ist.

b) Östrus:

Er beginnt mit der Akzeptanz des Rüden durch die Hündin und dauert etwa 4-12 Tage. Etwa 48-62 Stunden nach dem präovulatorischen LH-Peak kommt es zur Ovulation. Im Verlauf des Östrus fällt die Plasmakonzentration von Estradiol-17 β ab, währenddessen als Besonderheit bei der Hündin die Progesteronwerte ansteigen; bei einer Plasmakonzentration von etwa 5 ng/ml wird die Ovulation beobachtet (BOUCHARD et al. 1991, CONCANNON 1993).

c) Diöstrus:

Dieser ist gekennzeichnet durch die An- und Rückbildung der Corpora lutea. Seine Dauer schwankt zwischen 60 bis 90 Tagen, der Beginn ist durch den Verlust der Deckbereitschaft gekennzeichnet. Im Diöstrus steigt die Progesteronkonzentration zunächst bis auf Maximalwerte von etwa 20 ng/ml und mehr an und beginnt dann etwa ab dem 20. Tag post ovulationem langsam wieder abzufallen. Parallel dazu steigen Prolaktin und LH an.

d) Anöstrus:

Definitionsgemäß ist der Übergang vom Diöstrus in den Anöstrus durch einen Abfall der Progesteronwerte unter 1 ng/ml Plasma gekennzeichnet. Seine Dauer schwankt rassespezifisch und individuell zwischen 15-265 Tagen (ovarielle Inaktivität).

2.1.2 Regulation der Lutealphase bei der Hündin

Eine weitere Besonderheit bei der Hündin ist der bei graviden und ingraviden Hündinnen bis kurz vor den Geburtszeitpunkt fast nahezu identische Verlauf von Estradiol-17 β , LH und Progesteron im peripheren Blut.

Luteotrope Faktoren:

Im ersten Drittel des Diöstrus verläuft die Lutealfunktion weitgehend unabhängig vom Einfluss gonadotroper Hormone, da weder eine Hypophysektomie (CONCANNON 1980, OKKENS et al. 1986), noch eine Hemmung von LH oder Prolaktin (CONCANNON et al. 1987) in dieser Phase eine Änderung der Lutealfunktion bewirken konnten. Danach, spätestens jedoch ab der zweiten Hälfte der Lutealphase, wirken LH und vor allem Prolaktin als luteotrope Faktoren. In dieser Phase ist eine Hypophysektomie mit dem Abfall der Progesteronkonzentration im Plasma als Zeichen des Funktionalitätsverlustes verbunden. Der Effekt der Hypophysektomie konnte durch exogene Gabe von LH kompensiert werden (CONCANNON 1980). Auch die Verabreichung von die Prolaktinfreisetzung hemmenden Dopaminagonisten führt zum Abfall der Progesteronsekretion (OKKENS & BEVERS 1990). OKKENS & BEVERS (1990) sowie ONCLIN & VERSTEGEN (1997a) haben Prolaktin als den wichtigsten luteotropen Faktor beim Hund beschrieben. Die Verfügbarkeit der beiden luteotropen Faktoren LH und Prolaktin steigt in der 2. Hälfte des Diöstrus an (HOFFMANN & SCHNEIDER 1993, GRÄF 1978, ONCLIN & VERSTEGEN 1997b). Unbeschadet dieser Tatsache wird jedoch eine kontinuierliche Abnahme der Lutealfunktion beobachtet. Dies gilt auch für die gravide Hündin, bei der der Prolaktinanstieg deutlicher ausgeprägt ist als bei der nicht graviden Hündin (ONCLIN & VERSTEGEN 1997b).

Luteolytische Mechanismen:

Die der lutealen Regression zugrunde liegenden Mechanismen sind bei der Hündin noch weitgehend unklar. Anders als bei den landwirtschaftlichen Nutztieren aber ähnlich wie z.B. bei Mensch und Katze ist die Luteolyse nicht durch Faktoren uterinen Ursprungs beeinflusst (OLSON et al. 1984, HOFFMANN et al. 1992), und nur unmittelbar in der Phase des präpartalen Abfalls von Progesteron scheint PGF_{2 α} als ein endogener luteolytischer Faktor zu wirken.

So beobachteten HOFFMANN et al. (1996), dass nach Hemmung der PGF_{2 α} -Synthese durch Anwendung des Cyclooxygenasehemmers Indomethacin eine Verlängerung der Tragezeit auftrat. Umgekehrt konnten WILLIAMS et al. (1999) nach Anwendung des PGF_{2 α} -Analogons Na-Cloprostenol eine vorzeitige Luteolyse und damit den Beginn der Wehentätig-

keit auslösen. Auch bei nicht graviden Tieren konnte durch wiederholte $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Anwendung eine Luteolyse induziert werden (CONCANNON & HANSEL 1977). Im Hinblick auf die notwendigen hohen Dosierungen und die sich daraus ergebenden Nebenwirkungen (LEIN et al. 1989) ist es jedoch problematisch, daraus physiologische Regelmechanismen ableiten zu wollen (HOFFMANN et al. 1996).

Auch ein Mangel an LH und Prolaktin können weder bei der ingraviden noch graviden Hündin für die luteale Regression verantwortlich gemacht werden, da beide Hormone in der späten Lutealphase erhöht vorliegen (HOFFMANN & SCHNEIDER 1993) und auch die Expression lutealer LH- und PRL-Rezeptoren in diesem Zeitraum nicht abnimmt (FERNANDES et al. 1987).

Aufgrund dieser Beobachtungen folgern HOFFMANN et al. (1996), dass bei der Hündin die Regression der CL vor allem parakrinen und/oder autokrinen Steuerungsmechanismen unterliegt.

2.1.3 Morphologisch-histologischer Aufbau des Corpus luteum

Das Corpus luteum (CL) stellt eine endokrine Drüse von zeitlich begrenzter Lebensdauer dar und besteht aus steroidproduzierenden Zellen parenchymatösen Ursprungs, die etwa 40% der Zellen im CL einnehmen, und Stromazellen, bei denen es sich hauptsächlich um Endothelzellen und Fibroblasten handelt und die z.B. beim Rind etwa 53% der Zellpopulation ausmachen (O'SHEA et al. 1989). Beim Hund ist eine Einteilung in große und kleine Lutealzellen im Unterschied zum Mensch, Rind oder Schwein nicht möglich (ANDERSEN & SIMPSON 1973).

Nach der Ovulation müssen die im rupturierten Follikel verbleibenden Granulosa- und Thekazellen in Lutealzellen transformiert werden, wobei LH und der Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) als potente Stimulatoren der Luteinsierung beschrieben worden sind (REYNOLDS et al. 1992). An diese Vorgänge im frühen CL ist die Vaskularisation der Lutealzellschichten durch Einsprossung neuer Blutgefäße assoziiert. Die Angiogenese, an der der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – durch LH und IGF-1 stimuliert - eine vermittelnde Funktion besitzt und der in der frühen Lutealphase bei der Frau vorwiegend aus den Lutealzellen sezerniert wird, ist somit ein wichtiges Ereignis in der Phase der Neubildung des CL (GOEDE et al. 1998).

Im Gegensatz zum Hoden gehört das Ovar, einschließlich dem CL, nicht zu den immunprivilegierten Organen. Über das sich bildende Kapillarsystem wandern Stromazellen, wie

Fibroblasten sowie Zellen des Immunsystems wie Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten in das CL ein. Die Anzahl an Leukozyten im CL der Frau war in der frühen (42%) und in der späten Lutealphase (35%) höher als in der mittleren Lutealphase (24%) (CASTRO et al. 1998). Dabei blieb die Zahl der Makrophagen im Verlauf der Lutealphase - im Gegensatz zur Situation bei der Ratte (BRÄNNSTRÖM et al. 1994) und dem Kaninchen (BAGAVANDOSS et al. 1988), wo ein leichter Anstieg der Makrophagenpopulation kurz vor der lutealen Regression beobachtet wurde - konstant. Im CL des Kaninchens blieb die Gesamtzahl an Leukozyten im Verlauf der Lutealphase konstant. Die Population der neutrophilen Granulozyten im CL der pseudograviden Ratte stieg im Verlauf der Lutealphase an, um dann in der späten Lutealphase wieder abzufallen (BRÄNNSTRÖM et al. 1994). Beim Hund wurde im CL in der frühen und in der späten Lutealphase eine höhere Expression an CD4 positiven Lymphozyten und MHC Klasse II Antigen exprimierenden Zellen als in der mittleren Lutealphase nachgewiesen (BÜSGES 2003). Die Expression der CD8 positiven Lymphozyten fiel vom 15. bis zum 30. Tag post ovulationem ab, danach stieg die Expression bis zum 60. Tag an und fiel anschließend wieder ab.

Elektronenmikroskopisch zeigen canine Lutealzellen bis zum 30. Tag post ovulationem runde Nuklei mit homogenem Chromatin, ein ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum (gER) und kleine Lipidvakuolen im Zytoplasma. Die Lutealzellen trennen ausgeprägte Kanäle extrazellulärer Matrix, die eine hohe Anzahl an Kapillaren aufweisen. Ab dem 45. Tag post ovulationem nimmt der interzelluläre Abstand zwischen den Lutealzellen deutlich ab, wobei die Anzahl an Kapillaren sinkt und zunehmend Kollagenfasern sichtbar werden. Zeitgleich erscheint die Struktur des gER der Lutealzellen undeutlicher. Markante Zeichen der Degeneration caniner Lutealzellen zeigen sich ab dem 60. Tag durch zunehmend polygonale und pyknotische Zellkerne als Ausdruck einer beginnenden Chromatinkondensation. Das gER nimmt eine wirbelähnliche Struktur an und ist von großen Lipidvakuolen umgeben. Vom 75. bis zum 113. Tag post ovulationem stellt sich der Nukleus überwiegend lobuliert mit einem Anstieg des Gehaltes an Heterochromatin dar (SONNACK et al. 2003).

Beim Hund scheint die Regression des CL daher weniger durch eine Vermehrung des Bindegewebes (VOLLMERHAUS et al. 1994), sondern eher durch eine Abnahme des interzellulären Raumes bei annähernd gleichbleibender Größe der Lutealzellen gekennzeichnet zu sein. Dies zeigt sich in einer Volumenabnahme des CL.

2.2 Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht zwischen 8-70 kD und werden von nahezu allen Zelltypen gebildet. Sie sind an vielen Steuerungsmechanismen beteiligt, wie z.B. an der Regulation des Zellwachstums, der Zellaktivierung, der Induktion von Chemotaxis, am Entzündungsgeschehen, der Ausbildung von Immunität, der Gewebereparation und der Stimulation bzw. Hemmung der Expression anderer Zytokine.

Aufgrund ihrer hochaffinen Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, sind Zytokine in sehr geringen Konzentrationen (pmol/l) wirksam. Alle Zytokinrezeptoren sind Transmembranproteine, wobei nach Bindung des Zytokins an den extrazellulären Anteil die Signaltransduktion in den Zellkern beginnt. Die Zytokinwirkung ist überwiegend mit der Transkription neuer Gene verbunden, die durch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren zustande kommt.

Nachdem in vorausgehenden Untersuchungen (BÜSGES 2003) das zyklusabhängige Vorkommen von CD4- und CD8-exprimierenden Lymphozyten und MHC II-exprimierende Zellen im CL der Hündin gezeigt werden konnte und das CL nicht zu den immunprivilegierten Organen gehört, stellte sich für vorliegende Untersuchungen insbesondere die Frage der Expression von Zytokinen in Zusammenhang mit immunologischen Reaktionen.

Die Abbildungen 1 und 2 veranschaulichen die Interaktionen von Zytokinen mit unterschiedlichen Zelltypen des Immunsystems. Sie wurden anhand der Ausführungen in den Kapiteln 2.2.1 bis 2.2.10 angefertigt. In diesen Kapiteln soll kurz auf jene Zytokine eingegangen werden, deren Expression im CL der Hündin in den vorliegenden Untersuchungen mittels RT-PCR nachgegangen werden sollte.

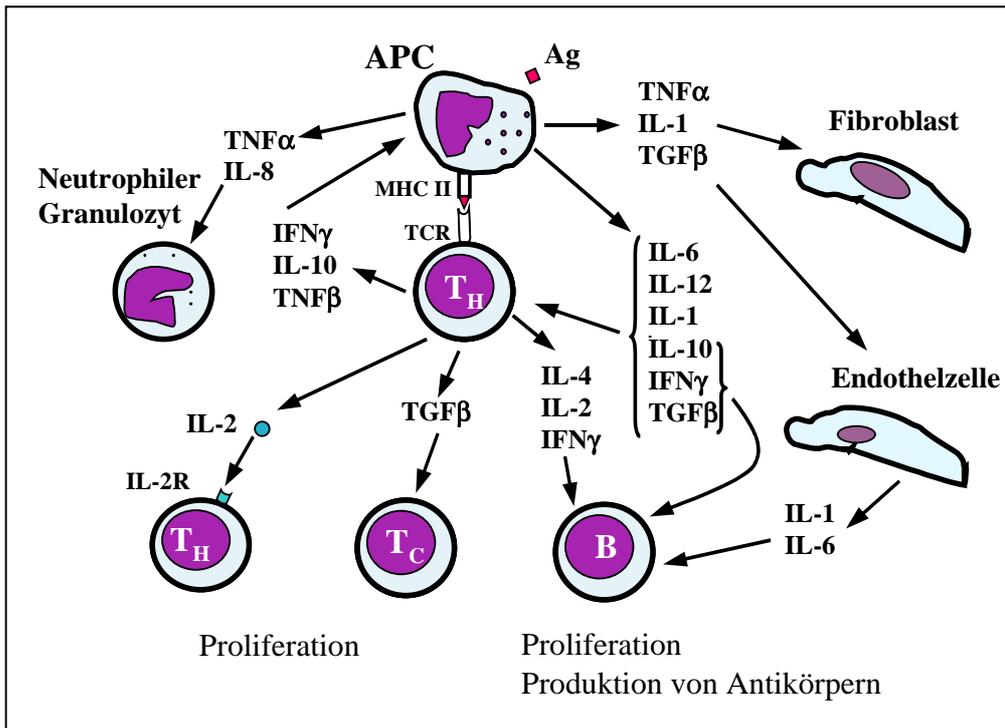


Abb. 1: Interaktion von Zytokinen mit unterschiedlichen Zelltypen (nach Kap. 2.2.1 bis 2.2.10 erstellt)

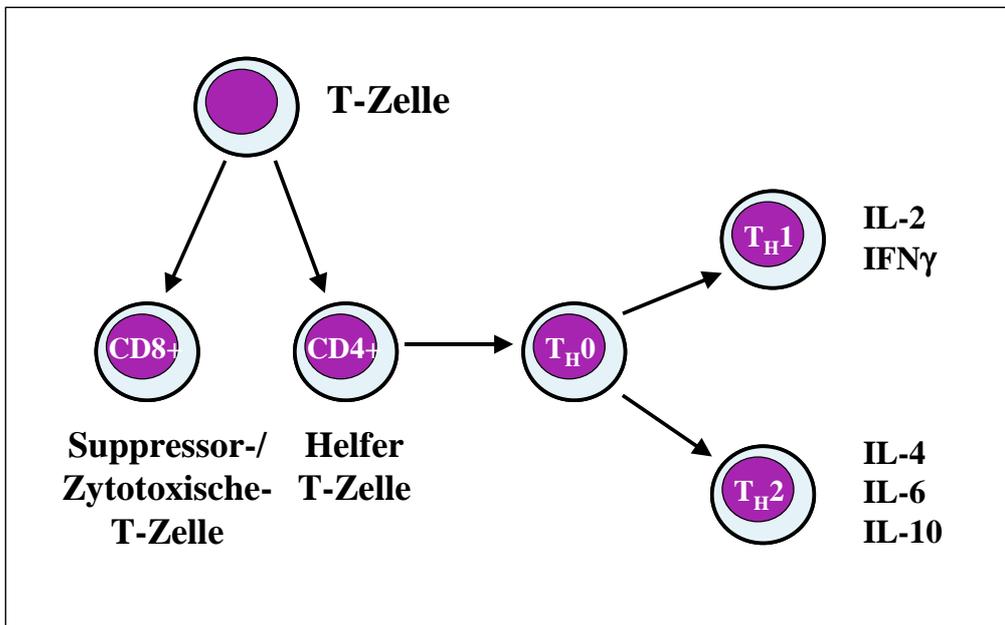


Abb. 2: Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen und deren Zytokinproduktion (nach Kap. 2.2.1 bis 2.2.10 erstellt)

Legende für Abb.1 und 2:

APC = Antigenpräsentierende Zelle; *Ag* = Antigen; *MHC II* = Major-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II; *TCR* = T-Zell-Rezeptor; *T_H* = T-Helferzelle; *T_{H0}* = undifferenzierte T-Helferzelle; *T_{H1}* = T-Helferzelle der Subklasse 1; *T_{H2}* = T-Helferzelle der Subklasse 2; *T_C* = Zytotoxische-/Suppressor-T-Zelle; *B* = B-Lymphozyt; *IL-2R* = IL-2 Rezeptor

2.2.1 Interleukin-1 beta (IL-1 β)

2.2.1.1 Allgemeine Bedeutung von IL-1 β im Immunsystem und Wirkung in endokrinen Organen

IL-1 β ist in seiner biologisch aktiven Form ein etwa 17 kD schweres Polypeptid, das überwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet und sezerniert wird und gilt als wichtiger proinflammatorischer Mediator (DINARELLO 1996). Außer von Makrophagen wird es auch von Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten sowie Muskelzellen gebildet. Die primäre Funktion von IL-1 β ist die Stimulierung der Proliferation und Reifung von Lymphozyten; es stellt aber auch ein endogenes Pyrogen dar, induziert die Sekretion von IL-6 und die Produktion von „Akute-Phase-Proteinen“ in Hepatozyten.

Die cDNA von caninem IL-1 β wurde von GILMORE et al. (1996, Genbank, unpubliziert) kloniert und sequenziert. Sie ist 382 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 119 Aminosäuren kodiert.

Für IL-1 β sind zur Zeit zwei membranständige Rezeptortypen, IL-1 Rt I und II, identifiziert, wobei die Signalübertragung ausschließlich über den IL-1 Rt I erfolgt (SIMS et al. 1993). Zellen, die von IL-1 β reguliert werden, produzieren ihrerseits einen IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1 Ra).

Bei der Frau wurde in Proben aus Zervikovaginallavagen während der Follikelphase im Vergleich zur Lutealphase eine fünffach höhere Konzentration an IL-1 β gemessen (AL-HARTHI et al. 2000). Weiterhin wurde IL-1 β in der Follikelflüssigkeit von Frauen nachgewiesen (CALOGERO et al. 1998). In vitro-Perfusionsstudien an Ratten- und Kaninchenovarien haben vermuten lassen, dass es eine wesentliche Rolle bei der Auslösung der Ovulation spielt (BRÄNNSTRÖM et al. 1993, TAKEHARA et al. 1994).

Bei der Maus konnten SIMON et al. (1994) IL-1 β und den IL-1 Rt I immunhistologisch in der interstitiellen Thekazellschicht des heranwachsenden Follikels nachweisen. Auch an der Plasmamembran und im Zytoplasma der Oozyte zeigte sich ein intensives Signal für den IL-1 Rt I. Die Expression der mRNA von IL-1 Ra wurde bei der Ratte mittels in situ-Hybridisierung in zellwandnahen und antralen Granulosazellen sowie in Granulosazellen des Cumulus oophorus lokalisiert (KOL et al. 1999). In präovulatorischen Follikelflüssigkeitsaspiraten von Gonadotropin-stimulierten Frauen wurde die mRNA von IL-1 β , des IL-1 Rt I und des IL-1 Ra nachgewiesen (HURWITZ et al. 1992). In der humanen Granulosa- und Theca-

zellkultur wurde die mRNA von IL-1 β und des IL-1 Ra jedoch unter Basalkonditionen nicht exprimiert, dafür aber die mRNA des IL-1 Rt I. Der Zusatz von Forskolin, das über eine Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP führt, induzierte ausschließlich in den Granulosazellen IL-1 β -Transkripte, während der IL-1 Rt I in beiden Zelltypen (Granulosa- und Thekazellen) exprimiert wurde; die Bildung von IL-1 Ra-Transkripten wurde in keinem der beiden Zelltypen induziert.

2.2.1.2 Beziehungen von IL-1 β zur Corpus luteum-Funktion

Neben seiner Bedeutung für die Ovulation soll IL-1 β auch bei der Umgestaltung des CL eine regulatorische Funktion einnehmen, da es unter Zellkulturbedingungen – gemessen an der Progesteronproduktion - eine Hemmung der Luteinisierung von murinen und porcinen Granulosazellen bewirkt hat (GOTTSCHALL et al. 1987, FUKUOKA et al. 1988).

Aufgrund der Komplexität der zahlreichen Untersuchungen über die Wirkung von IL-1 β (und der in den Kap. 2.2.2.2 bis 2.2.10.2 behandelten Zytokine) im CL, sollen die bisher bekannten Untersuchungsergebnisse im Folgenden in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode spezievergleichend dargestellt werden. In der Literatur finden sich dazu Angaben aus Untersuchungen im Mikrodialyse- und Zellkultursystem, wobei u.a. Effekte auf die Progesteron-, Östrogen- oder Prostaglandinproduktion beobachtet wurden. Des weiteren erfolgt eine Einteilung nach der angewendeten Nachweismethode (z.B. Immunhistologie, in situ-Hybridisierung, PCR, Western Blot...).

***In vitro*-Untersuchungen an mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom Zyklus:**

BOUMAN et al. (2001) wiesen bei der Frau in der Lutealphase eine im Vergleich zur Follikelphase erhöhte Anzahl IL-1 β produzierender Makrophagen nach und bestätigten damit Ergebnisse von CANNON et al. (1985). POLAN et al. (1989/1994) fanden in peripheren Monozyten während der Lutealphase im Vergleich zur Follikelphase eine 3fach höhere Expression der mRNA von IL-1 β . Auch eine Inkubation mit physiologischen Progesteron- und Östrogenkonzentrationen führte zu einem Anstieg der mRNA-Expression. Im Plasma der Frau ließen sich allerdings keine Unterschiede in der Proteinkonzentration von IL-1 β zwischen der Follikel- und der Lutealphase nachweisen (AL-HARTHI et al. 2000).

Nachweis der mRNA von IL-1 β im CL:*Untersuchungen beim Mensch:*

In humanen Granulosaluteinzellen wurde die mRNA von IL-1 β mittels Northern Blot nachgewiesen, wobei die Expression bei einer Kulturdauer von 6 Stunden anstieg und über 24 Stunden erhöht blieb; hCG hatte keinen Effekt auf die Expression (PIQUETTE et al. 1994), LH führte zu einer Aufregulierung der Expression (CHEN et al. 2000).

Untersuchungen beim Rind:

Die Expression der mRNA von IL-1 β im bovinen CL wurde von PETROFF et al. (1999) nachgewiesen. Allerdings ergab eine densitometrische Analyse keine Unterschiede in der Expressionsstärke während der frühen, mittleren oder späten Lutealphase.

Proteinexpression von IL-1 β im CL:*Untersuchungen beim Mensch:*

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten ein positives Signal für IL-1 β und den IL-1 Rt I in humanen Granulosaluteinzellen, wobei sich im Zytopräparat enthaltene Makrophagen negativ darstellten (PIQUETTE et al. 1994).

Untersuchungen beim Nager:

Immunhistologisch wurde ein ausgeprägt starkes Signal für IL-1 β , den IL-1 Rt I und auch für IL-1 α in Granulosaluteinzellen des sich neu formierenden CL der Maus nachgewiesen (SIMON et al. 1994).

Untersuchungen im Mikrodialysesystem:

Beim Pavian wurde nach Zuführung von IL-1 β über einen Zeitraum von 12 Stunden während der mittleren Lutealphase die Progesteronsynthese im CL gehemmt – bei zwei Versuchstieren direkt nach Behandlungsbeginn, bei zwei weiteren erst gegen Ende der Behandlung (DAWOOD et al. 1997). Auch nach Abbruch der IL-1 β -Zufuhr blieb die Progesteronsekretion unterdrückt. Die Sekretion von PGF_{2 α} stieg während und auch nach der Behandlung mit IL-1 β an.

Effekte von IL-1 β in der Lutealzellkultur im Hinblick auf die Progesteron- und Östrogen-synthese:

Untersuchungen beim Mensch:

Im CL sind unter Zellkulturbedingungen überwiegend Immunzellen für die Produktion von IL-1 β verantwortlich, da in der leukozytenfreien Lutealzellkultur die Konzentration an IL-1 β im Vergleich zu einer Mischkultur um die fünffache Menge abfiel (CASTRO et al. 1998).

In der relativ reinen humanen Granulosaluteinzellkultur konnten WANG et al. (1991) keine Wirkung von IL-1 auf die basale und hCG-stimulierte Progesteronproduktion zeigen.

Dagegen wurde bei Kokultivierung mit Leukozyten die basale und hCG-stimulierte Progesteronproduktion von humanen Granulosaluteinzellen sowohl von IL-1 β als auch von IL-1 α gehemmt (BEST & HILL 1995). Im gleichen System wurde die Synthese von Estradiol durch IL-1 β unterdrückt. Die Tatsache, dass durch IL-1 β die Produktion von Estradiol und Progesteron nur in der Mischkultur und nicht in der leukozytenfreien Zellkultur gehemmt werden konnte, lässt auf eine indirekte Wirkung von IL-1 β auf die luteale Steroidbiosynthese und die Mitbeteiligung von Leukozyten, die aus dem CL stammen, schließen (KOHEN et al. 1999).

Davon abweichende Beobachtungen machten allerdings CHEN et al. (2000) und TAMURA et al. (2000). In ihren Untersuchungen zeigte sich zunächst der gegenteilige Effekt einer Stimulation der basalen Progesteronproduktion der Granulosaluteinzellen. Dieser Effekt zeigte sich nicht mehr bezüglich der LH-stimulierten Progesteronproduktion, die LH-stimulierte Östrogenproduktion wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BEST & HILL (1995) gehemmt.

In der Lutealzellkultur von Affen hemmte IL-1 β die hCG-stimulierte Progesteronsynthese (YOUNG et al. 1997).

Untersuchungen beim Rind:

In der bovinen Lutealzellkultur, zeigte IL-1 β nach einem Mediumwechsel innerhalb von 48 Stunden keinen Effekt auf die Progesteronkonzentration (NOTHNICK & PATE 1990). Eine längere Exposition von IL-1 β über 78 Stunden führte zu einer Hemmung der Progesteronsynthese (TOWNSON & PATE 1994).

Untersuchungen beim Schwein:

Beim Schwein wurde sowohl die basale als auch hCG-stimulierte Progesteron- und Östrogenproduktion in kleinen und großen Lutealzellen ohne Kokultivierung mit Immunzellen durch IL-1 inhibiert, im Vergleich zu TNF- α war die Wirkung jedoch weniger stark ausgeprägt (PITZEL et al. 1993). Die hemmende Wirkung von PGF_{2 α} und Oxytocin (OXT) auf die Pro-

gesteronsynthese und die stimulierende Wirkung beider Substanzen auf die Östrogenproduktion wurde durch IL-1 weiter gesteigert. Dabei war die Wirkung von IL-1 auch in diesem Fall schwächer als die von TNF- α (PITZEL et al. 1993). In wieweit in diesen Untersuchungen IL-1 α oder IL-1 β zur Anwendung kamen, geht aus den gemachten Angaben nicht hervor.

Untersuchungen beim Nager:

In der Lutealzellkultur von mit PMSG/hCG-geprägten Ratten resultierte die Behandlung mit IL-1 β in einem 65-86 %igen Abfall der Progesteronproduktion (HURWITZ et al. 1997). KASSON & GOROSPE (1989) beobachteten eine durch IL-1 β verursachte Hemmung der FSH-stimulierten Progesteron- und Östrogenproduktion sowie eine Hemmung der Induktion von LH/hCG-Rezeptoren in Granulosazellen der Ratte. Auch die durch Forskolin induzierte Sekretion von Östradiol wurde durch IL-1 β unterdrückt, so dass IL-1 β seine Wirkung über das Second-Messenger-System der Adenylatzyklase/cAMP auszuüben scheint (GOTT-SCHALL et al. 1989).

Effekte von IL-1 β in der Lutealzellkultur auf die Prostaglandinsynthese:

Untersuchungen beim Primaten:

Beim Affen stimulierte IL-1 β die PGF_{2 α} -Produktion ausschließlich in Lutealzellen, die während der mittleren und späten Lutealphase gewonnen worden waren; dieser Effekt wurde durch die Zugabe von hCG gehemmt (YOUNG et al. 1997).

In der humanen Granulosazellkultur wurde die Synthese von PGF_{2 α} und PGE₂ durch IL-1 β stimuliert und durch gleichzeitige Zugabe von Indomethacin gehemmt (WATANABE et al. 1993).

NARKO et al. (1997) zeigten, dass die durch IL-1 β stimulierte PG-Synthese in der humanen Granulosaluteinzellkultur über eine Expression der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) - dem limitierenden Enzym für die Synthese von Arachidonsäure zu Prostaglandinen - verläuft, da die Expression der entsprechenden mRNA durch IL-1 β gesteigert wurde. Diese Wirkung von IL-1 β konnte durch hCG und Cycloheximid (Inhibitor der Proteinsynthese) noch weiter gesteigert werden. In der gleichen Studie wurde eine zeit- und dosisabhängige Aufregulierung des PGF_{2 α} -Rezeptors (FP) durch IL-1 β und auch durch hCG gezeigt. Dabei konnte die Induktion der Expression der mRNA von PGE₂-Rezeptoren (EP2- und EP4-Rezeptor) durch IL-1 β gezeigt werden (NARKO et al. 2001).

Untersuchungen beim Rind:

Auch in der bovinen Lutealzellkultur stimulierte IL-1 β die Prostaglandinsynthese (NOTHNICK & PATE 1990). Darüber hinaus wurde über eine von der Progesteronkonzentration abhängigen Wirkung von IL-1 β auf die Prostaglandinsynthese berichtet, d.h. Progesteron unterdrückte die basale und die durch IL-1 β stimulierte Prostaglandinsynthese. Der durch den Zusatz von IL-1 β verursachte Anstieg von 6-keto-PGF_{1 α} , PGE₂ und PGF_{2 α} im Kulturmedium wurde durch Indomethacin (Inhibitor der PG-Biosynthese bzw. der Cyclooxygenase), jedoch nicht durch Iloprost (synthetisches Analogon zu Prostazyklin) gehemmt. Auch DEL VECCHIO & SUTHERLAND (1997) berichteten über eine Hemmung der IL-1 β -stimulierten Synthese von PGF_{2 α} und PGE₂ durch Indomethacin in der bovinen Lutealzellkultur. Cycloheximid, Actinomycin D, Aristolochiasäure (Inhibitor der Phospholipase A₂, PLA₂) und Compound 48/80 (Inhibitor der Phospholipase C, PLC) führten zu einer kompletten Hemmung der durch IL-1 β stimulierten PGF_{2 α} -Produktion in der bovinen Lutealzellkultur (TOWNSON & PATE 1994). Die Zugabe von Arachidonsäure stellte die stimulierende Wirkung von IL-1 β auf die Prostaglandinsynthese in den mit Compound 48/80 behandelten Zellen, - nicht jedoch in den mit Aristolochiasäure behandelten Zellen - wieder her, so dass die Phospholipase A₂ der zentrale Regelfaktor bei der Synthese der IL-1 β stimulierten Prostaglandinsynthese zu sein scheint. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass „in vivo“ IL-1 β die Regression des CL fördern könnte.

Untersuchungen beim Schwein:

PITZEL et al. (1993) konnten einen durch IL-1 bedingten Anstieg der inhibitorischen Wirkung von PGF_{2 α} und OXT auf die Progesteronsynthese von in Kultur gehaltenen porcinen Granulosaluteinzellen nachweisen.

In der LH-stimulierten porcinen Granulosazellkultur kam es unter der Wirkung von IL-1 zu einem intra- und extrazellulären Abfall von cAMP (FUKUOKA et al. 1989). Auch der Forskolin-stimulierte Anstieg von cAMP wurde durch IL-1 gehemmt, so dass IL-1 in der Lage ist, die Adenylatzyklaseaktivität direkt zu hemmen. Die durch Butyryl-2-cAMP-stimulierte Progesteronsekretion wurde durch IL-1 jedoch nicht gehemmt, so dass dieses Zytokin im Hinblick auf die Progesteronproduktion in Regelmechanismen eingreift, die proximal des cAMP-Messenger-Systems lokalisiert sind und die Produktion von cAMP nicht direkt beeinflussen.

Untersuchungen beim Nager:

In Zellsuspensionen aus dem Ovar der Ratte kam es unter der Einwirkung von IL-1 β zu einem dosisabhängigen Anstieg von Prostaglandinen, bei dem die gemessene Konzentration von PGE₂ höher war als diejenige von PGF_{2 α} (KOKIA et al. 1992). Dabei zeigte sich, dass eine heterologe, durch eine interzelluläre Membran getrennte (kontaktunabhängig) Zell-zu-Zell-Interaktion an der Auslösung dieser Effekte beteiligt ist, da isolierte Granulosa- bzw. Thekazellkulturen unter der Einwirkung von IL-1 β deutlich geringere Anstiege der PGE₂-Konzentrationen aufwiesen.

Eine Exposition PMSG-stimulierter Granulosazellen der Ratte mit IL-1 β führte zu einer Reduktion des Plasminogenaktivators (PA) um 30 % und zu einem signifikanten Anstieg des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), was von einem siebenfachen Anstieg von PGE begleitet wurde (HURWITZ et al. 1995). Diese Effekte wurden durch Zugabe des IL-1 Ra unterbunden, so dass es sich anscheinend um eine spezifische rezeptorvermittelte Antwort handelt. Indomethacin (Inhibitor der Prostaglandinsynthese) und TGF- β 1 (besitzt eine regulierende Wirkung auf IL-1) führten zu einem Abfall der IL-1 β -stimulierten PGE-Synthese, beide Substanzen konnten jedoch das PA-System nicht beeinflussen. In einer weiterführenden Untersuchung verlief der durch IL-1 β -induzierte zwei- bis dreifache Anstieg von PGE in der Lutealzellkultur von PMSG/hCG-geprägten Ratten simultan zu einem Abfall der Progesteronkonzentration (HURWITZ et al. 1997). Ferner zeigte sich ein Anstieg der PGF_{2 α} -Konzentration um 70 % und ein zwei- bis dreifacher Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO). Auch diese Effekte wurden durch Hinzufügen eines IL-1 Ra aufgehoben. Die Synthese von PGE und PGF_{2 α} sowie die basal gemessene Progesteronkonzentration, nicht jedoch der durch IL-1 β induzierte Abfall der Progesteronkonzentration, wurden durch Zugabe von Indomethacin unterdrückt. Sowohl die basalen Progesteron- und PGE-Konzentrationen als auch der IL-1 β -induzierte Anstieg von PGE wurde durch N^G-Nitro-L-Arginin, - einem kompetitiven Inhibitor der Nitrilsynthese -, gehemmt. Der IL-1 β -induzierte Abfall der Progesteronkonzentration blieb davon jedoch unbeeinflusst. Des Weiteren wurde die IL-1 β -stimulierte Synthese von PGE und NO durch TGF- β 1 gehemmt, die IL-1 β -induzierte Hemmung der Progesteronproduktion wurde dadurch jedoch ebenfalls nicht beeinflusst. Die Autoren schließen daraus, dass NO, PGF_{2 α} , und PGE nicht obligatorisch als Vermittler bei der IL-1 β -induzierten Hemmung der Progesteronsynthese auftreten, NO jedoch eine regulierende Wirkung bei der PGE-Biosynthese besitzen könnte.

Die Expression des EP2-Rezeptors wurde wie beim Mensch (s.o.) auch im murinen CL nachgewiesen (NARKO et al. 2001).

Untersuchungen zu zytotoxischen Effekten von IL-1 β in der Lutealzellkultur:

Untersuchungen beim Rind:

Beim Rind zeigte der Zusatz von IL-1 β allein und in Kombination mit TNF- α oder IFN- γ keine zytotoxischen Effekte auf bovine Lutealzellen (BENYO & PATE 1992).

Untersuchungen beim Schwein:

In der Granulosazellkultur beim Schwein stimulierte IL-1 das Zellwachstum, zytotoxische Effekte zeigten sich nicht (FUKUOKA et al. 1989).

Untersuchungen beim Nager:

Die Resultate bei der Maus (JO et al. 1995) decken sich mit den Beobachtungen von BENYO & PATE (1992) beim Rind (s.o.).

Bei der Ratte kam es durch IL-1 β zu einer zeitabhängigen morphologischen Veränderung von Zellsuspensionen aus dem Ovar, welche sich in einer irreversiblen Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale bemerkbar machte und zum Zelltod führte (HURWITZ et al. 1992).

Expression des IL-1 Rt I und des IL-1 Ra:

Untersuchungen beim Mensch:

Im in vitro-Ansatz mit Granulosaluteinzellen war die Expression der mRNA des IL-1 Rt I über einen Zeitraum von 24 Stunden konstant und wurde durch Zugabe von IL-1 β um das Zweifache erhöht (PIQUETTE et al. 1994).

Bei Kokultivierung humaner Lutealzellen mit Leukozyten resultierte die Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den IL-1 Rt I in einem 2,5fachen Anstieg der hCG-stimulierten Progesteronsynthese (KOHEN et al. 1999). Immunhistologisch wurde der IL-1 Rt I und der IL-1 Ra in der Zellmembran von Lutealzellen und Immunzellen nachgewiesen. Durchflußzytometrische Untersuchungen mit leukozytenfreien Lutealzellkulturen und Mischkulturen zeigten die Expression des IL-1 Rt I und bestätigten somit die immunhistologischen Ergebnisse. Im Northern Blot konnte die mRNA eines 5,1 kb großen IL-1 Rt I-Transkriptes im CL der frühen, mittleren und späten Lutealphase nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels RT-PCR zeigten die Expression der IL-1 Rt I mRNA in Zellen der leukozytenfreien Lutealzellkultur und der Leukozyten-Mischkultur. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass im CL die Expression des IL-1 Rt I-Genes stattfindet.

Untersuchungen beim Nager:

Mittels RT-PCR und in situ-Hybridisierung konnte im CL der Ratte im Verlauf der Lutealphase nur eine schwache Expression der mRNA des IL-1 Rt I und des IL-1 Ra nachgewiesen werden (WANG et al. 1997). Immunhistologisch zeigte sich in Granulosalutealzellen des sich neu formierenden CL der Maus ein starkes Signal für den IL-1 Rt I (SIMON et al. 1994).

Zusammenfassung:

Die Effekte von IL-1 β auf Lutealzellen fallen in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies z.T. unterschiedlich aus. So scheint IL-1 β beim Nager und beim Schwein die Progesteron- und Östrogenproduktion in der Lutealzellkultur ausgeprägt zu hemmen, während beim Rind diese Effekte nur nach einer längeren Exposition auftreten und beim Mensch die Kokultivierung der Lutealzellen mit Leukozyten essentiell zu sein scheint. Bei allen Spezies, die untersucht wurden, scheint IL-1 β in der Lutealzellkultur eine stimulierende Wirkung auf die Prostaglandinsynthese zu besitzen. Beim Rind, Schwein und Nager wurden unter der Wirkung von IL-1 β alleine keine zytotoxischen Effekte auf Lutealzellen nachgewiesen. Die mRNA von IL-1 β wurde bisher im CL von Mensch und Rind nachgewiesen. Beim Mensch und Nager wurde ein immunhistologisches Signal für IL-1 β in den Granulosaluteinzellen des sich neu formierenden CL gezeigt. Der Nachweis des IL-1 Rt und des IL-1 Ra (Mensch, Ratte) im CL weist auf ein komplexes regulatorisches System hin.

2.2.2 Interleukin-2 (IL-2)

2.2.2.1 Allgemeine Bedeutung von IL-2 im Immunsystem

Interleukin-2 (IL-2), das überwiegend von aktivierten T-Zellen gebildet wird und von MORGAN et al. (1976) erstmals als T-Zellwachstumsfaktor beschrieben wurde, ist ein Glykoprotein, das abhängig von der Spezies ein Molekulargewicht von 15 kD (humanes IL-2) bis 30 kD (murines IL-2, GILLIS et al. 1982 und canines IL-2, DAEMEN et al. 1983/84) aufweist.

Die cDNA von caninem IL-2 wurde von DUNHAM et al. (1995) und KNAPP et al. (1995) kloniert und sequenziert. Sie ist 653 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 155 Aminosäuren kodiert. Das Protein zeigt eine Homologie von 90 % zu felinem, 86 % zu humanem, 84% zu equinem, 76% zu murinem und 75 % zu bovinem IL-2.

Nach Antigenexpression auf Makrophagen und der damit verbundenen Freisetzung von IL-1, oder aber auch durch direkte Lektinwirkung, erfolgt die Aktivierung vorwiegend von Th1-Zellen (MOSMANN et al. 1986), was zur Expression von IL-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der aktivierten T-Zellen und zur Freisetzung von IL-2 führt (CANTRELL & SMITH, 1984). Dies bewirkt die Expression von IL-2-Rezeptoren auf weiteren T-Zellen und deren Proliferation, aber auch die Proliferation von B-Zellen und NK-Zellen sowie einen Anstieg der zytotoxischen Aktivität von Monozyten. Der hochaffine IL-2 Rezeptor besteht aus 3 verschiedenen Ketten (α , β und γ), wobei IL-2R $\beta\gamma$ -Heterodimere IL-2 binden und dadurch die transmembranäre Signaltransduktion vermitteln. Der IL-2R α erhöht die Affinität des Rezeptors für IL-2, ohne dabei eine Signalübertragung zu bewirken.

Des Weiteren kann IL-2 die Synthese von IFN- γ sowie TNF- β stimulieren und die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen in Synergie mit IL-12 induzieren.

Beim Menschen konnte IL-2 zwar nicht in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden (CALOGERO et al. 1998), jedoch im Kulturüberstand von humanen Granulosazellen, wobei die Konzentration von IL-2 durch hCG regulierbar zu sein scheint (ORVIETO et al. 1997).

Beziehungen von IL-2 zur Corpus luteum-Funktion

Untersuchungen im Plasma und an mononukleären Zellen (in vitro):

Bei Frauen mit Fertilitätsproblemen ungeklärter Ätiologie konnten BRÄNNSTRÖM et al. (1999) keine Unterschiede im Verlauf der Konzentrationen von IL-2 im Plasma während des Zyklus feststellen. Auch aktivierte NK-Lymphozyten aus der Lutealphase und der Follikelphase der Frau zeigten keine Unterschiede in der IL-2-Produktion (BOUMAN et al. 2001).

Nachweis der mRNA von IL-2 im CL:

Im bovinen CL konnte die Expression der mRNA von IL-2 und des IL-2R mittels RT-PCR bisher nicht nachgewiesen werden (PETROFF et al. 1999).

Effekte von IL-2 in der Lutealzellkultur im Hinblick auf die Progesteron- und Östrogensynthese:

Die Wirkung von IL-2 im in vitro Versuch auf die ovarielle Steroidbiosynthese wird kontrovers diskutiert.

Untersuchungen beim Mensch:

Die hCG-stimulierte (jedoch nicht die basale) Progesteronsynthese von in der Kultur gehaltenen humanen Granulosaluteinzellen wurde durch humanes rekombinantes IL-2 gehemmt, jedoch stimulierten IL-2-haltige Zellkulturüberstände die basale Progesteronsekretion sowie die Zellproliferation, so dass WANG et al. (1991) annehmen, dass noch andere Mediatoren im Überstand der verwendeten Zelllinie vorhanden waren. Humanes rekombinantes IL-2 hemmte die durch Forskolin (s.o.) stimulierte Progesteronproduktion, jedoch ging dieser Effekt nicht wie erwartet mit einer abfallenden Konzentration an cAMP einher, so dass die Signaltransduktion von IL-2 distal des cAMP-Messenger-Systems ansetzen dürfte (WANG et al. 1991). In einer Primärkultur, die überwiegend humane Granulosaluteinzellen enthielt, betraf die proliferative Wirkung von IL-2 eher die Leukozyten als die Granulosaluteinzellen, so dass möglicherweise auch auf eine indirekte Wirkung auf Granulosaluteinzellen über zytokinaktivierte Leukozyten geschlossen werden kann (WANG et al. 1995).

Untersuchungen beim Schwein:

In der porcinen Lutealzellkultur konnten TEKPETEY & ARMSTRONG (1991) keine Wirkung von IL-2 auf die Progesteronsynthese nachweisen, während PITZEL et al. (1993) eine durch IL-2 bedingte Hemmung der basalen und hCG-stimulierten Progesteron- und Östrogen-

sekretion in kleinen und großen porcinen Lutealzellen beschrieben, die aber im Vergleich zur Wirkung von TNF- α weniger stark ausgeprägt war. In der gleichen Arbeit wird berichtet, dass die hemmende Wirkung von PGF_{2 α} und OXT auf die Progesteronsynthese und die stimulierende Wirkung beider Substanzen auf die Östrogenproduktion durch IL-2 verstärkt wird; allerdings war die Wirkung von IL-2 auch hier schwächer ausgeprägt als jene von TNF- α . Auch FUKUOKA et al. (1988) beschrieben eine hemmende Wirkung von IL-2 auf die LH-stimulierte Progesteronsynthese in Granulosazellen des Schweines.

Untersuchungen beim Nager:

Bei Lutealzellen, die aus dem CL vom Kaninchen isoliert wurden, konnten CHUDASKA & SCHLEGEL (1993) weder eine Veränderung in der Progesteron- noch in der Prostaglandinproduktion (PGE₂ und PGF_{2 α}) nach Zugabe von IL-2 zum Kulturmedium beobachten.

Für die Ratte liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. So berichten KASSON & GOROSPE (1989) über eine Erhöhung der FSH-stimulierten Progesteronproduktion von Granulosazellen nach Zusatz von IL-2, während GOTTSCHALL et al. (1988) eine hemmende Wirkung von IL-2 auf die FSH-stimulierte Progesteronsynthese in der Granulosazellkultur beobachteten. In den Untersuchungen von KASSON & GOROSPE (1989) wurde die FSH-stimulierte Östrogensynthese und die Induktion des LH/hCG-Rezeptors von IL-2 nicht beeinflusst.

2.2.3 Interleukin-4 (IL-4)

2.2.3.1 Allgemeine Bedeutung von IL-4 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

IL-4 ist ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kD, das vorwiegend von Th2-Lymphozyten produziert wird. Es ist an der Stimulierung und dem „Klassenswitch“ (Wechsel der Immunglobulinklasse z.B. von IgM zu IgG im Zuge einer aktiven Immunisierung) von B-Zellen, sowie der Induktion der Antikörperproduktion beteiligt. IL-4 wirkt als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Th2-Zellen und inhibiert infolgedessen die Differenzierung des Th1-Zelltyps (KELSO 1995) sowie die Makrophagenaktivierung und die Produktion von IL-1 und IFN- γ .

Die cDNA von caninem IL-4 wurde von VAN DER KAAIJ et al. (1999) kloniert und sequenziert. Sie ist 399 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 132 Aminosäuren kodiert. Die Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz beträgt im Vergleich zur Katze 88 %, zum Rind 74 %, zum Menschen 57 % und zur Maus 50 %. Das Protein zeigt eine Ho-

mologie von 81 % zu felinem, 61 % zu bovinem, 40 % zu humanem und 32 % zu murinem IL-4.

Die Signaltransduktion erfolgt durch Bindung von IL-4-Dimeren an den IL-4 Rezeptor, wodurch rezeptorassoziierte Tyrosinkinase aktiviert werden.

Beim Menschen wurde das Protein von IL-4 in der Follikelflüssigkeit nicht nachgewiesen (CALOGERO et al. 1998), jedoch die mRNA in Zellen des Cumulus oophorus (PICCINNI et al. 2001). T-Zellklone, die aus der Dezidua von Frauen mit ungeklärten rezidivierenden Aborten gewonnen wurden, produzierten in-vitro signifikant niedrigere IL-4 Konzentrationen als T-Zellklone, die aus der Dezidua normaler Schwangerschaften oder aus dem Endometrium von nichtgraviden Frauen gewonnen wurden (PICCINNI & ROMAGNANI 1996). Die Autoren folgerten daraus, dass IL-4 das Überleben und das Wachstum des Fetus fördern könnte.

2.2.3.2 Beziehungen von IL-4 zur Corpus luteum-Funktion

Bei der Frau wurden keine Unterschiede in der IL-4-Konzentration im Plasma zwischen der Follikel- und Lutealphase festgestellt (AL-HARTHI et al. 2000). Auch aus dem peripheren Blut gewonnene aktivierte NK-Lymphozyten wiesen in den beiden Phasen keine Unterschiede in der Produktion von IL-4 auf (BOUMAN et al. 2001); jedoch stieg die Produktion von IL-4 in den Gesamtleukozyten in der Lutealphase an (FAAS et al. 2000).

Im Vergleich zu in-vitro Kulturen mit Lutealzellen aus Corpora lutea nicht-gravider Frauen, die mit mononukleären Blutzellen kokultiviert wurden, war die Produktion von IL-4 bei Zellkulturen aus CL gravider Frauen erhöht. HASHII et al. (1998) schließen daraus, dass IL-4 bei der Transformation des CL zyklisch zum CL graviditatis und an der Aufrechterhaltung der CL-Funktion während der Schwangerschaft beteiligt sein könnte. Die Progesteronsynthese wurde durch Zusatz von IL-4 zur Lutealzellkultur gesteigert.

Weiterhin zeigte sich, dass der Zusatz von IL-4 nur in der leukozytenarmen Granulosaluteinzellkultur und nicht in den mit Leukozyten kokultivierten Granulosaluteinzellen die Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11 β -HSD) steigern konnte (EVAGELATOU et al. 1997).

2.2.4 Interleukin-6 (IL-6)

2.2.4.1 Allgemeine Bedeutung von IL-6 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

IL-6 ist ein etwa 26 kD schweres, multifunktionelles Zytokin und wird außer von Makrophagen und aktivierten T-Zellen auch von zahlreichen anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Mastzellen, Endothelzellen oder Epithelzellen sezerniert (KISHIMOTO et al. 1995, AKIRA et al. 1990).

IL-6 wurde ursprünglich als Faktor identifiziert, der die endgültige Reifung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen herbeiführt (HIRANO et al. 1986). Nachfolgende Studien zeigten, dass IL-6 auch die T-Zellaktivierung und die Expression von Akute-Phase-Proteinen auf der Zelloberfläche von Hepatozyten induziert sowie das Zellwachstum und die Reifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen stimuliert (VAN SNICK 1990). IL-1 α/β , TNF- α und Lipopolysaccharid (LPS) sind potente Induktoren der IL-6 Sekretion.

Die komplette cDNA von caninem IL-6 wurde von KUKIELKA et al. (1995) kloniert und sequenziert. Sie ist 1104 Basenpaare lang und besteht aus einer 57 Nukleotide langen 5'-untranslatierten Region, gefolgt von einem offenen Leserahmen mit einer Länge von 621 Basenpaaren und einer 3'-untranslatierten Region von 426 Basenpaaren. Der offene Leserahmen beginnt mit dem Startcodon AUG an Position 58 und endet mit dem Stopcodon an der Position 679. Die Länge der 3'-untranslatierten Region von caninem IL-6 ist ähnlich zu derjenigen von humanem, porcinem und murinem IL-6. In dieser Region wurden 5 Kopien des Pentamers AUUUA entdeckt, welche die Fähigkeit besitzen sollen, die Stabilität der mRNA zu reduzieren und den nukleären Transport zu beschleunigen. Die komplette cDNA von IL-6 kodiert ein Protein mit einer Länge von 207 Aminosäuren und zeigt eine Homologie von 60 % zu humanem und 70 % zu porcinem IL-6.

Die Signaltransduktion von IL-6 erfolgt durch die Bindung an seinen Rezeptor (IL-6 R), was eine nachfolgende Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors selbst und seiner assoziierten Untereinheit (gp130) bewirkt, welche wiederum die Aktivierung von Proteinen der „Janus-Kinase-Familie“ (JAK1, JAK2, TYK2) mit nachfolgender Phosphorylierung des „Signal Transducer and Activator of Transcription-3“ (STAT3) zur Folge hat (IHLE & KERR 1995). Aktiviertes STAT3 bildet daraufhin Homo- und/oder Heterodimere, die in den Nukleus translozieren und durch Interaktion mit spezifischen „Response Elements“ der DNA die Transkription von Zielgenen für IL-6 regulieren (z.B. c-fos, junB).

Eine weitere Kaskade der Signaltransduktion von IL-6 läuft über die Aktivierung der MAPK (= Mitogen Activated Protein Kinase) und des nukleären Transkriptionsfaktors (NF)-IL-6, der zusammen mit dem NF- κ B für die Aktivierung des IL-6 Promotors erforderlich ist und eine hohe Homologie zu C/EBP (spezifischer Transkriptionsfaktor der Leber) aufweist (AKIRA et al. 1990).

Die Tatsache, dass im Ovar von C/EBP-defizienten Mäusen keine CL mehr gebildet werden, spricht für eine wesentliche Rolle dieses Transkriptionsfaktors an der endgültigen Differenzierung von Granulosa- zu Lutealzellen (STERNECK et al. 1997). Weiterhin berichteten RAY et al. (1997), dass Östrogene starke Repressoren von IL-6-produzierenden uterinen Stromazellen sind und der Östrogenrezeptor direkt mit NF-IL-6 und NF- κ B interagieren kann, indem er die Bindung derselben an die DNA unterbindet.

Auch die bei der Frau gemachte Beobachtung, dass IL-6 in Proben aus Zervikovaginallavagen der Follikelphase im Vergleich zur Lutealphase eine fünffach höhere Konzentration aufwies, weist auf die Bedeutung von IL-6 für das endokrine System hin (AL-HARTHI et al. 2000). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass IL-6 einen Einfluss auf das Wachstum von Zellen des Endometriums ausübt (TABIBZADEH et al. 1989) und an der Stimulierung der Sekretion der Hormone ACTH, PRL, GH und LH aus der Adenohypophyse beteiligt ist (SPANGELO et al. 1989).

Sowohl Sertoli- als auch Leydigzellen besitzen die Fähigkeit unter Zellkulturbedingungen IL-6 zu produzieren (OKUDA et al. 1994), wobei IL-6 die Expression von „Early Genes“ in den Sertolizellen reguliert (JENAB & MORRIS et al. 1997) und in den Leydigzellen die Produktion von Steroidhormonen downreguliert (HALES et al. 1999).

Ferner wurde eine Beteiligung von IL-6 an infektiösen Erkrankungen des weiblichen Reproduktionstraktes nachgewiesen. Es wurde in hohen Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit von Frauen, die am ovariellen Hyperstimulationssyndrom (OHSS) litten, nachgewiesen (BUYALOS et al. 1992, LORET DE MOLA et al. 1996). CALOGERO et al. (1998) wiesen bei Frauen mit einer immunologisch bedingten Infertilität erhöhte Konzentrationen von IL-6 in der Follikelflüssigkeit nach. MOTRO et al. (1990) konnten eine transiente Expression der mRNA von IL-6 in zwei sich selbst limitierenden angiogenen Prozessen – der Ausbildung des Gefäßsystems während der Follikulogenese und der Bildung des kapillären Netzwerks der maternalen Dezidua während der Implantation des Embryos – nachweisen. Diese Beobachtungen und der Nachweis der Expression von IL-6 in Endothelzellen in der Phase der Vaskularisierung sprechen für eine Bedeutung dieses Zytokins auch in der Angiogenese.

2.2.4.2 Beziehungen von IL-6 zur Corpus luteum-Funktion

Untersuchungen im Plasma:

Die Konzentration von IL-6 im Blut war bei der Frau in der Lutealphase niedrig; eine vergleichsweise hohe Konzentration wurde nur kurz vor der Ovulation gemessen, während die lösliche IL-6 R-Konzentration im Verlauf des Zyklus konstant blieb (ANGSTWURM et al. 1997). Bei Frauen mit Infertilitätsproblemen ungeklärter Ätiologie konnten AL-HARTHI et al. (2000) sowie BRÄNNSTRÖM et al. (1999) keine Unterschiede in der Plasmakonzentration von IL-6 während des Zyklus feststellen.

Expression der mRNA von IL-6:

Untersuchungen beim Menschen:

KECK et al. (1998) wiesen die Expression der mRNA von IL-6 in Granulosaluteinzellen vom Menschen mittels In situ-Hybridisierung und RT-PCR nach. Nach MACHELON et al. (1994a) fielen die Hybridisierungssignale von IL-6 in der humanen Granulosazellkultur nach einer Kulturdauer von 24 Stunden stärker aus als nach 72 Stunden, was darauf hindeutet, dass die IL-6 Biosynthese transient induziert wird.

Untersuchungen beim Nager:

Die mRNA von IL-6 wurde im CL der Ratte im Verlauf der Gravidität nur schwach exprimiert; direkt nach der Geburt war jedoch ein starker und abrupter Anstieg der mRNA Expression nachweisbar war (TELLERIA et al. 1998). Während der Gravidität konnte die Expression von IL-6 durch eine Behandlung (Injektion) mit LPS induziert werden.

In der Lutealzellkultur gravider Ratten (Tag 15) zeigte sich dagegen ein spontaner, zeitabhängiger Anstieg der Expression der IL-6 mRNA, die unter der Wirkung von Progesteron und des Glukokortikoidanalogons, Dexamethason, einen starken, konzentrationsabhängigen Abfall zeigte (TELLERIA et al. 1998); Estradiol-17 β hatte nur einen minimal hemmenden Effekt, Prolaktin hatte keinen Effekt.

Proteinexpression von IL-6:*Untersuchungen beim Menschen:*

Immunhistologisch wurde ein intensives Signal für IL-6 im CL sowie in luteinisierten Granulosazellen aus Follikelflüssigkeitsaspiraten nachgewiesen (LORET DE MOLA et al. 1996). Auch humane Granulosaluteinzellen zeigten ein intensives immunzytochemisches Signal für IL-6 und in Kulturüberständen wurde IL-6 Protein mittels ELISA nachgewiesen (KECK et al. 1998). Dessen Konzentration nahm nach einer Kulturdauer von 72 Stunden ab (MACHELON et al. 1994a).

Untersuchungen bei der Ratte:

In der Lutealzellkultur von graviden Ratten (Tag 15) zeigte sich ein spontaner, zeitabhängiger Anstieg der Expression des IL-6 Proteins, wobei große und kleine Lutealzellen IL-6 sezernierten (TELLERIA et al. 1998).

Untersuchungen in der Zellkultur:

Da die Luteinisierung schon während der Ovulation mit der Organisation einer Neovaskularisierung beginnt und IL-6 zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen wurde und dieses Zytokin zudem als angiogener Faktor bekannt ist (s.o.), wurde vermutet, dass IL-6 in der frühen Lutealphase die Angiogenese fördern könnte (MOTRO et al. 1990, VINATIER et al. 1995).

Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit dem Vorkommen und der Wirkung von IL-6 in präovulatorischen Follikeln und in der hormonstimulierten Granulosazellkultur.

Untersuchungen beim Mensch:

MACHELON et al. (1994a) zeigten, dass in präovulatorischen Follikeln der Frau IL-6 von Granulosazellen produziert wird und dass es unter Kokultivierung der Granulosazellen mit Makrophagen sowohl die basale und hCG-stimulierte Progesteronsynthese als auch die basale und FSH-stimulierte Aromataseaktivität steigern konnte; in Makrophagen-freien Kulturen wurden diese Effekte nicht beobachtet.

IL-6 hemmte konzentrations- und zeitabhängig die Östrogenproduktion in der FSH-stimulierten und unstimulierten humanen Granulosazellkultur; auch die Progesteronsekretion in der FSH-stimulierten Zellkultur wurde gehemmt (SALMASSI et al. 2001). Auch KECK et al. (1998) beobachteten in humanen Granulosaluteinzellkulturen eine Hemmung der hCG-stimulierten Progesteronproduktion durch IL-6. Inwiefern in den Untersuchungen von SALMASSI et al. (2001) und KECK et al. (1998) kokultivierte Makrophagen an den Effekten beteiligt waren, kann nicht geklärt werden.

Nach Zusatz von IL-6 zur humanen Granulosaluteinzellkultur stieg die Aktivität der 11 β -HSD in An- und Abwesenheit von kokultivierten Leukozyten an (EVAGELATOU et al. 1997).

Untersuchungen beim Rind:

In Konzentrationen von 0,1 bis 100 ng/ml (Maximum \geq 10 ng/ml) hemmte IL-6 die FSH-stimulierte Östrogenproduktion in der Kultur von bovinen Granulosazellen, die aus kleinen Follikeln stammten, während ähnliche Effekte in Granulosazellen, die aus großen Follikeln stammten, nur mit höheren Konzentrationen an IL-6 (\geq 30 ng/ml) erreicht wurden (ALPIZAR & SPICER 1994). Auch die Zellproliferation von Granulosazellen aus kleinen Follikeln wurde durch IL-6 stärker gehemmt als diejenige aus großen Follikeln.

Untersuchungen beim Schwein:

Anders als bei der Frau konnten beim Schwein die Granulosazellen nicht als eine Quelle der IL-6 Produktion identifiziert werden. Zudem wirkte IL-6 inhibierend auf Differenzierungsprozesse, wie die durch FSH induzierte Aromataseaktivität und die LH-Rezeptorexpression; auch die Progesteronproduktion wurde gehemmt (MACHELON et al. 1994b). In der porcinen Lutealzellkultur hatte IL-6 keinen Einfluss auf die basale und die hCG-stimulierte Progesteron- und Östrogensekretion (PITZEL et al. 1993).

Untersuchungen beim Nager:

Analog zur Situation bei der Frau (s.o.) bewirkte IL-6 auch bei der Ratte eine Hemmung der FSH- und hCG-stimulierten Progesteronproduktion von Granulosazellkulturen (GOROSPE et al. 1992). TAMURA et al. (2000) berichten über eine Hemmung der mRNA Expression der P₄₅₀-Aromatase sowie der Östrogenproduktion in der FSH-stimulierten Granulosazellkultur der Ratte nach Zusatz von IL-6 bei einer Versuchsdauer von 72 Stunden.

Bei der in vitro-Differenzierung von Granulosazellen der Ratte wurde nach Applikation von IL-6 ein Abfall der Expression der mRNA des LH-Rezeptors beobachtet; diese Wirkung wurde durch Zusatz eines Anti-IL-6-Antiserums aufgehoben (TAMURA et al. 2001). Nach 72 Stunden Kultivierungsdauer wurde der LH-vermittelte Anstieg von cAMP durch IL-6 signifikant gehemmt. Der Zusatz eines neutralisierenden Anti-IL-6 Antikörpers zur Granulosazellkultur führte zu einem ausgeprägten Anstieg der mRNA Expression der P₄₅₀-Aromatase. Aus diesem Befund sowie der Beobachtung, dass die FSH-vermittelte Freisetzung von IL-6 aus

Granulosazellen durch IL-1 α / β stimuliert und durch IFN- γ unterdrückt wird, schließen GO-ROSPE et al. (1992), dass die Granulosazellen Produktionsstätten von IL-6 sind.

Expression des IL-6 Rezeptors (IL-6 R und gp 130):

Untersuchungen beim Menschen:

KECK et al. (1998) wiesen die Expression des IL-6 R in humanen Granulosaluteinzellen mittels RT-PCR nach. SALMASSI et al. (2001) konnten mit Hilfe der Immunzytochemie den IL-6 R und den Signaltransducer gp130 auf der Zelloberfläche von humanen Granulosazellen darstellen.

Untersuchungen bei der Ratte:

Sowohl die ligandbindende Untereinheit (IL-6 R) wie auch die assoziierte Bindungskomponente (gp130) des IL-6 Rezeptors wurden im CL während der gesamten Zeitdauer der Trächtigkeit der Ratte sehr stark exprimiert (TELLERIA et al. 1998). Auch in Granulosazellen konnten TAMURA et al. (2000) beide Komponenten des IL-6 Rezeptors nachweisen.

2.2.5 Interleukin-8 (IL-8)

2.2.5.1 Allgemeine Bedeutung von IL-8 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

IL-8 ist ein Chemokin, das die chemotaktische Antwort von neutrophilen Granulozyten induzieren, sowie die Zellaktivierung und die Angiogenese fördern kann. Es ist ein proinflammatorisch wirkendes Polypeptid und wird von einer Vielzahl von Zellen produziert, u.a. von Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen (BAGGIOLINI et al. 1995, MUKAIDA et al. 1994). Weiterhin kann die Produktion von IL-8 in vielen Zelltypen durch die Zytokine IL-1 und TNF- α angeregt werden (LARSEN et al. 1989). IL-8 selbst stimuliert wiederum die Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF- α aus mononukleären Zellen (YU et al. 1994). Das Zusammenspiel von IL-8 und ansteigenden Konzentrationen von PGE₂ hat einen schnelleren Einstrom von Leukozyten ins Gewebe bewirkt (COLDITZ 1990). ENGELHARDT et al. (1998) zeigten, dass IL-8 die Reepithelialisierung und Neovaskularisierung bei der Wundheilung stimuliert.

Die cDNA von caninem IL-8 wurde von MATSUMOTO et al. (1994) kloniert und sequenziert und zeigt eine hohe Homologie zu derjenigen von Mensch, Kaninchen und Schwein. Sie

ist 353 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 101 Aminosäuren kodiert. Das Protein zeigt eine Homologie von 76,5 % zu humanem, 87 % zu porcinem IL-8 und eine Homologie von 80 % zum IL-8 des Kaninchens.

Die Transkription von IL-8 erfordert in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp die Aktivierung der beiden nukleären Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (aktivierendes Protein-1) oder von NF- κ B und NF-IL6 (MUKAIDA et al. 1994).

Im Kulturmedium von Endometriumzellen und in der Follikelflüssigkeit beim Mensch wurden hohe Konzentrationen von IL-8 nachgewiesen, die für die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich sein sollen; nach dem Erreichen des präovulatorischen LH-Peak und nach Verabreichung von hCG stieg die IL-8 Konzentration in der Follikelflüssigkeit und im Kulturmedium von Granulosazellen an (ARICI et al. 1993 und 1996, RUNESSON et al. 2000). Dabei korrelierte der Anstieg von IL-8 mit der Follikelgröße. Bei der Frau konnte gezeigt werden, dass die IL-8 Konzentration im Vaginalsekret mit der Zahl der Granulozyten korreliert (LUO et al. 2000). Bei einer gleichbleibenden Granulozytenzahl während des Zyklus ergab sich jedoch keine Variation der IL-8-Konzentration, ein Anstieg ergab sich erst während der Gravidität in Korrelation mit einer ansteigenden Granulozytenzahl. Bei Frauen, die an Endometriose erkrankt waren, wurden im Vergleich zu klinisch gesunden Frauen hohe Konzentrationen an IL-8 in der Peritonealflüssigkeit gemessen (GAZVANI et al. 1998).

Bei der Frau war die Expression der IL-8 mRNA und des Proteins im Endometrium sowie in der Dezidua in den perivaskulären Zellen der Blutgefäße lokalisiert und stieg unter gleichzeitig sinkenden Progesteronkonzentrationen an (CRITCHLEY et al. 1994, MILNE et al. 1999). Entsprechend wurde ein Anstieg der Expression der mRNA im Endometrium nach Entzug von Progesteron (Verabreichung eines Progesteronrezeptorantagonisten, Mifepriston®) (CRITCHLEY et al. 1999) nachgewiesen. Eine Abnahme der Synthese von IL-8 durch in Kultur gehaltene humanen Endometriumzellen (KELLY et al. 1994) und Fibroblasten des Kaninchens aus dem Zervixbereich (ITO et al. 1994) erfolgte nach Zusatz von Progesteron. Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β bewirkten einen markanten Anstieg der IL-8 Sekretion in der Granulosa- und Thekazellkultur; TNF- α hatte keinen Effekt (RUNESSON et al. 2000).

Immunhistologisch wurde IL-8 in der Thekazellschicht des präovulatorischen Follikels und weniger ausgeprägt auch in der Granulosazellschicht lokalisiert (RUNESSON et al. 2000). Auch beim Kaninchen wurde IL-8 in der Follikelwand des Ovars und im Endometrium nachgewiesen (BELAYET et al. 2000). Pharmakologische Dosen von IL-8 förderten die Follikel-

reifung sowie die Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in der Medulla und der Theca interna des Ovars.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-8 möglicherweise auch eine Rolle bei der Regulation der CL-Funktion besitzt und die Leukozytenwanderung in das sich nach der Ovulation neu formierende CL fördern könnte.

2.2.5.2 Beziehungen von IL-8 zur Corpus luteum-Funktion

In der Literatur finden sich nur wenig Untersuchungen zum Vorkommen und der möglichen Funktion von IL-8 im CL.

Bei der Frau war die Konzentration von IL-8 im Blutplasma während der Follikelphase um das Vierfache höher als in der Lutealphase (AL-HARTHI et al. 2000).

Bei humanen Granulosazellkulturen führte eine Stimulation mit FSH und LH zu einer Erhöhung der Konzentration von IL-8; eine Wirkung von Estradiol und Progesteron auf dessen Produktion wurde in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen. Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β , aber nicht TNF- α , führten zu einem markanten Anstieg der IL-8 Sekretion (RUNESSON et al. 2000).

Die mRNA und die Proteinproduktion von IL-8 wurden in humanen Granulosaluteinzellen nachgewiesen, IL-1 α und TNF- α hatten eine stimulierende Wirkung auf die Expression bzw. Produktion. In diesen Untersuchungen wurde sowohl die basale als auch die durch IL-1 α stimulierte Expression der mRNA bzw. Sekretion von IL-8 in den Granulosalutein- und in Stromazellen unter der Einwirkung von Progesteron unterdrückt (ARICI et al. 1996).

Interleukin-10 (IL-10)

2.2.5.3 Allgemeine Bedeutung von IL-10 im Immunsystem

IL-10 ist ein ca. 18 kD schweres Zytokin und wird hauptsächlich von Th2-Lymphozyten produziert, welche maßgeblich an der Antikörperbildung beteiligt sind (KELSO 1995). Es besitzt immunsuppressive Eigenschaften, indem es die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie von IL-6 und IL-8 in aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten hemmen kann (MOORE et al. 1993, SAGAWA et al. 1996). IL-10 bewirkt die Downregulation der Expression von MHC I/II auf antigenpräsentierenden Zellen und Tumorzellen. Ferner ist es in der Lage, die posttranskriptionelle Expression von IL-2 zu blockieren sowie die Produktion von Prostaglandin E₂ zu induzieren (FIORENTINO et al. 1991). LOERCHER et al. (1999) stellten fest, dass das Tumorwachstum nicht von TGF- β unterdrückt wurde, wenn gleichzeitig IL-10 im Gewebe nachgewiesen wurde. SATO et al. (1999) zeigten, dass IL-10 während der Wundheilung in murinen Keratinozyten lokalisiert ist und dort die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α) hemmte.

Die cDNA von caninem IL-10 wurde von LU et al. (1995) kloniert und sequenziert und zeigt eine Homologie von 86 % zur humanen und bovinen Nukleotidsequenz sowie eine Homologie von 82 % und 80 % zur Nukleotidsequenz von Ratte und Maus. Die cDNA ist 748 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 181 Aminosäuren kodiert. Das Protein zeigt eine Homologie von 81 % zu humanem und von 77 % zu bovinem IL-10. Die Homologie zur Proteinsequenz von Ratte und Maus liegt bei 75 % bzw. 72 %.

Bei der Frau wurde IL-10 sowohl in der Follikelflüssigkeit (CALOGERO et al. 1998) als auch im Sekret des Eileiters in hoher Konzentration (SRIVASTAVA et al. 1996) nachgewiesen. Eine Bedeutung für die an der Ovulation beteiligten Vorgänge wurde daher von CALOGERO et al. (1998) unterstellt. Ferner scheint IL-10 das Überleben und das Wachstum des Fetus zu fördern, wie aus in vitro-Untersuchungen an T-Zellklonen aus der Dezidua von schwangeren Frauen mit ungeklärter Abortursache geschlossen wurde (PICCINNI & ROMAGNANI 1996).

2.2.5.4 Beziehungen von IL-10 zur Corpus luteum-Funktion

Im Serum der Frau wurde keine Zyklus-assoziierte Variabilität der IL-10 Konzentration festgestellt (MASKILL et al. 1997, AL-HARTHI et al. 2000). Leukozyten (FAAS et al. 2000) und NK-Lymphozyten (BOUMAN et al. 2001) aus der Luteal- und Follikelphase, die aus dem peripheren Blut der Frau gewonnen wurden, zeigten keinen Unterschied in der Produktion von IL-10.

Unter Kokultivierung mit mononukleären Blutzellen war die Produktion von IL-10 in der Lutealzellkultur, sowohl bei der ingraviden als auch bei der graviden Frau, signifikant erhöht (HASHII et al. 1998). Dieser Anstieg der Zytokinproduktion wurde nicht beobachtet, wenn Lutealzellen und mononukleäre Zellen durch Einfügen einer Interzellschicht getrennt wurden, obgleich die Progesteronproduktion davon unbeeinflusst blieb. Dies deutet darauf hin, dass eine Zell-Zell-Interaktion für die immunologische Aktivierung und Produktion von IL-10 essentiell ist. Ferner konnte in diesem System ein Anstieg der Progesteronsynthese unter der Wirkung von IL-10 beobachtet werden.

2.2.6 Interleukin-12 (IL-12)

2.2.6.1 Allgemeine Bedeutung von IL-12 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

Biologisch aktives IL-12 kommt als 70 kD-Heterodimer vor, das aus 2 Polypeptidketten (p35- und p40-Untereinheit) besteht, die über 2 Disulfidbrücken verbunden sind und auf separaten Genen kodiert werden. Während die 35 kD Untereinheit konstitutive Eigenschaften besitzt und ubiquitär vorkommt, wird die 40 kD Untereinheit nur von Makrophagen und B-Zellen exprimiert und als regulatorische Komponente der IL-12 Expression betrachtet.

Die Induktion der IL-12 p40 mRNA ist ein allgemeines Merkmal von Virusinfektionen, die mit einer starken Produktion von IgG einhergehen (COUTELIER et al. 1995). Auch Bakterienantigene induzieren die p40 mRNA über Interaktion mit dem Oberflächenmolekül CD40 auf Makrophagen (KATO et al. 1997). Andererseits kann eine übermäßige Induktion der p40 Untereinheit die Wirkung des IL-12 Heterodimers herabsetzen und auch die Synthese von IFN- γ hemmen. Diese Ergebnisse deuten auf eine regulatorische Funktion der Untereinheit IL-12 p40 hin (MATTNER et al. 1993).

IL-12 moduliert u.a. die Zytokinproduktion von aktivierten CD4-positiven T-Zellen und NK-Zellen, indem es selektiv die Sekretion von IFN γ induziert und verstärkt (TRINCHIERI 1993). Es stellt somit einen obligatorischen Faktor für die Generierung und Differenzierung der Th1-Population dar (MANETTI et al. 1993). Die Produktion von IL-12 wird durch IL-10 gehemmt, - zum einen über den T-Zell-abhängigen Signalweg (Interaktion mit dem CD40 Ligand) und zum anderen über den T-Zell-unabhängigen IFN- γ /LPS-induzierten Signalweg (TAKENAKA et al. 1997).

IL-12 konnte das Wachstum und die Reifung hämatopoetischer Zellen beeinflussen (JAKBOSEN et al. 1993) und besitzt die Fähigkeit, die Regression von Tumoren einzuleiten (BRUNDA et al. 1993).

Die cDNA von caninem IL-12 p35/p40 wurde von BÜTTNER et al. (1998) kloniert und sequenziert. Die cDNA der p40-Untereinheit ist 1015 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 329 Aminosäuren kodiert; diejenige der p35 Untereinheit ist 669 Basenpaare lang und kodiert 222 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz von caninem IL-12 p35/p40 weist eine Homologie von >81% zu der von Mensch, Schwein und Rind auf.

Der IL-12 Rezeptor setzt sich aus einer β 1- und β 2-Kette zusammen, wobei die β 1-Kette nur von Th1-Lymphozyten exprimiert wird, die β 2-Kette dagegen von Th1- und Th2-Lymphozyten. Beide Rezeptoruntereinheiten sind nahe verwandt mit der gp130-Untereinheit des IL-6 Rezeptors. Der IL-12 R β 2 scheint die Signaltransduktion durch die Aktivierung spezifischer Mitglieder der STAT-Familie (insbesondere STAT4) zu initiieren (Übersicht bei KONDO et al. 2001).

Im Hinblick auf das Reproduktionsgeschehen wurde gezeigt, dass bei der Frau die Konzentration von IL-12 in der Follikelflüssigkeit von unreifen Follikeln signifikant höher ist als in präovulatorischen Follikeln (COSKUN et al. 1998). In der Zellkultur reifer humaner Granulosazellen hatte hCG keine Wirkung auf die Produktion von IL-12. Bei Frauen, in deren Follikelflüssigkeit IL-12 nachgewiesen wurde, war die Fertilisierungsrate erniedrigt (GAZVANI et al. 2000). Bei an Endometriose erkrankten Frauen waren im Vergleich zu klinisch gesunden Frauen die Konzentration von freiem p40 in der Peritonealflüssigkeit erhöht (MAZZEO et al. 1998). Im in vitro-Ansatz wurde der zytotoxische Effekt von mit IL-12 vorbehandelten NK-Zellen auf Zellen des Endometriums aufgehoben, wenn die IL-12 p40-Untereinheit dem Kulturmedium zugegeben wurde. Des Weiteren wurde auch eine Hemmung der Expression des IL-12 R β 1 und der Phosphorylierung des STAT4-Proteins beobachtet.

2.2.6.2 Beziehungen von IL-12 zur Corpus luteum-Funktion

In der Literatur finden sich keine Angaben zum Vorkommen und zur Wirkungsweise von IL-12 im CL.

Lediglich BOUMAN et al. (2001) zeigten in einer in vitro-Studie, dass sich der prozentuale Anteil von IL-12 produzierenden und mit Endotoxin stimulierten Monozyten aus dem Blut von Frauen, die einen physiologischen Zyklusverlauf zeigten, nicht zwischen der Luteal- und der Follikelphase unterscheidet.

2.2.7 Tumor-Nekrose-Factor-alpha (TNF- α)

2.2.7.1 Allgemeine Bedeutung von TNF- α im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

TNF- α wird in erster Linie von aktivierten Makrophagen als ca. 17 kD schweres Polypeptid produziert und zirkuliert als 51 kD stabiles Homotrimer, welches an den Rezeptor bindet. TNF- α wird außer von Makrophagen bzw. Monozyten auch von antigenstimulierten T-Lymphozyten, aktivierten NK-Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten gebildet. TNF- α stimuliert Monozyten zur Produktion von IL-1, IL-6, Chemokinen und TNF- α selbst, wobei die biologischen Wirkungen von TNF- α noch durch IFN- γ verstärkt werden können. Als starkes proinflammatorisches Zytokin führt es zu Effekten wie Tumornekrose, Entzündung, Kachexie, Endotoxinschock und Hemmung der Proliferation und Differenzierung sowie Förderung der Apoptose von Zellen (ABBAS et al. 1996).

Die cDNA von caninem TNF- α wurde von ZUCKER et al. (1994) und GILMORE et al. (1996, Genbank, unpubliziert) kloniert und sequenziert. Sie ist 396 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 233 Aminosäuren kodiert. Die Sequenzhomologie zur humanen cDNA beträgt 90 %, diejenige zum Kaninchen 82 % und zur Maus 79 %. Das Protein zeigt eine Homologie von 88 % zur humanen, 83 % zur porcinen, 79 % zur Kaninchen- und 77 % zur murinen Aminosäuresequenz.

Rezeptoren von TNF- α (TNF-RI und TNF-RII) finden sich in zahlreichen Geweben, wobei der TNF-RI in den nicht-hämatopoetischen Zellen am Häufigsten vorkommt. Viele biologische Effekte von TNF- α - inklusive der Induktion des programmierten Zelltodes - werden über den TNF-RI vermittelt. Komplexe Signalkaskaden führen zur Aktivierung von Caspasen

mit nachfolgender Apoptose (nur über den TNF-RI) oder zur Aktivierung von zwei Transkriptionsfaktoren, NF- κ B und AP-1 (über TNF-RI/II), welche die Induktion von Genen bewirken, mit der Folge, dass die durch TNF- α induzierte Apoptose wieder unterdrückt wird (KUWANO & HARA 2000). IFN- γ kann die TNF- α Rezeptoren aufregulieren (MONTALDO et al. 1994).

In TNF-RI-Knockout Mäusen konnte TNF- α die LH-stimulierte Progesteron- und Östrogenproduktion in der Kultur von ovariellen Zellhomogenisaten im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflussen; es zeigte sich außerdem, dass der Mangel an TNF-RI mit einem frühen Eintritt der Seneszenz und einer herabgesetzten Fertilität verbunden war (ROBY et al. 1999).

FAJARDO et al. (1992) zeigten, dass eine niedrige Dosis von TNF- α die Angiogenese induziert, während hohe Dosen die Angiogenese hemmen. Die TNF- α abhängige Angiogenese wurde durch andere Faktoren, wie z.B. IL-8, VEGF oder bFGF unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und Sp1 vermittelt (YOSHIDA et al. 1997).

Immunoreaktives TNF- α wurde in Granulosazellen von atretischen und antralen Follikeln dargestellt (TERRANOVA 1997, KONDO et al. 1995). Da TNF- α auf heranwachsende Follikel eine hemmende Wirkung besaß, aber auch eine stimulierende Wirkung auf reife präovulatorische Follikel zeigte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das aus dem dominanten Follikel stammende TNF- α zur Unterdrückung der Reifung nichtdominanter Follikel führen könnte. TNF- α hemmte in vitro die FSH-induzierte Differenzierung von Granulosazellen der Ratte: die Progesteronsynthese und die Induktion des LH-Rezeptors wurden drastisch reduziert, ohne dass dabei die Zellzahl oder die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wurden (DARBON et al. 1989).

2.2.7.2 Beziehungen von TNF- α zur Corpus luteum-Funktion

***In vivo*-Untersuchungen:**

Der Verlauf der TNF- α -Konzentration im Blutplasma der Frau zeigte keine Unterschiede zwischen der Follikel- und der Lutealphase (AL-HARTHI et al. 2000).

Eine luteolytische Wirkung für TNF- α ergab sich aus Untersuchungen von ENDO & KANAYAMA (1997), die dieses Zytokin pseudograviden Kaninchen intraovariell verabreichten und einen Tag später einen markanten Abfall der Progesteronwerte im Blut beobachteten; zwei Tage später hatten sich die Werte jedoch wieder denen der Kontrollgruppe angeglichen. Möglicherweise steht diese Beobachtung in Zusammenhang mit Befunden von NARIAI et al.

(1995), die nach ebenfalls intraovariellen Injektionen von TNF- α beim Kaninchen eine Regression von lutealen Blutgefäßen aufzeigen konnten, die sich in Strikturen, Obstruktionen und einer rauhen Oberfläche der Gefäße manifestierte.

In vitro-Untersuchungen an mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom Zyklus:

Der offensichtliche Einfluss körpereigener Sexualhormone auf die TNF- α -Produktion von Monozyten ergab sich aus Untersuchungen von BOUMAN et al. (2001), die im in vitro-System nach Stimulation mit Endotoxin bei Monozyten aus der Lutealphase eine höhere Stimulation beobachteten als bei solchen aus der Follikelphase. Auch eine Inkubation mit physiologischen Progesteron- und Östrogenkonzentrationen erhöhte die Expression der mRNA von TNF- α in mit Endotoxin stimulierten Monozyten (LOY et al. 1992).

Expression der mRNA von TNF- α :

Untersuchungen beim Mensch:

Die mRNA-Expression von TNF- α wurde durch Northern Blot Analyse in Granulosaluteinzellen nachgewiesen (LOY et al. 1992).

Untersuchungen beim Rind:

Die Expression der mRNA von TNF- α wurde im CL während der physiologischen und der PGF_{2 α} -induzierten Luteolyse nachgewiesen (PENNY et al. 1999). Eine quantitative Analyse zeigte jedoch keine Abhängigkeit vom Zyklusstand (PETROFF et al. 1999; SAKUMOTO et al. 2000b).

Untersuchungen beim Schaf:

Mittels in situ-Hybridisierung konnte im CL die mRNA in einer kleinen Population residenter mononukleärer Zellen lokalisiert werden; es ergaben sich jedoch keine signifikanten Zeitabhängigkeiten zur Luteolyse. Allerdings stieg die Aktivität von TNF- α im Bioassay (kolorimetrische Messung der Zytotoxizität von TNF- α in Überständen aus homogenisiertem Lutealgewebe zu einer murinen Fibrosarkomzelllinie, Wehi 164) im Verlauf der PGF_{2 α} -induzierten Luteolyse synchron mit abfallenden Progesteronkonzentrationen im Serum an (JI et al. 1991).

Untersuchungen beim Schwein:

Im CL vom Schwein wurde die mRNA von TNF- α in großen Lutealzellen, die aus einer Kultur durch Aspiration mit Mikropipetten gewonnen worden waren, mittels RT-PCR nachgewiesen (WUTTKE et al. 1993).

Untersuchungen beim Nager:

Bei der Maus fand man im CL mRNA-Hybridisierungssignale von TNF- α in Lutealzellen und makrophagenähnlichen Zellen, aber nur in den Makrophagen wurde immunreaktives TNF- α nachgewiesen (CHEN et al. 1993).

Auch im Ovargewebe der Ratte wurde die mRNA von TNF- α exprimiert (SANCHO-TELLO et al. 1992).

Proteinexpression von TNF- α :*Untersuchungen bei der Frau:*

Im Überstand von Lutealzellkulturen aus der späten Lutealphase fanden sich höhere TNF- α -Konzentrationen als in solchen aus der frühen Lutealphase (BRÄNNSTRÖM et al. 1999). Dabei war die TNF- α Konzentration in der Gesamtkultur und in der Kultur der großen Lutealzellen höher, als in der Kultur der kleinen Lutealzellen. Ein Zusatz von hCG zeigte keinen Effekt auf die TNF- α -Konzentrationen.

ROBY et al. (1990) konnten immunreaktives TNF- α in großen Granulosaluteinzellen und kleinen Paralutealzellen nachweisen. Zeitliche Abhängigkeiten zeigten sich in Untersuchungen von KONDO et al. (1995), die im CL ein starkes immunhistologisches Signal von TNF- α besonders während der mittleren Lutealphase (in Granulosa- und Thekaluteinzellen) nachweisen konnten, während das Signal im sich rückbildenden CL wieder abnahm. Um den vernarbten Kern des rückgebildeten CL lagen makrophagenähnliche Zellen, die ebenfalls eine sehr intensive Immunreaktion zeigten und die auch im Corpus albicans noch anzutreffen war.

Untersuchungen beim Rind:

Hohe TNF- α -Konzentrationen wurden mittels Bioassay beim Rind am Tag der Ovulation in den Corpora hämorrhagica gemessen; als Quelle wurden zirkulierende Leukozyten identifiziert, die in dieser Phase in das CL einwandern (ZOLTI et al. 1990). TERRANOVA (1997) lokalisierte immunreaktives TNF- α im CL des Rindes in makrophagenähnlichen Zellen und Endothelzellen. In der frühen und mittleren Lutealphase wurde eine sehr niedrige Proteinkonzentration von TNF- α in Extrakten aus dem Lutealgewebe mittels ELISA gemessen; sie stieg in der späten Lutealphase (Tag 13-18) an und fiel nach Einsetzen der lutealen Regression (Tag 19-21) wieder ab (SAKUMOTO et al. 2000b).

Untersuchungen beim Schwein:

HEHNKE-VAGONI et al. (1995) konnten TNF- α im CL vom Schwein - ausgenommen im Stadium der funktionellen Luteolyse - mittels Western Blot nachweisen; immunhistologische

Untersuchungen ergaben positive Signale in den Endothelzellen (NISWENDER & NETT 1988). Diese Beobachtung wurde von ZHAO et al. (1998) dahingehend korrigiert, dass die Hauptquelle von TNF- α im CL vom Schwein vorwiegend lokale Makrophagen sind, die sich in der Nähe von Gefäßwänden befinden. Diese Aussage stützt sich auf immunhistologische Untersuchungen die zeigten, dass die mit einem Makrophagenmarker bzw. einem TNF- α -Antikörper gefärbten Schnitte ein ähnliches Verteilungsmuster aufwiesen. Zum Zeitpunkt der lutealen Regression wurde ein absoluter Anstieg der TNF- α positiven Makrophagenpopulation beobachtet, wobei große Lutealzellen nur ein schwaches TNF- α -positives Signal zeigten. Entsprechend sezernierten Makrophagen 100 mal mehr TNF- α als Endothel- und kleine Lutealzellen. ZHAO et al. (1998) folgerten aus ihren Ergebnissen und denen von HEHNKE-VAGONI et al. (1995), dass Endothelzellen den TNF- α -Rezeptor exprimieren könnten und daher eine Unterscheidung zwischen Rezeptorexpression und sekretorischer Aktivität von TNF- α erfolgen muss.

Untersuchungen beim Nager:

Am Tag 5 (frühe Lutealphase) und den Tagen 17/19 (späte Lutealphase) gewonnene CL des pseudograviden Kaninchens zeigten in Überständen aus der Lutealzellkultur nur eine niedrige Proteinkonzentration an TNF- α , welche jedoch nach Stimulierung mit LPS in der Phase der lutealen Regression (Tag 17/19) um das 10-30fache anstieg (BAGAVANDOSS et al. 1988/1990).

Im CL der Maus wurde immunreaktives TNF- α mittels Immunzytochemie nur in Makrophagen nachgewiesen, wobei das Signal mit zunehmendem Alter des CL intensiver wurde (CHEN et al. 1993).

Untersuchungen im Mikrodialysesystem:

Untersuchungen beim Rind:

Bei Kühen, in deren CL ein Mikrodialysesystem zwischen Tag 12-16 des Zyklus implantiert worden war, konnte im Stadium der spontanen und der PGF_{2 α} induzierten Luteolyse ein signifikanter Anstieg von TNF- α im Dialysat (aber nicht im Serum) beobachtet werden (SHAW & BRITT 1995). Die Autoren folgerten daraus, dass der bei abfallenden Progesteronkonzentrationen stattfindende Anstieg von TNF- α im Zusammenhang mit der Luteolyse steht und dass die luteolytische Wirkung von PGF_{2 α} durch TNF- α vermittelt sein könnte. In das Mikrodialysesystem verbracht, stimulierte TNF- α im CL beim Rind die Freisetzung von Progesteron ausschließlich in der frühen Lutealphase (LIEBERMANN et al. 1996).

Untersuchungen beim Schwein:

Über in CL implantierte Mikrodialysesysteme konnten WUTTKE et al. (1998) weiterführende Erkenntnisse zur funktionellen Steuerung des CL beim Schwein erhalten. In das Dialysesystem eingebrachtes Estradiol stimulierte in der frühen und mittleren Lutealphase die Sekretion von Progesteron, wobei $\text{PGF}_{2\alpha}$ die Estradiolproduktion und damit auch die Progesteronsynthese weiter förderte. In der späten Lutealphase dagegen hatte $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine stimulatorische Wirkung mehr auf die Estradiolsynthese und unter dem Einfluß von intraluteal appliziertem $\text{TNF-}\alpha$ kam es zu einer drastischen Reduktion der Progesteronkonzentration im Dialysat.

Effekte von $\text{TNF-}\alpha$ in der Lutealzellkultur im Hinblick auf die Progesteron- und Östrogensynthese:*Untersuchungen beim Mensch:*

In Granulosaluteinzellkulturen aus Follikel aspiraten der Frau führte $\text{TNF-}\alpha$ zu einem Anstieg von Progesteron ab Tag 4 bis zum letzten Tag (Tag 20) der Kultivierungszeit (YAN et al. 1993). Parallel dazu wurde während der ersten 14 Tage auch die Östrogenproduktion gesteigert, danach fiel die Synthese wieder auf Basalniveau ab. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von FUKUOKA et al. (1992a), die nach Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ eine Hemmung der Östrogensynthese beobachteten; eine gesteigerte Hemmwirkung ergab sich nach gleichzeitiger Zugabe von $\text{IFN-}\gamma$. In der gleichen Untersuchung zeigte sich kein Einfluss von $\text{TNF-}\alpha$ auf die hCG-stimulierte Progesteronsynthese bei der luteinisierten Granulosazellkultur; bei gleichzeitiger Zugabe von $\text{IFN-}\gamma$ oder $\text{IL-1}\beta$ wurde jedoch eine Hemmung der Progesteronsynthese von 81 % bzw. 30 % nachgewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen wie FUKUOKA et al. (1992a) kamen auch WANG et al. (1992).

Die Beobachtung, dass in der luteinisierten humanen Granulosazellkultur die FSH-stimulierte Produktion von cAMP, nicht jedoch die hCG- oder Forskolin-stimulierte Produktion von cAMP durch TNF gehemmt wird, weist darauf hin, dass dieses Zytokin in den untersuchten Systemen in Regelmechanismen eingreift, die proximal des cAMP-Messenger-Systems lokalisiert sind und die Produktion von cAMP nicht direkt beeinflussen (FUKUOKA et al. 1992b).

Untersuchungen beim Rind:

Im in vitro-Ansatz mit Lutealzellen vom Rind, die zwischen den Tagen 9-12 des Zyklus gewonnen wurden, führte der Zusatz von $\text{TNF-}\alpha$ ab dem 7. Tag der Kultivierung zu einer Hemmung der LH-stimulierten Progesteronproduktion; die basale Sekretion von Progesteron

wurde dadurch nicht beeinflusst (BENYO & PATE 1992). Auch SAKUMOTO et al. (2000b) konnten keine Hemmung der basalen Progesteronsekretion boviner Lutealzellen nach Zusatz von TNF- α zum Medium feststellen.

Untersuchungen beim Schwein:

Beim Schwein beobachteten PITZEL et al. (1993) nach Zusatz von TNF- α eine dosisabhängige Hemmung der Progesteronsekretion in der hCG-stimulierten Kultur kleiner Lutealzellen und in der unstimulierten Kultur großer Lutealzellen, eine Beobachtung, die von TEKPETEY et al. (1993) nicht bestätigt werden konnte. Bezüglich der kleinen Lutealzellen kamen RICHARDS & ALMOND (1994a) zu einem ähnlichen Ergebnis wie PITZEL et al. (1993), jedoch blieb in der großen Lutealzell- und der Mischkultur die Progesteronsynthese unbeeinflusst. Die Autoren führen diese unterschiedlichen Ergebnisse auf die Versuchsbedingungen zurück.

Auch die Östrogensekretion wurde durch TNF- α dosisabhängig in der hCG-stimulierten Kultur kleiner Lutealzellen und der nicht-stimulierten Kultur großer Lutealzellen gehemmt (PITZEL et al. 1993). TNF- α steigerte die hemmende Wirkung von PGF_{2 α} und OXT auf die Progesteronsynthese in der Kultur großer Lutealzellen, die stimulierende Wirkung beider Wirkstoffe auf die Östrogensynthese in der Kultur kleiner und großer Lutealzellen wurde durch TNF- α vollständig gehemmt. Diese hemmende Wirkung von TNF- α trat nicht in Anwesenheit von Indomethacin in der LH-stimulierten Kultur kleiner Lutealzellen auf, so dass die Wirkung von TNF- α durch Produkte des Cyclooxygenasemechanismus vermittelt zu sein scheint (RICHARDS & ALMOND 1994a).

TNF- α hemmte in der Kultur von kleinen Lutealzellen die Forskolin-vermittelte, nicht jedoch die cAMP-vermittelte Progesteronproduktion (RICHARDS & ALMOND 1994a, TEKPETEY et al. 1993). Die Autoren folgerten daraus, dass der Effekt auf die LH-stimulierte Progesteronsynthese proximal des cAMP-Messenger-Systems liegt.

Untersuchungen beim Nager:

In der Lutealzellkultur vom Kaninchen wurde die Progesteronproduktion durch TNF- α nicht beeinflusst (CHUDASKA & SCHLEGEL 1993).

In der luteinisierten Granulosazellkultur der Ratte hemmte TNF- α die FSH-stimulierte Progesteronsekretion sowie die Aromataseaktivität (ADASHI et al. 1990).

Bei der Ratte hemmte TNF- α in vitro sowohl die hCG/PRL-induzierte Expression der mRNA des „Steroidogenic Acute Regulatory Protein“ (STAR) als auch die des LH-Rezeptors im CL (CHEN et al. 1999).

Effekte von TNF- α in der Lutealzellkultur im Hinblick auf die Prostaglandinsynthese:*Untersuchungen beim Primaten:*

In der humanen Lutealzellkultur – nicht aber beim Affen (YOUNG et al. 1997) - stieg die Produktion von PGE₂ und PGF_{2 α} innerhalb von 48 Stunden unter dem Einfluß von TNF- α dosisabhängig an (WANG et al. 1992).

Untersuchungen beim Rind:

TNF- α steigerte in der Lutealzellkultur beim Rind dosisabhängig die Sekretion von PGF_{2 α} und 6-keto PGF_{1 α} (BENYO & PATE 1992) bzw. von PGF_{2 α} und PGE₂ (SAKUMOTO et al. 2000a). Die Kombination von TNF- α mit IL-1 β bzw. IFN- γ bewirkte einen zusätzlichen Anstieg der PGF_{2 α} -Produktion, was auf eine synergistische Wirkung dieser Stoffe schließen lässt (BENYO & PATE 1992). Anders als IFN- γ schwächte IFN- α , das selbst keine Wirkung auf die PGF_{2 α} -Synthese aufwies, die durch TNF- α stimulierte PGF_{2 α} -Synthese ab Actinomycin D, ein Inhibitor der RNA-Synthese, und Cycloheximid, ein Inhibitor der Proteinbiosynthese, blockierten komplett die durch TNF- α stimulierte PGF_{2 α} -Produktion (TOWNSON & PATE 1996). Die Zugabe eines Inhibitors der Phospholipase A₂ (PLA₂) hemmte die durch TNF- α -induzierte, - jedoch nicht die basale - PGF_{2 α} -Produktion, während die Zugabe eines Inhibitors der Phospholipase C (PLC) keine Wirkung zeigte. Die Zugabe von Arachidonsäure zum Kulturmedium konnte die inhibitorische Wirkung von Cycloheximid und des PLA₂-Inhibitors nicht beeinflussen. TOWNSON & PATE (1996) folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die durch TNF- α stimulierte PGF_{2 α} -Produktion von der Stimulierung der PLA₂, gefolgt von Mechanismen, welche die Synthese von RNA und Proteinen erfordern, abhängt. SAKUMOTO et al. (2000a) zeigten in der bovinen Lutealzellkultur, dass TNF- α die PGF_{2 α} -Produktion nicht nur über den PLA₂-Regelmechanismus, sondern auch über eine Aktivierung der MAPK stimulierte. SHAW & BRITT (1995) wiesen 36 Stunden nach einer PGF_{2 α} -induzierten Luteolyse hohe Konzentrationen von TNF- α im bovinen CL nach.

Untersuchungen beim Schwein:

Beim Schwein wurde nach Zusatz von TNF- α ein Anstieg von PGF_{2 α} in der Kultur von kleinen Lutealzellen und der Mischkultur, jedoch nicht in der Kultur von großen Lutealzellen beobachtet (RICHARDS & ALMOND 1994a). Nach Zugabe von Indomethacin wurde diese stimulierende Wirkung von TNF- α auf die PGF_{2 α} -Produktion in der Kultur von kleinen Lutealzellen nicht mehr beobachtet, so dass dieser Effekt durch Produkte des Cyclooxygenase-mechanismus vermittelt zu sein scheint.

Untersuchungen beim Nager:

In der Lutealzellkultur beim Kaninchen zeigte TNF- α keinen Einfluss auf die Produktion von PGE₂ und PGF_{2 α} (CHUDASKA & SCHLEGEL 1993).

Zytotoxische Effekte von TNF- α in der Lutealzellkultur:*Untersuchungen beim Mensch:*

MATSUBARA et al. (2000) beobachteten in der Kultur luteinierter Granulosazellen sowohl nach Zusatz von TNF- α als auch nach Zusatz von PGF_{2 α} eine hohe Zahl von Apoptosekörpern; die Autoren verweisen daher auch auf eine mögliche Beteiligung dieser Faktoren an der lutealen Regression. Andere Autoren (FUKUOKA et al. 1992a) konnten allerdings diese Beobachtung nicht bestätigen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können möglicherweise auf die jeweils angewandte Methodik und die unterschiedlich lange Kultivierungsdauer in den Versuchen zurückzuführen sein.

Untersuchungen beim Rind:

In der bovinen Lutealzellkultur zeigte TNF- α keine zytotoxischen Wirkungen (BENYO & PATE 1992). Eine Kombination mit IFN- γ führte allerdings zu einer erheblichen Reduktion der Zellzahl (80 %), so dass die Autoren davon ausgehen, dass beide Zytokine auch in vivo zum programmierten Zelltod während der Luteolyse beitragen. Die Zugabe von TNF- α und IFN- γ zur bovinen Lutealzellkultur führte nach 48 Stunden zu einer ausgeprägten DNA-Fragmentierung (PETROFF et al. 2001). Weder ein Inhibitor der Cyclooxygenase noch ein Inhibitor der Lipoxygenase konnten den durch IFN- γ und TNF- α induzierten Zelltod verhindern. Auch der Zusatz eines PLA₂-Inhibitors und eines NO-Synthase-Inhibitors zeigte keinen hemmenden Effekt auf die zytokininduzierte Abnahme der Zellzahl. In der gleichen Untersuchung stieg jedoch die Zellzahl nach Zugabe der Superoxiddismutase sowie der Katalase deutlich an und nach Zugabe von IFN- α wurde der programmierte Zelltod vollständig gehemmt. PETROFF et al. (2001) schließen daraus, dass reaktive Sauerstoffradikale zum zytokininduzierten programmierten Zelltod beitragen.

Untersuchungen beim Nager:

Wie beim Rind konnten JO et al. (1995) in der Lutealzellkultur der Maus nur in Kombination mit IFN- γ und TNF- α sowie in Kombination mit TNF- α und IL-1 β einen Abfall der Zellzahl beobachten. Die alleinige Behandlung von murinen Lutealzellen mit TNF- α zeigte hingegen keine zytotoxischen Effekte. Auch bei der Ratte wurden keine zytotoxischen Effekte nach Zugabe von TNF- α zur FSH-stimulierten Granulosakultur beobachtet (DARBON et al. 1989).

Das Fas-Antigen ist ein Rezeptor auf der Zelloberfläche, der nach Bindung des Fas-Liganden die Apoptose in sensitiven Zellen induziert. Die Expression der Fas mRNA stieg unter der Wirkung von TNF- α bzw. von IFN- γ um das Zweifache und unter der Kombination von IFN- γ und TNF- α um das 12fache an (QUIRK et al. 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass IFN- γ und die Kombination von IFN- γ und TNF- α an der Aktivierung des Fas-Mechanismus in der Lutealzellkultur der Maus beteiligt sind.

Expression von MHC-Antigenen unter dem Einfluß von TNF- α

TNF- α rief eine verstärkte Expression von MHC Klasse I Antigenen auf der Oberfläche von bovinen Lutealzellen hervor, die am Tag 9-12 des Zyklus durch transvaginale Inzision gewonnen wurden (BENYO & PATE 1992). Die durch IFN- γ hervorgerufenen Induktion von MHC Klasse II Antigenen auf bovinen Lutealzellen konnte durch TNF- α nicht beeinflusst werden (siehe auch Kapitel 2.2.9.2.).

Rezeptorexpression von TNF- α

Untersuchungen beim Rind:

Im CL stieg die Expression der mRNA des TNF-RI bis zum Tag 7 an und fiel bis zum Tag 21 wieder kontinuierlich ab (SAKUMOTO et al. 2000b). Die TNF-RI mRNA wurde in Endothelzellen und steroidproduzierenden Zellen (große und kleine Lutealzellen) des bovinen CL lokalisiert (FRIEDMAN et al. 2000), wobei die Expression während der physiologischen und der durch PGF_{2 α} -induzierten lutealen Regression anstieg und die Expression in den Endothelzellen signifikant stärker war als in Lutealzellen. TNF-RI exprimierende Endothelzellen - aber nicht die steroidproduzierenden Lutealzellen - unterlagen in vitro nach Zugabe von TNF- α dem programmierten Zelltod, der durch Zugabe von Progesteron dosisabhängig gehemmt wurde (FRIEDMAN et al. 2000).

Untersuchungen beim Schwein:

RICHARDS & ALMOND (1994b) untersuchten im CL vom Schwein die Membranbindungskapazität von TNF- α . Dabei zeigte sich in Membranisolaten aus kleinen Lutealzellen und Endothelzellen eine signifikant höhere Bindungsaffinität zu TNF- α als in Membranisolaten der großen Lutealzellen.

Zusammenfassung:

Die mRNA und das Protein von TNF- α wurde bisher im CL von zahlreichen Spezies nachgewiesen (Mensch, Rind, Schaf, Schwein, Kaninchen, Ratte, Maus). Sowohl immunhistologisch als auch mittels in situ-Hybridisierung wurden Granulosalutein- und Thekaluteinzellen (Mensch), große Lutealzellen (Schwein), Lutealzellen (Maus) und Makrophagen (Rind) als Quelle von TNF- α identifiziert.

Beim Rind zeigte sich in CL, in die ein Mikrodialysesystem implantiert worden war, nach Zugabe von TNF- α nur in der frühen Lutealphase ein Anstieg von Progesteron; bei abfallenden Progesteronkonzentrationen zeigte sich ein Anstieg von TNF- α , so dass SHAW & BRITT (1995) daraus folgerten, dass dieses Zytokin in Zusammenhang mit der Luteolyse steht. In ähnlichen Untersuchungen beim Schwein kam es in der späten Lutealphase unter dem Einfluss von intraluteal verabreichtem TNF- α zu einem Abfall von Progesteron im Dialysat.

In der Gonadotropin-stimulierten Lutealzellkultur bei Mensch, Rind, Schwein und Nager scheint TNF- α die Progesteron- und Östrogensynthese zu hemmen. Außerdem kam es unter dem Einfluss von TNF- α in der Lutealzellkultur von Mensch, Rind und Schwein zu einem Anstieg von PGF_{2 α} , wobei die Signaltransduktion beim Rind über die Aktivierung der Phospholipase A₂ und der MAPK vermittelt zu sein scheint. Weiterhin zeigte sich in der Zellkultur, dass TNF- α sowohl proliferative als auch antiproliferative Eigenschaften auf Lutealzellen besitzt. In der Lutealzellkultur von Rind und Maus kam es ausschließlich unter der Kombination von TNF- α , IFN- γ und IL-1 β zu ausgeprägt zytotoxischen Effekten.

2.2.8 Interferon-gamma (IFN- γ)

2.2.8.1 Allgemeine Bedeutung von IFN- γ im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

IFN- γ ist ein homodimeres Glykoprotein, das aus ca. 21-24 kD schweren Untereinheiten besteht. IFN- γ wie auch IL-2 werden von CD4-positiven Lymphozyten der Th1-Subklasse produziert und scheinen die zellvermittelte Immunantwort zu übertragen (LANZAVECCHIA 1993); aber auch NK-Zellen und Makrophagen sezernieren IFN- γ (LE PAGE et al. 2000).

IFN- γ besitzt primär eine antivirale Aktivität, wobei es Makrophagen aktiviert und die Expression von MHC Klasse I und II Molekülen induziert. Ferner führt es zur Differenzierung von B-Zellen mit nachfolgendem Klassenwechsel des Immunglobulintyps, hemmt das Zellwachstum und fördert die Apoptose. Die antigeninduzierte Sekretion von IFN- γ kann durch IL-2 und IL-12 noch verstärkt werden (ABBAS et al. 1996).

Die cDNA von caninem IFN- γ wurde von ZUCKER et al. (1992) kloniert und sequenziert. Sie ist 480 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 146 Aminosäuren kodiert. Die cDNA zeigt eine Homologie von 83 % zur bovinen und ovinen, von 81 % zur porcinen, von 78 % zur humanen, von 66 % zur Ratten- und von 68 % zur Maus-Nukleotidsequenz. Das Protein zeigt eine Homologie von 80 % zur bovinen und ovinen, von 73 % zur porcinen, von 66 % zur humanen, von 45 % zur Ratten-, und von 46 % zur Maus-Aminosäuresequenz.

Die Signaltransduktion beginnt mit der Bindung von IFN- γ an die α -Kette seines Rezeptors. Dies bewirkt nachfolgend die Phosphorylierung der β -Ketten-Untereinheit und die Phosphorylierung von STAT1 Signalproteinen über Aktivierung von JAK1- und JAK2-Kinasen mit anschließender nukleärer Translokation von STAT1 (IHLE & KERR 1995; siehe auch Kapitel 2.2.4.1.). STAT1-Dimere können die Transkription des „Interferon Regulatory Factor-1“ (IRF-1) vermitteln (SIMS et al. 1993), welcher auch in spezifischen Zellen durch TNF- α induzierbar ist und welcher die Transkription der IFN-stimulierten „Response Elements“ in der Promotorregion vermittelt. Die meisten Gene, die synergistisch durch TNF- α und IFN- γ induzierbar sind (FUJITA et al. 1989), enthalten innerhalb ihrer Promotorregion auch den NF- κ B (BOEHM et al. 1997).

In der Leydigzellkultur beim Schwein hemmte IFN- γ die hCG-stimulierte Testosteronbiosynthese (ORAVA et al. 1989). Weiterhin führte es unter Zellkulturbedingungen zur Induktion von MHC I Antigenen auf der Oberfläche von humanen Zellen aus dem Pankreas (CAMPBELL et al. 1986), zur Zytolyse von Inselzellen des Pankreas (RABINOVITCH et al. 1990) und zum Anstieg der Prostaglandinproduktion in der Kultur von im Pankreas ansässigen Makrophagen, Fibroblasten sowie Inselzellen.

IFN- γ wurde im Oviduktsekret beim Menschen nachgewiesen (SRIVASTAVA et al. 1996). In der Granulosazellkultur der Frau wurde die Expression von MHC I und II nach Zugabe von IFN- γ induziert (HILL et al. 1990). Ein IFN- γ positives Signal wurde in präovulatorischen Follikelzellen, die mit der Basallamina assoziiert waren, und im Bereich der Thekazellen der Frau nachgewiesen; niedrige IFN- γ -Konzentrationen wurden auch in der Follikelflüssigkeit von spontan reifenden Follikeln, in der Vena ovarica und im peripheren Blut gemessen (GRASSO et al. 1994).

2.2.8.2 Beziehungen von IFN- γ zur Corpus luteum-Funktion

In vivo-Untersuchungen im Serum und an mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom Zyklus:

Bei der Frau ergaben sich im Plasma keine Unterschiede in der IFN- γ -Konzentration zwischen der Follikel- und Lutealphase (AL-HARTHI et al. 2000). Auch aus dem peripheren Blut gewonnene aktivierte NK-Lymphozyten (BOUMAN et al. 2001) und Gesamtleukozyten (FAAS et al. 2000) zeigten in beiden Phasen keine Unterschiede in der Produktion von IFN- γ .

Expression der mRNA von IFN- γ

Die Expression der mRNA von IFN- γ wurde im Verlauf der Lutealphase sowie während der PGF_{2 α} -induzierten Luteolyse im CL vom Rind nachgewiesen (PETROFF et al. 1999, PENNY et al. 1999). Bei der densitometrischen Auswertung wurde dabei ein Abfall der Expression während des späten Diöstrus und 1 Stunde nach PGF_{2 α} -induzierter Luteolyse beobachtet.

Untersuchungen im Mikrodialysesystem:

In Untersuchungen mit Corpora lutea vom Schwein, die an den Tagen 10-12 post ovulationem für 4 Stunden mit einer niedrigen Dosis (1×10^{-7} M) von rekombinantem humanem IFN- γ „perfundiert“ worden waren, zeigte sich ein Anstieg der Progesteronproduktion (PRAKASH

et al. 1997). In den Kontrollen wurde dagegen ein Abfall beobachtet. PRAKASH et al. (1997) leiteten daraus ab, dass IFN- γ das Signal des jungen Konzeptus darstellen könnte, welches die Lutealfunktion erhalten soll.

Effekte von IFN- γ in der Lutealzellkultur im Hinblick auf die Progesteron- und Östrogensynthese:

Untersuchungen beim Primaten:

In der luteinisierten humanen Granulosazellkultur führte IFN- γ zu einem dosisabhängigen Abfall der hCG-stimulierten Progesteronsekretion; bei gleichzeitiger Zugabe von TNF- α , - nicht aber von IL-1 β - stieg die inhibitorische Wirkung weiter an (FUKUOKA et al. 1992a/b). In den gleichen Untersuchungen hemmte IFN- γ in Kombination mit TNF- α die FSH-stimulierte Estradiolsekretion. Auch WANG et al. (1992) beobachteten in der humanen Lutealzellkultur eine durch IFN- γ ausgelöste, dosisabhängige Hemmung der hCG-stimulierten Progesteronproduktion (> 45 %), die unter Kombination mit TNF- α noch weiter verstärkt wurde. Die inhibitorische Wirkung von IFN- γ auf die Progesteronproduktion wurde durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen IFN- γ komplett neutralisiert. Während diese Ergebnisse auf eine Bedeutung von IFN- γ und TNF- α für die luteale Regression schließen lassen, konnten WANG et al. (1992) keine hemmende Wirkung von IFN- γ auf die Östrogensynthese in der Lutealzellkultur nachweisen.

Anders als beim Menschen konnten YOUNG et al. (1997) in der Lutealzellkultur des Affen keinen Einfluss von IFN- γ auf die Progesteronsynthese beobachten, was auf speziesspezifische Effekte innerhalb der Gruppe der Primaten hinweist.

Untersuchungen beim Rind:

In der bovinen Lutealzellkultur wurde die LH-stimulierte Progesteronsynthese durch IFN- γ gehemmt (FAIRCHILD & PATE 1991). Diese Hemmung kann nicht auf den zunächst auftretenden Anstieg von PGF_{2 α} (s. unten) zurückgeführt werden, da die gleichzeitige Applikation des Cyclooxygenaseblockers Indomethacin die Hemmung der Steroidbiosynthese nicht wieder aufhob.

Untersuchungen beim Nager:

Bei der Ratte wurde die in vitro-Reifung und -Differenzierung von Granulosazellen durch IFN- γ via Hemmung der FSH-stimulierten Progesteron- und Östrogenproduktion sowie der Gonadotropin-induzierten LH/hCG-Rezeptorformation unterbunden (GOROSPE et al. 1988). XIAO & FINDLAY (1992) berichteten, dass die FSH-stimulierte Progesteronproduktion so-

wie die Produktion von 20α -Hydroxypregnenolon in der Granulosazellkultur der Ratte am Tag 1 und 2 durch IFN- γ zunächst gehemmt, aber ab den Tagen 3, 4 und 5 stimuliert wurde.

Effekte von IFN- γ in der Lutealzellkultur im Hinblick auf die Prostaglandinsynthese:

Untersuchungen beim Rind:

In der bovinen Lutealzellkultur zeigte sich nach Inkubation mit IFN- γ innerhalb von 24 Stunden ein Abfall der Produktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ um ca. 50 % (FAIRCHILD & PATE 1991). Mit fortschreitender Kulturdauer stieg jedoch die Synthese beider Prostaglandine wieder um ca. 400 % an; dieser Effekt wurde durch exogene Zugabe von Progesteron gehemmt.

Untersuchungen beim Primaten:

In der Lutealzellkultur des Affen zeigte IFN- γ keine Wirkung auf die Produktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2 (YOUNG et al. 1997).

Zytotoxische Effekte von IFN- γ in der Lutealzellkultur:

Untersuchungen beim Rind:

Die Behandlung in Kultur gehaltener boviner Lutealzellen mit IFN- γ führte zu einem Verlust lebender Zellen. Dieser Effekt wurde durch den Zusatz von TNF- α und/oder IL-1 β verstärkt (BENYO & PATE 1992).

Untersuchungen beim Nager:

Anders als beim Rind führte die Behandlung muriner Lutealzellen mit IFN- γ nicht zu einer Zytolyse, entsprechende Effekte wurden jedoch nach kombinierter Behandlung mit TNF- α und/oder IL-1 β beobachtet (JO et al. 1995).

Auf eine zytotoxische Wirkung weisen auch Untersuchungen von QUIRK et al. (2000), die einen Anstieg der Expression der Fas-mRNA als Ausdruck der Apoptose nach Behandlung von Lutealzellkulturen der Maus mit IFN- γ beobachtet haben; der Zusatz von TNF- α führte zu einem weiteren deutlichen Anstieg. Bei Lutealzellen, die mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid behandelt wurden, stieg die Apoptose nach alleiniger Zugabe von IFN- γ von 34 % auf 62 % und nach kombinierter Zugabe von IFN- γ und TNF- α auf 96 % an, während die alleinige Zugabe von TNF- α keine Wirkung zeigte.

Untersuchungen beim Mensch:

Anders als bei Rind und Nager konnten FUKUOKA et al. (1992a) und WANG et al. (1992) keinen zytotoxischen Effekt von IFN- γ - auch nicht in Kombination mit IL-1 β oder TNF- α - auf luteinisierte humane Granulosazellen beobachten.

Expression von MHC-Antigenen unter der Wirkung von IFN- γ

Bei bovinen Lutealzellen, die zwischen Tag 10-14 des physiologischen Zyklus isoliert wurden, stimulierte der Zusatz von IFN- γ zum Kulturmedium die Expression von MHC I Antigen auf der Zelloberfläche um 25 % und die Expression von MHC II Antigen um 370 % (FAIRCHILD & PATE 1989). Der Zusatz von LH führte zu einer Abschwächung dieses Effektes. IFN- α hemmte in Anwesenheit hoher Progesteronkonzentrationen die durch IFN- γ ausgelöste Expression von MHC II Molekülen auf bovinen Lutealzellen (PATE 1995). Dies belegt, dass beim Rind eine Interaktion zwischen Lutealzellen und dem aus Immunzellen sezerniertem IFN- γ im Zeitraum der einsetzenden Luteolyse stattfindet.

Untersuchungen zur Signaltransduktion von IFN- γ

Die wenigen dazu vorliegenden Angaben gestatten noch keine endgültige Aussage.

Im in vitro-Ansatz mit luteinisierten Granulosazellen der Frau führte IFN- γ zu einem Abfall der FSH- und hCG-stimulierten Produktion von cAMP (FUKUOKA et al. 1992b). IFN- γ beeinträchtigte dabei nicht die Forskolin-stimulierte Produktion von cAMP; auch die Butyryl-2-cAMP-stimulierte Progesteronsekretion wurde durch IFN- γ nicht gehemmt. FUKUOKA et al. (1992b) folgern aus diesen Ergebnissen, dass IFN- γ in Regelmechanismen eingreift, die proximal bzw. distal des cAMP-Messenger-Systems lokalisiert sein müssen.

Untersuchungen an bovinen Lutealzellen zeigten, dass die Expression des „Interferon Regulatory Factor-1“ (IRF-1) nach Zugabe von IFN- γ innerhalb von 2 Stunden anstieg und über einen Zeitraum von 48 Stunden auf diesem erhöhten Niveau verharrte (SUTER et al. 2001). Schlussfolgerungen können daraus allerdings nicht gezogen werden; eine Einbeziehung des „Survival“-Faktors NF- κ B konnte nicht gezeigt werden.

2.2.9 Transforming-Growth-Factor-beta 1 (TGF- β 1)

2.2.9.1 Allgemeine Bedeutung von TGF- β 1 im Immunsystem und Wirkung im Reproduktionssystem

TGF- β 1 ist eines von 5 Isoformen (TGF- β 1-5) der TGF- β Familie und kommt in Säugetierzellen vor. Es liegt als Homodimer mit einer Größe von ca. 25 kD vor und ist strukturell verwandt mit Inhibin (ABBAS et al. 1996).

TGF- β 1 sowie IL-10 gehören zu den die Immunantwort hemmenden Zytokinen. Die Isotypen von TGF- β können die Expression von MHC downregulieren, gewisse Zellfunktionen hemmen, die Apoptose von T-Zellen induzieren, die Immunantwort von einer Th1- in eine Th2-Antwort umwandeln, die Expression des IL-2 Rezeptor γ auf Monozyten und NK-Zellen downregulieren, die IL-10 Produktion von Makrophagen aufregulieren und die durch IL-2, IL-4 und IL-12 induzierte Antwort von zytotoxischen T-Lymphozyten hemmen (MAEDA et al. 1995, HERRMANN & ABDI 1996, NASH et al. 1999). TGF- β 1 verhält sich in seiner Wirkung antagonistisch zu IL-1 β ; so wird die durch IL-1 stimulierte Sekretion von IFN- γ durch TGF- β unterdrückt. Es wird daher als Regulator von IL-1 β in zahlreichen Organen angesehen (DUMONT & KASTNER 1994, PERRELLA et al. 1994).

Die cDNA von caninem TGF- β 1 wurde von MANNING et al. (1995) kloniert und sequenziert. Sie weist eine Homologie von 94 % zur humanen und von 91 % zur murinen Nukleotidsequenz auf. Sie ist 1369 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 390 Aminosäuren kodiert. Das Protein zeigt eine Homologie von 94 % zu humanem und von 92 % zu porcinem TGF- β 1.

Die Signaltransduktion erfolgt über eine heterodimere Formation der TGF- β I und -II Rezeptoren, wobei der TGF- β IIR für die Ligandbindung verantwortlich ist und durch transmembranäre Serin-/Threoninkinasen die Phosphorylierung des TGF- β I Rezeptors bewirkt. Dies führt zur vorübergehenden Assoziation von SMAD 2, -3 und -4, deren Komplex in den Nukleus wandert, an die DNA bindet und die Transkription initiiert (MASSAGUE & WOTTON 2000). Die Expression des TGF- β I Rezeptors kann durch H-ras aufreguliert werden, während der TGF- β II Rezeptor downreguliert wird (ZHAO & BUICK 1995). Die biochemische Aktivität des von TGF- β induzierten hemmenden Signals besteht in einem Abfall der Phosphorylierung von Zielproteinen, der Inaktivierung von den Zellzyklus regulierenden Enzymen und in einer Downregulierung der Transkription (HU & ZUCKERMAN 2001).

Als multifunktionelles und ubiquitäres Zytokin zeigte TGF- β 1 beim Menschen hemmende und fördernde Eigenschaften auf das Wachstum von Tumorzellen in Ovar und Prostata (HURTEAU et al. 1994; BARRACK 1997). Auch über eine Induktion der Angiogenese und Aktivierung von Fibroblasten in neugeborenen Mäusen wurde berichtet (ROBERTS et al. 1986). In der Darmepithelzellkultur der Ratte blockierte TGF- β 1 die Zellproliferation, hauptsächlich über eine Downregulierung der Expression von Cyclinen (KO et al. 1995). Freies TGF- β 1 wurde beim Mensch in hohen Konzentrationen im Seminalplasma, jedoch nicht in Ovidukt-, Follikel- und in Amnionflüssigkeit nachgewiesen (SRIVASTAVA et al. 1996).

2.2.9.2 Beziehungen von TGF- β 1 zur Corpus luteum-Funktion

Beteiligung an der Formation des CL nach der Ovulation:

TGF- β 1 scheint im Ovar hauptsächlich bei der Reifung des Follikels beteiligt zu sein, da es in unterschiedlichen Intensitätsstärken immunhistologisch in kleinen Primärfollikeln, Oozyten sowie in der Theca- und Granulosazellschicht nachgewiesen wurde (CHEGINI & FLANDERS 1992). Es soll aber auch in Kombination mit IL-6 an dem nach der Ovulation einsetzenden Umstrukturierungsprozeß des rupturierten Follikels beteiligt sein (NASH et al. 1999). Verschiedene Autoren haben beobachtet, dass TGF- β 1 die Proliferation und funktionale Differenzierung von Granulosa- zu Granulosaluteinzellen bei der Ratte (ADASHI & RESNICK 1986, ADASHI et al. 1989, FENG et al. 1986, DODSON & SCHOMBERG 1987) und beim Rind (HUTCHINSON et al. 1987) vorantreibt.

Die Wirkung von TGF- β 1 im CL wurde von VINATIER et al. (1995) als dichotom beschrieben, welche sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies bzw. Zyklusphase luteotrop oder luteolytisch darstellen kann, d.h. dass TGF- β 1 in der frühen Lutealphase die CL-Funktion aufrecht erhalten könnte, während es in der späten Lutealphase die Apoptose von Endothel- und Lutealzellen induzieren könnte.

Expression der mRNA von TGF- β :

Bei der Maus wurde eine intensive Expression der mRNA von TGF- β 1 mittels in situ-Hybridisierung im CL, sowie in der äußeren Granulosazellschicht von postantralen Follikeln nachgewiesen (SCHMID et al. 1994).

Proteinexpression von TGF- β :*Untersuchungen beim Mensch:*

Immunhistologisch wurde TGF- β 1 in Oozyten, in der Theka- und Granulosazellschicht sowie in kleinen und großen Lutealzellen nachgewiesen; die Intensität des Signals war in der mittleren Lutealphase am Stärksten ausgeprägt und zeigte in der späten Lutealphase einen Abfall. Ein sehr schwaches Signal wurde auch im Corpus albicans beobachtet (CHEGINI & FLANDERS 1992, CHEGINI & WILLIAMS 1992). Positive Signale ergaben sich auch im ovarialen Stroma sowie in im CL lokalisierten Fibroblasten, Endothel- und glatten Muskelzellen.

Untersuchungen beim Rind:

Die Erfassung der TGF- β -Konzentration im Kulturmedium von bovinen Lutealzellen ergab, dass 80-90 % dem TGF- β 1 Typ angehörte; während der Kultivierungszeit von 7 Tagen erfolgte ein Anstieg (GANGRADE et al. 1993).

Untersuchungen beim Schwein:

Im CL vom Schwein wurde das TGF- β 1-Protein chromatographisch nachgewiesen. Gegenüber Granulosazellen zeigte es eine antiproliferative Wirkung (GANGRADE & MAY 1990).

Untersuchungen beim Nager:

Bei der Maus wurde ein sehr starkes immunhistologisches Signal für TGF- β 1 im CL sowie im interstitiellen Stroma und in Oozyten, - nicht jedoch in der Theca- und Granulosazellschicht von kleinen und mittleren Follikeln – beobachtet. CHRISTOPHER (2000) schließt daraus, dass TGF- β 1 das Follikelwachstum und die Follikeldifferenzierung fördern könnte. Zu dieser Schlussfolgerung kommen auch JUNEJA et al. (1996), die bei gonadotropinbehandelten Mäusen nach intrabursaler Injektion von TGF- β 1 eine erhöhte Anzahl nichtrupturierter Follikel beobachteten.

Im CL der adulten Ratte wurde überwiegend in den großen Lutealzellen ein stark positives immunhistologisches Signal nachgewiesen, wobei sich das Verteilungsmuster im Gewebe unregelmäßig darstellte (TEERDS & DORRINGTON 1992). MATSUYAMA & TAKAHASHI (1995) lokalisierten in der Lutealzellkultur und im Lutealgewebe der Ratte TGF- β 1 in den darin vorkommenden Makrophagen. Dabei zeigten im funktionellen CL von pseudogaviden Ratten viele TGF- β 1 positive Zellen auch ein positives Signal für einen Makrophagenmarker. In der Phase der strukturellen Regression waren ebenfalls zahlreiche Makrophagen im CL ansässig, jedoch zeigte die Mehrzahl zu diesem Zeitpunkt kein positives Signal mehr für TGF- β 1.

Untersuchungen im Mikrodialysesystem:

CL von Rindern, in die ein Mikrodialysesystem implantiert worden war, reagierten mit einer gesteigerten Oxytocinsekretion nach Perfusion mit TGF- β , insbesondere in der frühen Lutealphase (SCHAMS 1992). Im CL aus der mittleren Lutealphase stimulierte TGF- β unabhängig von der Dosis nach einer Perfusionszeit von 30 Minuten die Progesteronsekretion, während sich in der Zellkultur unter dem Einfluss von TGF- β 1 eine dosisabhängige Hemmung der basalen und LH-stimulierten Progesteron- und Oxytocinproduktion zeigte (MIYAMOTO et al. 1992). Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse vermuten die Autoren u.a. in der intakten bzw. fehlenden Zell-Zell-Interaktion im in vivo- bzw. in vitro-Versuch.

Effekte von TGF- β in der Lutealzellkultur:***Untersuchungen beim Mensch:***

In der Granulosaluteinzellkultur der Frau wurde eine signifikante Hemmung der Apoptose durch TGF- β 1 mittels mikrophotographischer Zählung der apoptotischen Zelltrümmer beobachtet (MATSUBARA et al. 2000). In der Granulosaluteinzellkultur von hCG-behandelten Frauen induzierte TGF- β 1 (wie auch TGF- β 2) zeit- und dosisabhängig die mRNA Expression der Inhibin- und Aktivin β B-Untereinheit, jedoch nicht der Inhibin- und Aktivin α - oder β A-Untereinheit, wobei hCG die von TGF- β 1 induzierte Expression der β B-Untereinheit hemmte (ERAMAA & RITVOS 1996).

Untersuchungen beim Schwein:

Beim Schwein wies TGF- β 1 in der Lutealzellkultur eine dosisabhängige Hemmung der Relaxinfreisetzung auf, welche nach Zugabe von das die Relaxinfreisetzung stimulierendem PGE₂ wieder anstieg (TAYLOR & CLARK 1992). In der Thekaluteinzellkultur (Tag 3) wurde unter der Wirkung von TGF- β eine ausgeprägte, dosisabhängige Hemmung der LH-stimulierten Progesteronproduktion nachgewiesen (ENGELHARDT et al. 1992). In der gleichen Untersuchung fiel die Dibutyryl-cAMP-Synthese unter dem Einfluss von TGF- β um 25 % ab, so dass die primäre Wirkung von TGF- β distal des cAMP-Messenger-Systems lokalisiert zu sein scheint.

Untersuchungen beim Nager:

In der Lutealzellkultur der Ratte hemmte TGF- β - ebenso wie Prolaktin – dosisabhängig den Anstieg der 20 α -HSD und damit die Verstoffwechselung von Progesteron (MATSUYAMA et al. 1990). Der hemmende Effekt von Prolaktin auf die Aktivität der 20 α -HSD wurde durch Zugabe eines Anti-TGF β -Antikörpers abgeschwächt. Die Autoren vermuten daher, dass die

luteotrope Wirkung von Prolaktin durch TGF- β vermittelt sein könnte. In der Mischzellkultur aus dem Ovar der Ratte führte der Zusatz von TGF- β 1 zur selektiven Hemmung des durch IL-1 β stimulierten Nitrit-, PGE₂- und Lactatananstieges sowie zur Hemmung des Glucoseverbrauchs (DERMAN et al. 1999).

Expression der TGF- β -Rezeptoren:

Untersuchungen beim Nager:

Die Expression der TGF- β I und - β II Rezeptoren wurde in Theca-, Granulosa- und Lutealzellen von Mäusen gezeigt (JUNEJA et al. 1996).

Im Ovar vom Hamster wurde die mRNA des TGF- β IR und - β IIR nachgewiesen, wobei die Expression beider Rezeptoren bis zum Tag 4 des Zyklus konstant anstieg; der danach beobachtete Abfall setzte noch vor dem LH-Peak ein (ROY 2000). Hypophysenektomierte Hamster zeigten eine Reduktion der Expression der mRNA des TGF- β IIR. Unter der Wirkung von Gonadotropinen (FSH, hCG) und ovariellen Steroiden (Progesteron, Estradiol-17 β) kam es zu einer signifikanten Induktion der TGF- β IR- und - β IIR -mRNA, während 5 α -Dihydrotestosteron nur die Expression der TGF- β IIR mRNA induzierte. Die Induktion der Expression beider Rezeptoren durch Progesteron und Estradiol-17 β wurde durch die Verabreichung von Dexamethason deutlich abgeschwächt, so dass Glukokortikoide für die negative Regulation der TGF- β Rezeptoren verantwortlich sein könnten.

2.2.10 Zusammenfassende Übersicht der Effekte von Zytokinen im CL

In vitro stimulierte IL-1 β speziesunabhängig die Prostaglandinsynthese; auch eine Hemmung der Progesteron- und Östrogensynthese wurde unter der Wirkung von IL-1 β beobachtet, wobei beim Menschen die Kokultivierung von Leukozyten von Bedeutung war. Außerdem wurde die Expression der mRNA von IL-1 β im CL von Mensch und Rind und das Protein im CL von Mensch und Nager nachgewiesen.

Die Expression der mRNA von IL-2 konnte im CL beim Rind nicht nachgewiesen werden; weitere Untersuchungen zur Protein- und mRNA-Expression liegen derzeit nicht vor. Die Ergebnisse von in vitro-Untersuchungen fallen bei den Spezies unterschiedlich aus. Bei Mensch und Schwein wurde unter dem Einfluss von IL-2 eine Hemmung der Progesteronproduktion beobachtet, nicht aber beim Kaninchen. Bei der Ratte wurde sowohl eine hemmende als auch eine stimulierende Wirkung von IL-2 auf die Progesteronproduktion nachgewiesen.

In der Lutealzellkultur aus dem CL gravidier Frauen zeigte sich im Vergleich zu nicht-graviden Frauen eine hohe Produktion von IL-4, wobei IL-4 die Progesteronproduktion stimulierte. HASHII et al. (1998) schließen daraus, dass IL-4 bei der Transformation des CL cyclikum zum CL graviditatis und an der Aufrechterhaltung der CL-Funktion während der Schwangerschaft beteiligt sein könnte.

Sowohl die Protein- als auch die mRNA-Expression von IL-6 wurde bisher nur im CL der graviden Frau und der Ratte nachgewiesen. In vitro-Untersuchungen mit gonadotropinstimulierten Granulosazellen zeigten bei Mensch, Schwein und Ratte einen hemmenden Effekt auf die Progesteronsynthese, wobei beim Mensch unter Kokultivierung mit Makrophagen eine Stimulierung der Progesteronsynthese beobachtet wurde. Eine Hemmung der Östrogensynthese zeigte sich nach Zugabe von IL-6 bei Mensch, Rind und Ratte.

Sowohl die mRNA als auch das Protein von IL-8 wurden in humanen Granulosaluteinzellen exprimiert, wobei deren Expression unter der Stimulation von IL-1 α und TNF- α noch weiter anstieg. Sowohl die basale als auch die durch IL-1 α stimulierte Expression von IL-8 wurde unter der Einwirkung von Progesteron unterdrückt.

In der Lutealzellkultur wurde bei der Frau eine Stimulierung der Progesteronsynthese durch Zugabe von IL-10 beobachtet. Unter Kokultivierung mit mononukleären Zellen kam es zu einem Anstieg der IL-10-Produktion, so dass auch hier der Zell-Zell-Interaktion eine bedeutende Funktion zuzukommen scheint.

Für TNF- α wurde sowohl die mRNA- als auch die Protein-Expression im CL bei Mensch, Rind, Schaf, Schwein, Kaninchen, Ratte und Maus nachgewiesen. Beim Rind zeigte sich in Untersuchungen mit CL, in die ein Mikrodialysesystem implantiert worden war, nach Zugabe von TNF- α in der frühen Lutealphase ein Anstieg von Progesteron, bei abfallenden Progesteronkonzentrationen ein Anstieg von TNF- α . SHAW & BRITT (1995) folgerten daraus, dass dieses Zytokin in Zusammenhang mit der Luteolyse stehen könnte. In ähnlichen Untersuchungen beim Schwein kam es in der späten Lutealphase unter dem Einfluss von intraluteal verabreichtem TNF- α zu einem Abfall von Progesteron im Dialysat. In der Gonadotropin-stimulierten Lutealzellkultur bei Mensch, Rind, Schwein und Nager wurde die Progesteron- und Östrogensynthese durch TNF- α gehemmt. Außerdem kam es unter dem Einfluss von TNF- α in der Lutealzellkultur von Mensch, Rind und Schwein zu einem Anstieg von PGF_{2 α} , wobei die Signaltransduktion beim Rind über die Aktivierung der Phospholipase A₂ und der MAPK vermittelt zu sein scheint. TNF- α zeigte in der Lutealzellkultur sowohl proliferative

als auch antiproliferative Eigenschaften. In der Lutealzellkultur von Rind und Maus führte eine Kombination von TNF- α , IFN- γ und IL-1 β zu ausgeprägten zytotoxischen Effekten.

Die mRNA-Expression von IFN- γ wurde im CL beim Rind nachgewiesen, wobei sich ein Abfall der Expression im späten Diöstrus zeigte. In CL von Schweinen, die in vivo mit IFN- γ perfundiert wurden, zeigte sich ein Anstieg der Progesteronproduktion; PRAKASH et al. (1997) sehen darin ein Signal des jungen Konzeptus zur Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktion. In der Lutealzellkultur ergab sich dagegen nach der Zugabe von IFN- γ ein Abfall der Progesteronproduktion bei Mensch, Rind und Ratte, so dass IFN- γ auch luteolytische Eigenschaften zu haben scheint. Unter dem Einfluss von IFN- γ wurde weiterhin die Östrogensynthese bei Mensch und Rind sowie die Prostaglandinsynthese beim Rind gehemmt. IFN- γ zeigte beim Rind zytotoxische Eigenschaften auf Lutealzellen, bei der Maus nur in Kombination mit TNF- α und/oder IL-1 β ; bei der Frau wurden keine zytotoxischen Wirkungen nachgewiesen. Weiterhin kam es in der bovinen Lutealzellkultur unter dem Einfluss von IFN- γ zu einem ausgeprägten Anstieg der Expression von MHC I und MHC II.

Untersuchungen zur Expression der mRNA von TGF- β 1 im CL liegen bisher nur für die Maus vor. Die Proteinexpression dagegen wurde bei Mensch, Rind, Schwein, Maus und Ratte dargestellt. Beim Rind wurde unter intralutealer Perfusion von TGF- β 1 ein Anstieg der Progesteron- und Oxytozinsekretion im Dialysat beobachtet, während es unter Zellkulturbedingungen zu einem Abfall dieser Hormone kam. Die unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Systemen werden auf die verschiedenen Versuchsbedingungen zurückgeführt. In der Lutealzellkultur beim Schwein wurde nach Zugabe von TGF- β 1 eine Abnahme der Relaxin- und Progesteronsekretion beobachtet.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsdesign

28 Hündinnen unterschiedlicher Rasse und unterschiedlichen Alters wurden im Diöstrus an den Tagen 5, 15, 25, 45 und zwischen Tag 60-80 post ovulationem (p.ov.) ovariohysterektomiert. Die Corpora lutea wurden aus den Ovarien separiert und auf die Expression der Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ und TGF- β 1 mittels RT-PCR in Anlehnung an ein Protokoll von GRÖNE et al. (1999) untersucht; bei positivem Ergebnis schloss sich eine Sequenzierung des Amplikons an.

3.2 Spendertiere

Die 28 geschlechtsgesunden Hündinnen befanden sich im Beobachtungszeitraum entweder in Privatbesitz oder waren der Klinik (10 Beagle-Hündinnen) überstellt worden. Die Zuordnung der einzelnen Tiere zu den definierten Zeitpunkten ist im Folgenden aufgeführt:

Tag 5 p.ov. (5 Tiere):

Marla, Deutscher Schäferhund (DSH) 3 Jahre; Asta (DSH) 7 Jahre; Pila (DSH-Mischling) 1,5 Jahre; Zora 2 (DSH-Mischling) 4 Jahre; Tini (Beagle) 6 Jahre

Tag 15 p.ov. (5 Tiere):

Kim (Beagle) 4 Jahre; Pat 2 (Beagle) 6 Jahre; Fee (Stafford-Mischling) 2,5 Jahre; Rejka (Schäferhund-Husky-Mischling) 2,5 Jahre; Tina (Magyar Vizsla) 18 Monate

Tag 25 p.ov. (5 Tiere):

Daisy (Cocker Spaniel-Mischling) 2,5 Jahre; Luca (Riesenschnauzer-Mischling) 20 Monate; Flo (Beagle) 4 Jahre; Shila (Mischling) 1 Jahr; Lotte (Beagle) 3 Jahre

Tag 35 p.ov. (4 Tiere):

Fox (Beagle) 3,5 Jahre; Maja (Beagle) 3,5 Jahre; Oda (Beagle) 3,5 Jahre; Timba (Bobtail-Schäferhund-Mischling) 11 Monate

Tag 45 p.ov. (4 Tiere):

Gil (DSH-Mischling) 1 Jahr; Sinah (Golden Retriever) 3 Jahre; Luna (Beagle) 3,5 Jahre; Pat (Beagle) 2,5 Jahre

Tag 60-80 p.ov. (5 Tiere):

Franzi (Mischling) 6 Jahre; Shari (Mischling) 4,5 Jahre; Bonny (Jack-Russel-Terrier) 2 Jahre; Luna 2 (Yorkshire Terrier-West Highland White Terrier-Mischling) 1 Jahr; Simba (keine Angaben zu Rasse und Alter; die Ovariohysterektomie wurde von einem niedergelassenen praktischen Tierarzt in Gießen durchgeführt und die Ovarien direkt im Anschluss unter Angabe der letzten Läufigkeitsperiode in die Klinik transferiert)

3.3 Bestimmung des Ovulationszeitpunktes und Gewinnung der Blutproben

CONCANNON et al. (1989) definierten den Tag der Ovulation als den ersten Tag im Verlauf des Östrus, an dem die Progesteronkonzentration im Plasma gleich oder größer 5 ng/ml (15,9 nmol/l) liegt.

Demnach wurden zur Eingrenzung des Ovulationszeitpunktes durch Bestimmung von Progesteron ab Beginn der Läufigkeit regelmäßig im Abstand von 1-2 Tagen Blutproben aus der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena gewonnen. Die in einem NH₄-Heparinhaltigen Probenröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürnberg) aufgefangenen Proben wurden entweder kurzfristig bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt oder direkt zentrifugiert (10 min. bei 1500 g). Nach der Zentrifugation wurde das Plasma mit einer Pasteurpipette abgehebert und in ein Polypropylenröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürnberg) überführt.

3.4 Bestimmung von Progesteron im Blutplasma

Die Bestimmung der Progesteronkonzentration mittels RIA erfolgte nach einem von HOFFMANN et al. (1973) etablierten Verfahren oder mittels eines automatischen Chemilumineszenz Immunoassay-System (ACS 180; Bayer Diagnostics, Fernwald). Bei dem von Bayer Diagnostics entwickelten Verfahren, handelt es sich um einen heterologen, immunometrischen Test. Unmarkiertes Progesteron bindet an einen mit Akridiniumester markierten monoklonalen Maus-Antiprogesteron-Antikörper (MAK), der im Überschuß zugegeben wird. Danach werden die noch freien (unbesetzten) MAK an ein an paramagnetische Partikel kovalent gebundenes Progesteron-Derivat (PMP) gebunden. Anschließend erfolgt eine magnetische Trennung der Progesteron-MAK-Komplexe von den PMP-MAK-Komplexen, wobei die sich aus dem PMP-MAK-Komplex ergebende Lumineszenz gemessen wird (Bayer Diagnostics Kundeninformation).

3.5 Ovariohysterektomie (OHE)

Jede OHE fand in der Zeit zwischen 8⁰⁰ und 12⁰⁰ Uhr statt. Zuvor war die Narkosefähigkeit der Hündin festgestellt worden.

Vor der Operation wurde ein venöser Zugang an der Vena cephalica antebrachii gelegt, über den die Einleitung der Narkose mit Levomethadon (L-Polamivet®, 0,75 mg/kg KGW) und Azepromazin (Vetranquil® 1 %, 0,0375 mg/kg KGW) erfolgte. Anschließend wurde das ventrale Abdomen vom Rippenbogen bis zum Becken geschoren und mit 70 % Alkohol und Skinsept G desinfiziert.

Die Narkoseerhaltung erfolgte nach trachealer Intubation mit Isofluran, Lachgas und Sauerstoff. Während der Operation erfolgte eine Dauertropfinfusion mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (Fa. Sergy Wiessner) zur Vermeidung einer operationsbedingten Dehydrierung.

Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte durch Inzision der Linea alba 3 cm caudal des Nabels bis etwa 2 cm cranial des Schambeins. Die beiden Uterushörner wurden vorgelagert und die Arteria ovarica durch eine Massenligatur sowie eine Durchstichligatur möglichst weit proximal durch ein fettfreies Fenster am Mesovar ligiert. Nach Abklemmen der Uterushornspitze wurde das Ovar abgetrennt, in eine eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung überführt und zur weiteren Bearbeitung ins Labor verbracht. Anschließend wurde das Mesometrium stumpf durchtrennt, eine Darmklemme zur Fixierung der Zervix am kaudalen Ende angelegt und eine Massenligatur gesetzt. Nach dem Absetzen des Uterus wurde die Schleimhaut des Vaginalstumpfes entfernt, das verbleibende Bindegewebe mit Jodtinktur touchiert und einstülpend unter Einbeziehung der Uteringefäße nach Schmieden vernäht. Der Schluß der Laparotomiewunde erfolgte in 4 Schichten (SCHEBITZ & BRASS 1985) mit synthetischem, resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl®).

3.6 Konservierung der Corpora lutea (CL)

Die Corpora lutea (CL) wurden aus den Ovarien separiert und so gut wie möglich vom übrigen Ovargewebe befreit, wobei die Ausbeute im Durchschnitt bei 3-4 CL pro Ovar lag. Am Anfang der Untersuchungen wurden die CL in Tissue Tec® O.C.T (Vogel, Gießen) in einem Methylbutanol-Bad über flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde Tissue Tec® durch RNAlater™ (Ambion Biotechnology GmbH, Wiesbaden) ersetzt- ein wässriges, nicht-toxisches Reagenz, das zelluläre RNA in Gewebe- und Zellproben stabilisiert und RNA in RNAsereichen Geweben schützt.

Dazu wurde die Gewebeprobe (jeweils ein CL mit einem Gewicht von ca. 250 mg) mit RNA-later™ im Verhältnis 1:6 (Masse:Vol) in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der RNA-Isolierung bzw. zur Lagerung bei -80° C wurde das CL wieder aus dem Reagenz genommen.

3.7 RNA-Isolierung

Zur Vermeidung unerwünschter Kontaminationen mit RNasen wurden als vorbeugende Maßnahmen grundsätzlich Handschuhe getragen sowie RNase/DNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße benutzt. Des Weiteren wurde das verwendete Arbeitsmaterial (Glaswaren, Pinzetten, Mörser, Pistill, Kryotommesser) über mindestens 4 Stunden bei 180°C erhitzt oder 20 Minuten bei 120°C autoklaviert [Plastikmaterial, Diethylpyrrokarbonat- (DEPC-) Wasser]. Die Arbeitsflächen wurden vor jedem Arbeitsgang mit 70 % Ethanol und einem RNase-Inhibitor (RNase-Away, Molecular BioProducts, San Diego, USA) behandelt.

In dieser Arbeit wurde die Gesamt-RNA mittels Trizol® (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers isoliert:

3.7.1 Durchführung

a) Vorbehandlung des in Tissue Tec® O.C.T eingebetteten Gewebes (nach GRÖNE et al. 1999):

Zunächst wurde der Innenraum des Kryotoms sorgfältig von eventuell anhaftenden Geweberesten gesäubert und mit Kleenex-Tüchern ausgelegt. Das in O.C.T eingebettete Gewebe wurde auf den Objekthalter aufgeblockt und je nach Größe des CL wurden ca. 15 Kryostatschnitte von 20 µm Dicke angefertigt. Jeder Schnitt wurde separat mit einer Pinzette in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, das 1 ml Trizol® enthielt, überführt und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig geschüttelt.

b) Behandlung des in RNAlater® behandelten Gewebe:

Der feine Dispergierstab des Ultra-Turrax® T-8 (IKA-Werke GmbH, Staufen) wurde vor Gebrauch 4 Stunden bei 180°C erhitzt und in das Gerät eingesetzt. Mörser, Pistill, Pinzette, ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und eine Fasszange wurden in einem Dewargefäß (Isolierschale) mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das mit RNAlater® behandelte Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in einem Mörser zerkleinert, wovon ca.

100 mg in das vorgekühlte und mit 1 ml Trizol® versehene 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels des Ultra-Turrax® T-8 homogenisiert wurde.

Wurden mehrere Proben hintereinander homogenisiert, wurde der Stab des Ultra-Turrax® zunächst in 4 N NaOH, dann in 70 % Ethanol und schließlich in DEPC-Wasser von anhaftenden Geweberesten gereinigt.

Weiteres Vorgehen zur RNA-Isolierung:

Zu den in Trizol® aufgelösten bzw. homogenisierten Proben (Punkte a und b, s.o.) wurden 300 µl eisgekühltes (-20°C) Chloroform (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugegeben. Die Probe wurde danach etwa 15 Sekunden geschüttelt, über 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zur Phasentrennung über 15 Minuten bei 4°C und 11000 x g zentrifugiert.

In der oberen (wässrigen) Phase befindet sich die RNA, die in ein frisches 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde. Der Rest der Probe wurde verworfen.

Zur wässrigen Phase wurden zur weiteren Aufreinigung der RNA erneut 300 µl eisgekühltes Chloroform zugegeben und der Trenn- bzw. Aufreinigungsschritt wiederholt.

Zu der in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführten oberen, wässrigen Phase wurde ein gleicher Volumenanteil (400-600 µl) eisgekühlten Isopropanols (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugegeben. Das Ausfällen der RNA wurde durch Belassung der Proben entweder über 30 Minuten bei -20°C oder über Nacht bei -80°C forciert. Die bei -20°C belassenen Proben wurden direkt im Anschluß, die bei -80°C belassenen Proben nach dem Auftauen bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet jeweils zweimal mit eisgekühltem 75 %igen Ethanol (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) gewaschen, gevortext, 10 Minuten auf Eis gestellt und danach bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet bis es ein glasiges Aussehen angenommen hatte. Danach wurde das Pellet in 50 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) resuspendiert, dem 1 U/µl RNase-Inhibitor (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) zur Unterdrückung der RNase-spezifischen Enzymaktivität zugegeben worden war.

3.8 Bestimmung der RNA-Konzentration und Herstellung einer RNA-Gebrauchsverdünnung

Die Messung erfolgte in einem UV-Spektrophotometer (Eppendorf) bei 260 nm (OD_{260nm} : Faktor 1:40 $\mu\text{g RNA/ml}$). Dazu wurde eine Verdünnung von 1:20 der RNA mit DEPC-Wasser hergestellt und DEPC-Wasser als Leerwert mitgeführt.

Die Bestimmung der Reinheit der RNA erfolgte ebenfalls photometrisch. Dabei sollte als Indikator für nur geringe Verunreinigungen der RNA mit DNA oder Proteinen die „ $\text{Ratio}_{260/280}$ “ zwischen 1,40 bis 2,00 (Optimum 2,00) liegen.

Anhand der gemessenen Konzentration wurde eine Endverdünnung von 100 ng RNA/ μl mit DEPC-Wasser hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die unverdünnte Stammlösung der RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.9 DNase-Behandlung

Eine Behandlung der gewonnenen RNA-Probenlösung mit DNase wurde vor jeder RT-PCR durchgeführt, um eine Amplifikation von eventuell noch in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen und somit ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden.

3.9.1 Durchführung

Pro Probe wurden in ein 0,5 ml PCR-Tube 3,25 μl eines Vorgemisches bestehend aus 1 μl Manganchloridlösung (10 mM; Sigma), 1 μl 10 x PCR-Puffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; aus dem RNA PCR Core Kit von Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt), 1 μl DNase I, RNase-frei (10 U/ μl , Roche Molekular Biochemicals, Mannheim) und 0,25 μl RNase-Inhibitor (40 U/ μl ; MBI Fermentas) einpipettiert. Es folgte die Zugabe von 6,65 μl RNA-Lösung (100 ng/ μl) zu einem Endvolumen von 9,90 μl .

Der Ansatz wurde gemischt und das Tube zur Vermeidung des Anhaftens von Tropfen an der Gefäßwand abzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte im T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen) über 10 Minuten bei 37°C ; die enzymatische Reaktion wurde danach durch Inkubation über 5 Minuten bei 75°C abgestoppt.

Da eine Stabilität der RNA nach der DNase-Behandlung nur über ca. 0,5 - 1 Stunden gewährleistet ist, wurde die RT-PCR direkt im Anschluß daran durchgeführt.

3.10 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die mit DNase behandelte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der „Murinen Reverse Transkriptase“ in cDNA umgewandelt, die später als Matrize (Template) für die Amplifizierung eingesetzt wurde. Als Startprimer wurden unspezifisch bindende Primer (Random Hexamers) eingesetzt.

Zur Durchführung wurden die Reagenzien des RNA PCR Core Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) in Anlehnung an das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll eingesetzt. Dieses Kit beinhaltet u.a. 10 x PCR-Puffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3), Magnesiumchloridlösung (MgCl_2 ; 25 mM), Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP; jeweils 10 mM in bidestilliertem Wasser, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt) von Adenin (dATP), Guanin (dGTP), Cytosin (dCTP) und Thymin (dTTP), Random Hexamers (50 μM), RNase-Inhibitor (20 U/ μl), Murines Leukämie Virus (MuLV) Reverse Transkriptase (50 U/ μl) und AmpliTaq® DNA Polymerase (5 U/ μl) für die RT-PCR und anschließende Amplifikation.

3.10.1 Durchführung

Pro Probe wurden in ein 0,5 ml PCR-Tube 8,5 μl eines Vorgemisches bestehend aus 2 μl Magnesiumchloridlösung (25 mM), 1 μl 10x PCR-Puffer II, jeweils 1 μl dATP, dGTP, dCTP und dTTP (jeweils 10 mM), 0,5 μl Random Hexamers (50 μM), 0,5 μl RNase-Inhibitor (20 U/ μl) und 0,5 μl der MuLV Reverse Transkriptase (50 U/ μl) einpipettiert. Es folgte die Zugabe von 1,5 μl der mit DNase behandelten RNA-Lösung zu einem Endvolumen von 10,0 μl .

Der Ansatz wurde gemischt und das Tube zur Vermeidung des Anhaftens von Tropfen an der Gefäßwand abzentrifugiert. Die Probe wurde danach in den T1 Thermocycler 48 verbracht und nach folgendem Programm behandelt:

8 Minuten bei 21°C zur verbesserten Anbindung der Random Hexamers an die RNA, 15 Minuten bei 42°C zur reversen Transkription, 5 Minuten bei 99°C zur Inaktivierung der MuLV Reverse Transkriptase und weitere 5 Minuten bei 5°C zur Abkühlung des Ansatzes.

Die nach der Reversen Transkription vorliegende cDNA ist stabil und kann bei -20°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert werden.

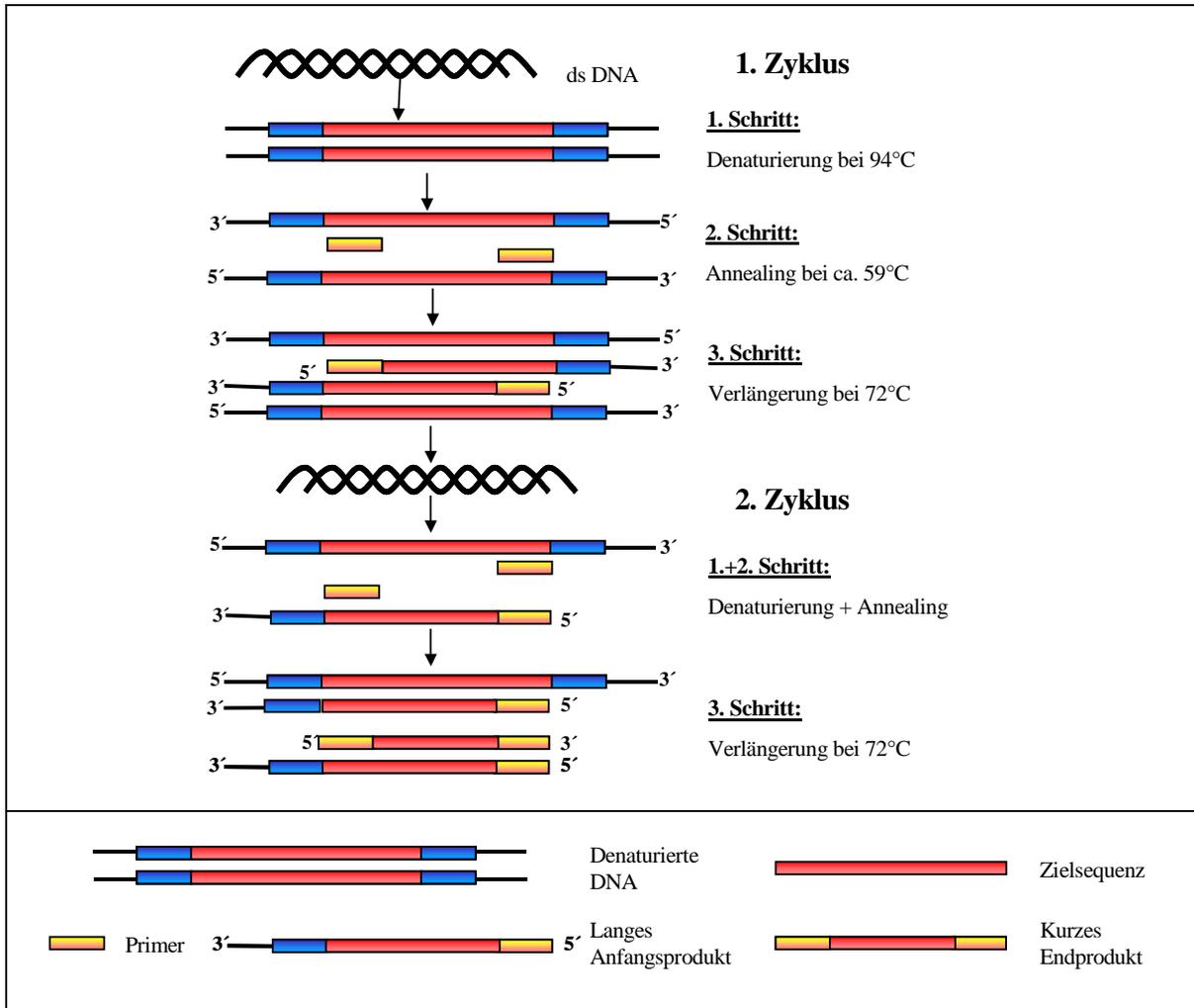
3.11 Amplifikation (PCR)

Die Amplifikation erfolgt in drei zyklischen Schritten (siehe auch Abb. 3, S. 68):

1. Denaturierung doppelsträngiger DNA zu 2 Einzelsträngen bei einer Temperatur von ca. 94° C.
2. Hybridisierung von im Überschuß vorliegenden Oligonukleotiden (Primer) an ihre komplementären Sequenzen bei einer Temperatur von ca. 59°C. Dieser Schritt wird auch als „Annealing“ bezeichnet.
3. Nach Zugabe der DNA-Polymerase, welche die Primer als Startsignale erkennt, kommt es zur komplementären Verlängerung (Elongation) der Einzelstränge zum Doppelstrang durch Baseneinbau (dNTP). Die Elongation findet bei einer Temperatur von 72°C statt und erfolgt dabei immer vom 5'- α -Phosphat des dNTP's in Richtung der endständigen 3'-Hydroxylgruppe des wachsenden DNA-Stranges.

Die gewünschten kurzen Zielsequenzen werden ab dem 4. Zyklus exponentiell amplifiziert, während die langen Anfangsprodukte linear vervielfältigt werden. Die Zyklusschritte 1-3 können 20 bis maximal 40 mal wiederholt werden. Danach sinkt die Ausbeute durch Abnahme sowohl der Enzymmenge als auch der Enzymaktivität und es besteht die Gefahr der Hybridisierung der Stränge untereinander infolge der nun im Überschuß vorliegenden Ziel-DNA.

Abb. 3: Ablauf der PCR-Reaktion



Die zur Durchführung der PCR benötigten Reagenzien sind im Folgenden beschrieben:

Magnesiumchlorid (MgCl₂):

MgCl₂ bildet mit den dNTP's lösliche Komplexe und ermöglicht so ihren Einbau in die DNA. Es stimuliert die Polymeraseaktivität und erhöht die Schmelztemperatur sowohl des DNA-Doppelstranges als auch der Bindung zwischen Primer und Matrize und beeinflusst dadurch die Spezifität und Ausbeute der PCR.

PCR-Puffer:

Die Wahl des PCR-Puffers ist abhängig von der Wahl der DNA-Polymerase; z.B. ist die Verwendung der Taq-Polymerase an eine Lösung aus Kaliumchlorid und Tris-Salzsäure gebunden.

dNTP:

Die 4 Basen (siehe Kapitel 3.10.) sind notwendig zur Verlängerung des DNA-Stranges. Die Nukleotide werden am 3'-Hydroxylende des Primers angehängt.

DNA-Polymerase:

Es sind mittlerweile viele verschiedene Polymerasen im Handel erhältlich, die sich durch ein unterschiedliches Temperaturoptimum oder der Exonukleaseaktivität (hydrolytische Spaltung von Mononukleotiden vom 3'- oder 5'-Ende der RNA oder DNA) unterscheiden. Die Taq-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, das aus dem Bakterium „*Thermus aquaticus*“ in einer Thermalquelle im Yellowstone-Nationalpark/USA isoliert wurde. Das Enzym besitzt ein Temperaturoptimum bei 70-80°C und erreicht eine DNA-Synthesegeschwindigkeit von 35-100 Nukleotiden/Sekunde.

In dieser Arbeit wurde die AmpliTaq® DNA Polymerase (PE, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) verwendet, eine 94 kD schwere DNA-Polymerase, die rekombinant aus einer modifizierten Form von *Thermus aquaticus* hergestellt wurde und dieselben Eigenschaften wie die Taq-Polymerase besitzt.

Optimierung der PCR:

Eine Optimierung der PCR ist notwendig, wenn sich zeigt, dass in der nachfolgenden Gelelektrophorese keine oder unsaubere DNA-Fragmente erhalten werden. Die Ergebnisse der PCR sind in hohem Ausmaß abhängig von der Qualität und Konzentration der vorliegenden

Matrize sowie der Primerkonstellation und Primerkonzentration. Geeignete Möglichkeiten zur Optimierung sind eine Änderung der Temperaturprofile (Heiz- und Abkühlzeiten, Zykluszahl) oder eine Änderung der $MgCl_2$ -, der Matrizen- und der Primerkonzentration.

Auch in dieser Arbeit musste das Protokoll (GRÖNE et al. 1999) optimiert werden, da der T1 Thermocycler 48 im Vergleich zu anderen Geräten eine hohe Aufheizgeschwindigkeit ($2^\circ C/Sekunde$) besitzt und dadurch sowohl die Annealingzeit als auch die Elongationszeit heraufgesetzt werden. Dementsprechend wurde die Annealingtemperatur etwas abgesenkt, so dass alle Zytokine schließlich unter dem gleichen Protokoll amplifiziert werden konnten. Auch die Primer bestimmter Zytokine mussten für die vorgesehene Untersuchung an CL neu ausgewählt werden.

3.11.1 Durchführung der PCR (in Anlehnung an ein Protokoll von GRÖNE et al. 1999)

Pro Probe wurden in ein 0,5 ml PCR-Tube 40 μl eines Vorgemisches bestehend aus 2 μl Magnesiumchloridlösung (25 mM), 4 μl 10x PCR-Puffer II, 1 μl des Primerpaares (15 pmol/ μl), 0,25 μl AmpliTaq® DNA Polymerase (5 U/ μl) und 32,75 μl DEPC-Wasser einpipettiert. Es folgte die Zugabe von 10 μl der bei der reversen Transkriptase gewonnenen cDNA-Lösung zu einem Endvolumen von 50,0 μl .

Die Probe wurde gemischt, zur Vermeidung des Anhaftens von Tropfen an der Gefäßwand des Tubes abzentrifugiert und im T1 Thermocycler 48 der Reihe nach wie folgt inkubiert:

1 Minute bei $94^\circ C$, über 40 Zyklen von jeweils 1 Minute bei $94^\circ C$, über 2 Minuten und 15 Sekunden bei $58,5^\circ C$ und über 1 Minute und 30 Sekunden bei $72^\circ C$.

Zur vollständigen Elongation der DNA-Stränge wurde die Probe abschließend noch 6 Minuten bei $72^\circ C$ inkubiert.

Bei jeder PCR wurde eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle mitgeführt (s. Kap. 3.14).

Die PCR-Produkte können anschließend bei $-20^\circ C$ stabil aufbewahrt werden.

3.11.2 Primer

Primer sind Oligonukleotide, die etwa 15-30 Basen umfassen sollten und als Starthilfe für die Synthese des komplementären Stranges benötigt werden. Sie flankieren den Beginn [„Sense“- (S-) Primer] und das Ende [„Antisense“- (AS-) Primer] der gewünschten Region in der Ziel-DNA und werden als „Primerpaar“ eingesetzt. In jedem Primer sollten alle 4 Basen etwa gleich häufig vertreten sein bzw. der prozentuale G/C-Anteil zwischen 40-60 % betragen. Der Primer sollte nicht komplementär zu sich selbst oder seinem Partner sein, besonders nicht am 3'-Ende, da es sonst zur Bildung von Primerdimeren oder Hairpins kommt, die Artefakte der PCR darstellen. Zudem sollte eine interne Sekundärstruktur und eine längere Abfolge von gleichen Basen in der Primersequenz vermieden werden. Die Primer sollten gereinigt und von höchster chemischer Integrität sein, stets im Überschuß eingesetzt werden und jeder Primer pro Primerpaar in gleicher Konzentration vorliegen.

Zur Konzeption von Primern sind viele Programme (z.B. Genruler®) kommerziell erhältlich, die gleichzeitig auch die Primerqualität hinsichtlich von Dimeren, Hairpins und Sekundärstrukturen anzeigen.

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg. Die dazu notwendigen Vorgaben zur Nukleotidsequenz ergaben sich entweder aus Informationen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Baumgärtner (Institut für Veterinär-Pathologie, Gießen) oder wurden aus der Literatur übernommen. Die einzelnen Primerpaare charakterisierende Angaben sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Primer wurden nach dem Protokoll des Herstellers mit DEPC-Wasser aufgelöst und zu einer Konzentration von jeweils 15 pmol/µl verdünnt. Jeweils ein Aliquot der Primerpaare wurde vorher 1:1 (Vol/Vol) gemischt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer, der Sequenz, Länge des Amplikons und der Herkunft (Spezies: *Canis familiaris* mRNA; herge- stellt von MWG Biotech AG, Ebersberg)

Primer	Sequenz	Länge des Amplikons	Quelle	Accession-Nr. (Genbank)	Position*	MW [g/mol]	T _s [°C]
IL-1β S	5'-GAG GTT CCA ATG TGA AGT GC-3'	291 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	Z70047	Position:9	6191	55,4
IL-1β AS	5'-CCT GTA ACT TGC AGT CCA CC-3'				Position:299	6011	57,5
IL-1β S (2)	5'-TCC AAT GTG AAG TGC TGC TGC-3'	323 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	Z70047	Position:14	6437	59,8
IL-1β AS (2)	5'-TAT GAG TTA GAC AGC ACC AGG-3'				Position:336	6479	57,9
IL-1β S (3)	5'-TGA CCT GTT CTT TGA GGC TGA-3'	428 bp	Barnes et al. (2000)	Z70047	Consensus	6443	57,9
IL-1β AS (3)	5'-AAG CTC ATG GAG AAC ACC ACT-3'					6408	
IL-2 S	5'-TGT CTT GCA TCG CAC TGA CG-3'	201 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	D30710	Position:51	6080	57,5
IL-2 AS	5'-ATT CTG TGG CCT TCT TGG GCG TGT-3'		Zucker et al. (1996)		Position:228	7366	61,3
IL-2 S (2)	5'-AGA TGG AGC AAT TAC TGC TGG-3'	366 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	D30710	Position:132	6510	57,9
IL-2 AS (2)	5'-AAG TCA GTG TTG AGA AGA TGC-3'				Position:497	6543	55,9
IL-4 S	5'-CAC CTC CCA ACT GAT TCC AAC-3'	373 bp	Van der Kaaij et al. (1999)	AF054833	Position: 9	6255	57,6
IL-4 AS	5'-CTT CTG CAT GAT CAC TTT TAG CC-3'				Position:381	6939	56,0
IL-6 S	5'-TCT CCA CAA GCG CCT TCT CC-3'	318 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	U12234	Position:68	5949	61,4
IL-6 AS	5'-TTC TTG TCA AGC AGG TCT CC-3'				Position:385	6059	57,3
IL-8 S	5'-ACT TCC AAG CTG GCT GTT GC-3'	172 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	D28772	Position:39	6080	57,5
IL-8 AS	5'-GGC CAC TGT CAA TCA CTC TC-3'				Position:210	6011	
IL-10 S	5'-CCT GGG TTG CCA AGC CCT GTC-3'	212 bp	T. Olivry & G. Dean, North Carolina State University	U33843	Position:235	6369	63,4
IL-10 AS	5'-ATG CGC TCT TCA CCT GCT CC-3'				Position:446	5978	59,5

Primer	Sequenz	Länge des Amplikons	Quelle	Accession-Nr. (Genbank)	Position*	MW [g/mol]	T _s [°C]
IL-12 S	5'-CTC AGC AGT TGG TCA TCT CC-3'	588 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	U49100	p40, Position:8	6041	57,5
IL-12 AS	5'-CAC TGC CTT CCT GAC ACT CC-3'						
IL-12 S (2)	5'-CAC CTG CCA TAC CCC TGA AG-3'	398 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	U49100	p40, Position:144	6007	61,4
IL-12 AS (2)	5'-TGA CCC TCT CTG CTG AAA GT-3'						
TNF α S	5'-CCA AGT GAC AAG CCA GTA GC-3'	274 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	Z70046	Position:32	6116	57,5
TNF- α AS	5'-TCT TGA TGG CAG AGA GTA GG-3'						
IFN- γ S	5'-CCA GAT GTA TCG GAC GGT GG-3'	274 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	S41201	Position:76	6191	59,5
IFN- γ AS	5'-TTA TCG CCT TGC GCT GGA CC-3'						
IFN- γ S (2)	5'-GCA AGT AAT CCA GAT GTA TCG-3'	364 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	S41201	Position:67	6454	55,9
IFN- γ AS (2)	5'-CTC GAA ACA GAT TCT GAC TCC-3'						
TGF- β 1 S	5'-TTC CTG CTC ATG GCC AC-3'	393 bp	Prof. Dr. Baumgärtner	L34956	Position:826	5978	59,5
TGF- β 1 AS	5'-GCA GGA GCG CAC GAT CAT GT-3'						

* Angabe der Anlagerungsposition der „S“- bzw. „AS“-Primer in der Gensequenz der Datenbank

MW = Molekulargewicht, T_s = Schmelztemperatur des Primers, S = Sense Primer; AS = Anti-sense Primer

3.12 Agarosegelelektrophorese

Bei der Elektrophorese erfolgt die Auftrennung geladener Teilchen im elektrischen Feld in einem Trägermedium (z.B. Agarose oder Polyacrylamid) nach der Molekülgröße und der Molekülladung. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Durch Variation der Agarosekonzentration im Gel können lineare DNA-Fragmente der Größe 0,1-60 kb separiert werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird von der angelegten Spannung, der Gesamt-Nettoladung des Moleküls, der Größe und Gestalt der DNA-Fragmente, der Porengröße des Trägers, dem pH-Wert, der Temperatur und der Ionenstärke des Puffers bestimmt.

Da DNA aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen im basischen Milieu Polyanionen sind, wandert sie im elektrischen Feld von der Kathode (-) zur Anode (+).

Zur Größenbestimmung und Zuordnung der Nukleinsäurefragmente werden bei der gelelektrophoretischen Auftrennung Größenstandards mitgeführt. Zur Sichtbarmachung der Fragmente wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, das mit den Basen der DNA interkaliert.

3.12.1 Durchführung

Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel. Dazu wurde die Agarose durch zweimaliges Aufkochen in einem Mikrowellengerät (Moulinex, Solingen) in 1x TBE-Puffer, der gleichzeitig auch als Trennpuffer bzw. Laufpuffer diente, gelöst. Für ein kleines Gel in einer horizontalen Mini-Kammer (Höfer®, Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden insgesamt 40 ml, für ein mittleres Gel in der horizontalen Midi-Kammer (Keutz, Labortechnik GmbH, Reiskirchen) wurden 90 ml TBE-Puffer verwendet.

Nach dem Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60°C wurden 0,8 µl (für ein kleines Gel) bzw. 1,9 µl (für ein mittleres Gel) Ethidiumbromid (1 %; Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugesetzt, gemischt und die Kammer nach Einsetzen in die Gießvorrichtung mit dem Gel gefüllt und bis zum Erstarren stehen gelassen.

15 µl PCR-Produkt (Amplikon) wurde nach Zugabe von 1,5 µl Ladepuffer (6x Loading Dye Solution; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und unter parallelem Mitführen von 1,5 µl einer 100 bp DNA Ladder (GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) als Größenstandard, der mit 1,5 µl 6x Loading Dye Solution und 7 µl Wasser versetzt wurde, in die Taschen des Agarosegels gefüllt.

Die DNA wurde bei 125 Volt über 40 Minuten (2301 Macrodrive 1 Powersupply; LKB Bromma, Golden, USA) mit 1x TBE-Puffer als Laufpuffer aufgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit ließ sich am mitgeführten Bromphenolblau und Xylencyanol FF des Ladepuffers abschätzen.

3.12.2 Auswertung der Agarosegele

Die Auswertung der Agarosegele erfolgte im UV-Transluminator Biostep (Biostep GmbH, Jahnsdorf) bei 312 nm aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids, das mit den Basen der DNA interkaliert.

Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Gelkamera und der Bildbearbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01 (Biostep GmbH, Jahnsdorf) sowie Total Lab v1.10 (Biostep GmbH, Jahnsdorf).

3.13 Auswertung der Ergebnisse

Die RNA-Isolierung, RT-PCR und Amplifikation jeder Probe wurde in zwei Versuchsdurchläufen (1. VD, 2. VD) durchgeführt.

Der 1. VD erfasste die Expression bzw. Nichtexpression der Zytokine im Lutealgewebe der Hündinnen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (Tag 5, 15, 25, 35, 45 und 60-80), der 2. VD diente zur Bestätigung der Ergebnisse, die im 1. VD erzielt wurden.

Dabei handelte es sich jeweils um einen qualitativen Nachweis der mRNA im CL.

3.14 Kontrollen

Zur Vermeidung von falsch positiven oder falsch negativen Fehlinterpretationen wurden bei jeder PCR Kontrollen angesetzt.

3.14.1 Positivkontrolle

Um die Eignung der ausgewählten Primer zu bestätigen, wurde RNA aus mit Concanavalin A (Con A) stimulierten Leukozyten vom Hund mitgeführt.

3.14.1.1 Lymphozytenstimulationstest (LTT) zur Gewinnung einer Positivkontrolle

Con A ist ein Lektin, das aus der Schwertbohne (*Concanavalia ensiformis*) gewonnen wird und als Mitogen die Stimulierung humaner, muriner und caniner T-Zellen bewirkt, die daraufhin mit der Produktion eines breiten Spektrums an Zytokinen beginnen (ROITT et al. 1993, GERBER & BROWN 1974). RNA aus mit Con A stimulierten caninen Lymphozyten stellte daher für die vorliegenden Untersuchungen eine ideale Positivkontrolle dar.

Für eine solche Stimulation ist es allerdings notwendig, die mononukleären Zellen von den übrigen Blutbestandteilen so weit wie möglich zu trennen.

3.14.1.1.1 Lymphozytenisolierung mittels einstufiger Perkoll®-Dichtegradientenzentrifugation

Die Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile und damit die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach dem spezifischen Gewicht in einem Perkoll®-Dichtegradienten. Daher befinden sich die Erythrozyten und Neutrophilen Granulozyten nach der Zentrifugation als Sediment am Boden des Zentrifugenröhrchens, darüber die Perkoll®-Lage, gefolgt von der weißen, trüben Bande der mononukleären Zellen, als oberste Schicht bildet das Plasma den Abschluß. GONDOLF (1994) erzielte beim Hund mit einem Perkoll®-Anteil von 57,5 %, welches einer Dichte von 1,072 g/ml entspricht, mit 87,0 % den höchsten Lymphozytenanteil.

Es wurde wie folgt vorgegangen:

50 ml Blut wurden von einem klinikseigenen, klinisch gesunden Beagle-Rüden (Bilbo, 8 Jahre) durch Punktion der Vena cephalica antebrachii gewonnen und in sterilen 10 ml NH₄-Heparinröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme weiterverarbeitet.

Das gewonnene Heparinblut wurde im Verhältnis 1:3 (Vol/Vol) mit steriler „Phosphat Buffered Saline“ (PBS) verdünnt. Perkoll® (Biochrom KG, Berlin; spezifische Dichte 1,124 g/ml) wurde mit sterilem PBS zu einer spezifischen Dichte von 1,072 g/ml verdünnt.

Die Umrechnungsformel nach Angabe des Herstellers für die Dichte lautet:

$$\text{Vol \% Perkoll (1,124 g/ml)} = \frac{D \text{ [g/ml]} - 1,005}{1,19} \times 10^3 \quad (D = \text{gesuchte Dichte})$$

In einem sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) wurden 15 ml des verdünnten Perkolls® vorgelegt und mit 25 ml verdünntem Blut vorsichtig überschichtet. Die Röhrchen wurden bei 800 x g und 15°C über 20 Minuten unter Ausschaltung der Bremsfunktion zentrifugiert (Heraeus MinifugeRF; Heraeus Instruments GmbH, Hanau). Danach wurde der weiße Zellring mit einer sterilen 2 ml Glaspipette abgesaugt und zunächst 2 x mit PBS (400 x g, 4°C, 10 Minuten) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) mit L-Glutamin (PAA, Laboratories GmbH; Linz, Österreich) gewaschen (s.o.) und im gleichen Medium resuspendiert.

3.14.1.1.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung

200 µl der resuspendierten Zellsuspension wurden mit 400 µl 0,36 %iger Trypanblaulösung (Biochrom KG, Berlin) gemischt. Die Gesamtzellzahl und der Prozentsatz der lebenden, nicht angefärbten Zellen sowie der toten, diffus blau gefärbten Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellvitalität ergab sich mit ca. 95 %.

3.14.1.1.3 Stimulationsparameter

Gefriergetrocknetes Con A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) wurde mit RPMI 1640 zu einer Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt. Diese wurde in Aliquoten von 500 µl in sterile 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Zellsuspension wurde auf eine Zellzahl von $3,0 \times 10^6$ Zellen/ml mit Kulturmedium eingestellt. Als Kulturmedium diente dabei RPMI 1640 mit L-Glutamin, dem 10 % fetales Kälberserum (FKS; PAA Laboratories GmbH; Linz, Österreich), 1% Penicillin (Biochrom KG, Berlin; 10000 U/ml) und 1 % Streptomycin (Biochrom KG, Berlin; 10000 µg/ml) zugesetzt worden waren. Zur Stimulation wurde die Zellsuspension ($3,0 \times 10^6$ Zellen/ml; s.o.) mit Con A versetzt, so dass sich eine Konzentration von 5 µg Con A/ml ergab. Jeweils 2 ml dieser Zellsuspension wurden pro well in einer sterilen 6-well-Gewebekulturplatte (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

Nach 24-stündiger Kulturdauer wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und über 10 Minuten bei 600 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut über 10 Minuten bei 600 x g abzentrifugiert. Das in PBS resuspendierte Zellpellet wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, nochmals abzentri-

fugiert und nach Entfernen des Überstandes in 1 ml Trizol® durch auf- und abpipettieren suspendiert. Die nachfolgende Isolierung der RNA erfolgte nach dem im Kapitel 3.7.1 beschriebenen Versuchsprotokoll.

3.14.1.2 Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Die Integrität der RNA und die erfolgreiche Amplifikation wurde durch Erfassung der Vielfältigkeit von GAPDH kontrolliert.

GAPDH gehört wie β -Actin, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) oder Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) zu den sogenannten „Housekeeping Genes“ (FOSS et al. 1998, FINKE et al. 1993). Definitionsgemäß sind dies Gene, deren Funktion für alle Zellarten eines Organismus essentiell ist und die daher konstant in jeder Zelle exprimiert werden.

Das Gen von GAPDH katalysiert die Reaktion von GAPDH zu 1,3-Diphosphoglycerat, wird durch verschiedene Metaboliten des Glukose-Metabolismus reguliert und kann durch Insulin in einer Adipozytenzelllinie induziert werden (ERCOLANI et al. 1988).

Die partielle cDNA von caninem GAPDH wurde von GRÖNE et al. (1996) kloniert und sequenziert. Sie ist 191 Basenpaare lang und besitzt einen offenen Leserahmen, der 59 Aminosäuren kodiert.

Der Einsatz von GAPDH als Kontrollgen bei der RT-PCR kann jedoch Probleme bereiten, da beim Menschen Pseudogene beschrieben wurden, deren Amplifizierung zu PCR-Produkten gleicher Länge wie bei der Amplifizierung von cDNA führen (GRÖNE et al. 1999). Obwohl über Pseudogene beim Hund noch nicht berichtet wurde, könnten sie dennoch existieren. Mit einer DNase-Behandlung (s. Kap. 3.9) kann das Auftreten dieser falsch positiven Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit vermieden werden.

Weitere Angaben für die zur Amplifikation der GAPDH verwendeten Primer finden sich in den Tabellen 2a und 2b.

Tabelle 2a: Ausgewählte Primer für GAPDH

Primer	Sequenz	Länge des Amplikons
GAPDH S	5'-GGG GCC ATC CAC AGT CTT CT-3'	229 bp
GAPDH AS	5'-GCC AAG AGG GTC ATC ATC TC-3'	

Tabelle 2b: Herkunft von GAPDH (hergestellt von MWG Biotech AG, Ebersberg)

Primer	Quelle	Accession-Nr. (Genbank)	Spezies, Nukleinsäure, Position*	MW [g/mol]	T _S [°C]
GAPDH S	Gröne et al. (1996)	6983846/ NM_002046	C. fam., mRNA, Position:340, Homo sap., mRNA, Position: 406	6065	59,5
GAPDH AS			C. fam., mRNA, Position:567, Homo sap., mRNA, Position:633	6083	55,4

* Angabe der Anlagerungsposition der „S“- bzw. „AS“-Primer in der Gensequenz der Datenbank

MW = Molekulargewicht, T_S = Schmelztemperatur des Primers, S = Sense Primer; AS = Anti-sense Primer; C. fam. = Canis familiaris ; Homo sap. = Homo sapiens

3.14.2 Negativkontrolle

Aufgrund der inhärenten Sensitivität der Methode und der Gefahr der Kontamination von Substrat und Lösungen mit RNA bzw. DNA sind Negativkontrollen notwendig. Hierzu wurde DEPC-behandeltes Wasser anstelle der RNA auf der Stufe der DNase-Behandlung eingesetzt und dieses bis zur Amplifikation wie die reguläre Probe behandelt.

3.15 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch eine automatisierte Sequenzierungsmethode nach SANGER et al. (1977) über die Firma Qiagen GmbH, Hilden.

Dazu wurden der Firma folgende Unterlagen überlassen:

PCR-Produkte, Sense- und Antisense-Primer sowie Länge des Amplikons.

Aus Kostengründen wurden dabei für jedes Zytokin nur ein bis zwei PCR-Produkte aus Lutealgewebe oder mit Con A stimulierten caninen Lymphozyten untersucht.

Die Auswertung erfolgte mit dem aus dem Internet frei erhältlichen Programm „Chromas-2“.

3.16 Immunhistologische Untersuchungen

Da die Expression der RNA keinen Anhalt liefert, inwiefern eine Expression auf der Ebene der Proteine stattfindet, wurde versucht, die Expression immunhistologisch in Anlehnung an ein Protokoll nach HOFFMANN & BÜTTNER (1998) an paraffineingebetteten Proben zu untersuchen.

Da keine kommerziellen Antikörper gegen Zytokine vom Hund zur Verfügung standen, wurde versucht, mit Antikörpern gegen Zytokine des Menschen bzw. des Schweines zu arbeiten. Aufgrund einer Homologie von 88 % gegen humanes TNF- α und 94 % zu humanem bzw. 92 % gegen porcines TGF- β 1 war mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit erwartet worden, dass ausreichend Kreuzreaktionen zur Markierung caniner Zytokinen auftreten.

Folgende Antikörper wurden ausgetestet:

Rabbit Anti-human Tumor Necrosis Factor- α , polyklonal (DPC Biermann, Bad Nauheim)

Mouse Anti-human Transforming Growth Factor- β , monoklonal (Klon TB21; DPC Biermann, Bad Nauheim)

Rabbit Anti-porcine Transforming Growth Factor- β 1, polyklonal (DPC Biermann, Bad Nauheim)

3.17 Materialien und Geräte

3.17.1 Primer

Alle dazu gemachten Angaben finden sich in Tabelle 1 (s. S.72/73).

3.17.2 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl (Natriumchlorid)	8,00 g
KCl (Kaliumchlorid)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	1,44 g
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	0,24 g

In ca. 800 ml Aqua dest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

Mit aqua dest. ad 1 l

20 min. bei 121°C autoklavieren

Ethanol (75%)

Ethanol reinst (100%)	75 ml
DEPC-Wasser	25 ml

0,5 M EDTA Na₂ • 2 H₂O (Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

EDTA Na ₂ • 2 H ₂ O	37,22 g
Aqua dest.	ca. 160 ml

Mit ca. 4 g NaOH-Plätzchen auf pH 8,0 einstellen (erst dann geht EDTA in Lösung)

Mit aqua dest. ad 200 ml

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (10x) [TBE (10x)]

Tris	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
Aqua dest.	ad 1 l

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (1x) [TBE (1x)]

TBE (10x)	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

DEPC- (Diethylpyrocarbonat-) Wasser (0,1 %)

1 ml DEPC auf 1 l Aqua dest.

12 h bei 37°C unter Rühren inkubieren

20 Minuten bei 121°C autoklavieren

3.17.3 Reagenzien

- Trizol® Reagent (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Chloroform, Rotisolv® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Isopropanol/2-Propanol, Rotipuran® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Ethanol (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- DEPC (Diethylpyrocarbonat; Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- RNAlater (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden)
- MnCl₂ (Manganese chloride, 1 M; Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- DNase I, RNase-frei, 10 U/μl (Roche Molekular Biochemicals, Mannheim)
- RNase-Away (Molecular BioProducts, San Diego, USA)
- RNase Inhibitor, 40 U/μl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- GeneAmp RNA PCR Core Kit® (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
- Tissue-Tek® (O.C.T.) Einbettungsmedium (Vogel, Gießen)
- 2-Methylbutan (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Agarose, ultra Pure, electrophoresis grade (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Ethidiumbromid 1 %, (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Tris, Pufferan® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Borsäure, Pufferan® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- EDTA Na₂ • 2 H₂O (Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat; Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- NaCl (Natriumchlorid; Merck, Darmstadt)

- KCl (Kaliumchlorid; Merck, Darmstadt)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat; Merck, Darmstadt)
- KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat; Merck, Darmstadt)
- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Fetales Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Penicillin, 10000 U/ml; Streptomycin 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Biochrom KG, Berlin)
- Perkoll® 1,124 g/ml (Biochrom KG, Berlin)
- Trypanblau (Biochrom KG, Berlin)
- Concanavalin A (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

3.17.4 Auflistung der Geräte

- ACS 180™ PLUS System (Chiron Diagnostics) mit dazugehörigen Chemicalien
- Ultra-Turrax® T-8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5G (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- Kryotom 2800 Frigocut-E (Reichert-Jung, Nussloch)
- T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen)
- Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg)
- Hoefer® HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit Elektrophoresekammer 7 x 10 cm, Gießkammer und Kamm (Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“ 100 x 150 mm, Gießkammer und Kamm (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)
- 2301 Macrodrive 1 Powersupply (LKB Bromma, Golden, USA)
- UV-Transluminator Biostep (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Bildbearbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Bildbearbeitungssoftware Total Lab v1.10 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Zentrifuge Mikro 22 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Heraeus Minifuge RF (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Heraeus LaminAir HA2448 GS (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Heraeus Brutschrank CO₂-Auto-Zero (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Umkehrmikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- Pipetus Standard Pipettierhilfe (MAGV, Rabenau-Londorf)
- Bunsenbrenner (MAGV, Rabenau-Londorf)

- Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50 (Moulinex, Solingen)
- Vortexer Heidolph REAX control (MAGV, Rabenau-Londorf)
- Eppendorf Reference® variabel 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Tuttnauer Systec Autoklav 3850 ELC (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wetzlar)
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml, steril (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 6-well-Kulturschalen, steril (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- PCR-Tubes, 0,5 ml, ultradünn, RNase-/DNase-/Pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Reaktionsgefäße, 2 ml, RNase-/DNase-/Pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- SafeSeal-Tips® gestopfte Pipettenspitzen; 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Glaspipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml (MAGV, Rabenau-Londorf)

4 ERGEBNISSE

4.1 Progesteronkonzentrationen im Blutplasma

Der Tag der Ovulation wurde nach CONCANNON et al. (1989) als der erste Tag im Verlauf des Östrus definiert, an dem die Progesteronkonzentration im Plasma gleich oder größer 5 ng/ml (15,9 nmol/l) liegt. Wie aus den in Tabelle 3 dargestellten Progesteronwerten hervorgeht, musste dieser Tag dann durch Interpolation festgelegt werden, wenn mehr als ein Tag Abstand zwischen den Blutprobenentnahmen lag.

In Tabelle 3 sind die Progesteronkonzentrationen der Hündinnen zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie an den Tagen 5, 15, 25, 35, 45 und 60-80 aufgeführt. Die Blutproben wurden dazu unmittelbar vor Einleitung der Narkose nach Platzierung des Verweilkatheters entnommen. Bei zwei Hündinnen musste aus zeitlichen Gründen die Narkose sofort eingeleitet werden, so dass auf die Blutentnahme verzichtet wurde (Hündinnen Tina und Shila).

Tabelle 3: Progesteronkonzentrationen (ng/ml) am Tag der Ovariohysterektomie (OHE)

Hündin	Tag der OHE	Progesteronkonzentration [ng/ml]
Pila	Tag 5 p.ov. ¹	50,99
Asta		24,65
Zora 2		47,34
Marla		42,15
Tini		22,41
Pat 2	Tag 15 p.ov. ¹	55,87
Kim		51,25
Fee		55,98
Tina		*
Rejca		51,78
Daisv	Tag 25 p.ov. ¹	9,13
Luca		70,23
Lotte		26,42
Shila		*
Flo		58,67
Fox	Tag 35 p.ov. ¹	33,75
Oda		27,30
Timba		25,76
Maja		33,87
Luna	Tag 45 p.ov. ¹	21,01
Pat		15,73
Sinah		25,7
Gil		29,34
Franzi	Tag 60-80 p.ov. ¹	1,78
Shari		0,32
Bonny		9,67
Luna 2		8,12
Simba		0,86

* keine Probe entnommen (s. auch Tabelle 14 und 15 im Anhang)

¹p.ov. = post ovulationem

4.2 Untersuchungen zur Expression der mRNA mittels RT-PCR

Die Erfassung der Expression der Zytokine in den an den Tagen 5, 15, 25, 35, 45 und 60-80 gewonnenen Corpora lutea erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Versuchsdurchläufen (1. VD, 2. VD) wobei es Ziel des zweiten Versuchsdurchlaufes (2. VD) war, die Wiederholbarkeit der im 1. VD erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen.

Wie in Kap. 3.14 dargelegt, wurden bei allen PCR-Ansätzen negative (Wasser) und positive Kontrollen mitgeführt. Bei allen Versuchen diente die Erfassung von GAPDH im CL als „übergreifende“ Positivkontrolle (s. Kap. 3.14.1.2). Darüber hinausgehend wurde für jedes Zytokin als Positivkontrolle die entsprechende Expression in den mit Con A stimulierten caninen Lymphozyten erfasst (s. Kap. 3.14.1.1).

GAPDH wurde in jeder untersuchten Probe, sowohl in Lutealgewebe als auch in den mit Con A stimulierten Lymphozyten exprimiert. Auch die mRNA der Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ und TGF- β 1 wurde in jedem PCR-Ansatz in den mit Con A stimulierten caninen Lymphozyten exprimiert, so dass dies ein sicherer Anhaltspunkt für den einwandfreien Ablauf der RT-PCR-Reaktion war, auch wenn im Lutealgewebe kein PCR-Produkt nachweisbar war.

4.2.1 Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TNF- α und TGF- β 1

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse für diejenigen Zytokine zusammengefasst, für die weitgehend unabhängig vom Zyklusstand (Tag post ovulationem) in beiden Versuchsdurchläufen positive Ergebnisse erhalten wurden. Es handelte sich dabei um die Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 (s. Tabelle 4 – 9).

Obwohl die angewandte RT-PCR keine quantitativen Aussagen gestattet, lässt sich dennoch feststellen, dass sich die Expression von TNF- α im Vergleich zur Expression von IL-8, IL-10, IL-12 und TGF- β 1 insgesamt etwas schwächer darstellte, beurteilt an der Sichtbarkeit der Banden im Gel unter UV-Licht (s. Kap. 3.12.2). Darüber hinausgehend zeigte sich, dass die Expression von TNF- α am Untersuchungstag 60-80 p. ov. in beiden Versuchsdurchläufen im Vergleich zu den vorausgehenden Untersuchungstagen etwas schwächer auszufallen schien.

Eine Auflistung der Untersuchungsergebnisse in Abhängigkeit vom Untersuchungstag und Versuchsdurchlauf ist in den Tabellen 4 bis 9 aufgeführt.

In den Abbildungen 4 bis 7 sind Gele gezeigt, welche beispielhaft die Expression der Zytokine IL-8, IL-10 und IL-12, TNF- α sowie TGF- β 1 zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten zeigen.

Wie aus den Tabellen 4 bis 9 hervorgeht, ergaben sich nur bei wenigen Proben Unterschiede in den Ergebnissen zwischen dem 1. VD und dem 2. VD.

So wurde TGF- β 1 im Lutealgewebe von Tini am Tag 5 p.ov. im ersten Versuchsdurchlauf nicht exprimiert, während sich im zweiten Versuchsdurchlauf ein starkes PCR-Produkt nachweisen ließ (Tabelle 4).

Im zweiten Versuchsdurchlauf wurde die Expression von IL-10 im Lutealgewebe von Fee am Tag 15 p.ov. nicht nachgewiesen, obwohl es im ersten Versuchsdurchlauf ein stark positives PCR-Produkt ergeben hatte (Tabelle 5).

Nach subjektiven Kriterien erfasst, ergaben sich unterschiedliche Expressionsstärken zwischen dem ersten und zweiten Versuchsdurchlauf am Tag 15 p. ov. für IL-12 bei Rejca und für TNF- α bei Pat 2 und Kim (s. Tabelle 5) sowie bei Daisy und Luca jeweils am Tag 25 p.ov. (Tabelle 6).

Bei der Hündin Franzi konnte die Expression von IL-12 am Tag 60-80 p.ov. im 1. VD nicht dargestellt werden, während im 2. VD eine starke Expression nachgewiesen wurde (Tabelle 9).

Sofern sich Abweichungen zwischen den Hündinnen ergaben, müssen diese als marginal bezeichnet werden. So war z.B. die Expression von IL-8 im Lutealgewebe von Luna 2 (Tag 60-80 p.ov.; Tabelle 9) in beiden Versuchsdurchläufen insgesamt schwächer als bei den anderen Hündinnen bzw. Versuchstagen.

Diese Abweichungen zwischen den Versuchsdurchläufen müssen im Hinblick auf das ansonsten sehr homogene Versuchsergebnis als methoden- und handling-bedingt angesehen werden, wobei eine exakte Definition der Fehlerursache derzeit nicht möglich ist.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen keine Folgerungen zu, ob es sich hier um „echte“ Unterschiede oder methodenbedingte Abweichungen handelt.

Tabelle 4: Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 sowie GAPDH im CL von Hündinnen am *Tag 5* post ovulationem im ersten (1. VD) und zweiten Versuchsdurchlauf (2. VD)

	Pila		Asta		Zora 2		Marla		Tini	
	1. VD	2. VD	1. VD	2. VD	1. VD	2. VD	1. VD	2. VD	1. VD	2. VD
IL-8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
TNF-α	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TGF-β1	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
GAPDH	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

Tabelle 5: Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 sowie GAPDH im CL von Hündinnen am *Tag 15* post ovulationem im ersten (1. VD) und zweiten Versuchsdurchlauf (2. VD)

	Pat 2		Kim		Fee		Tina		Rejca	
	1. VD	2. VD								
IL-8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-10	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++
IL-12	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
TNF-α	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
TGF-β1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
GAPDH	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

Tabelle 6: Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 sowie GAPDH im CL von Hündinnen am **Tag 25** post ovulationem im ersten (1. VD) und zweiten Versuchsdurchlauf (2. VD)

	Daisy		Luca		Lotte		Shila		Flo	
	1. VD	2. VD								
IL-8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
TNF-α	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
TGF-β1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
GAPDH	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

Tabelle 7: Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 sowie GAPDH im CL von Hündinnen am **Tag 35** post ovulationem im ersten (1.VD) und zweiten Versuchsdurchlauf (2. VD)

	Fox		Oda		Timba		Maja	
	1. VD	2. VD						
IL-8	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-10	++	++	++	++	++	++	++	++
IL-12	++	++	++	++	++	++	++	++
TNF-α	+	+	+	+	+	+	+	+
TGF-β1	++	++	++	++	++	++	++	++
GAPDH	++	++	++	++	++	++	++	++

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

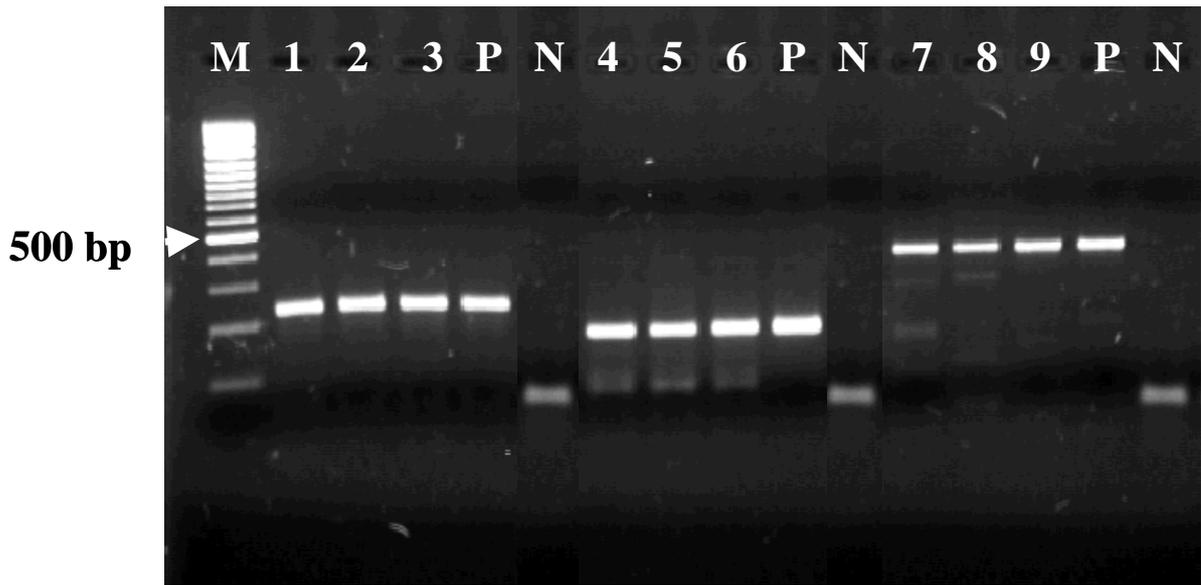


Abb. 4: Amplifikation von GAPDH (Bande 1-3), IL-8 (Bande 4-6) und IL-12 (Bande 7-9):
M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle;
1/4/7 = Hündin *Rejca* (Tag 15 p.ov.); **2/5/8** = Hündin *Franzi* (Tag 60-80 p.ov.;
 2. VD); **3/6/9** = Hündin *Shari* (Tag 60-80 p.ov.)

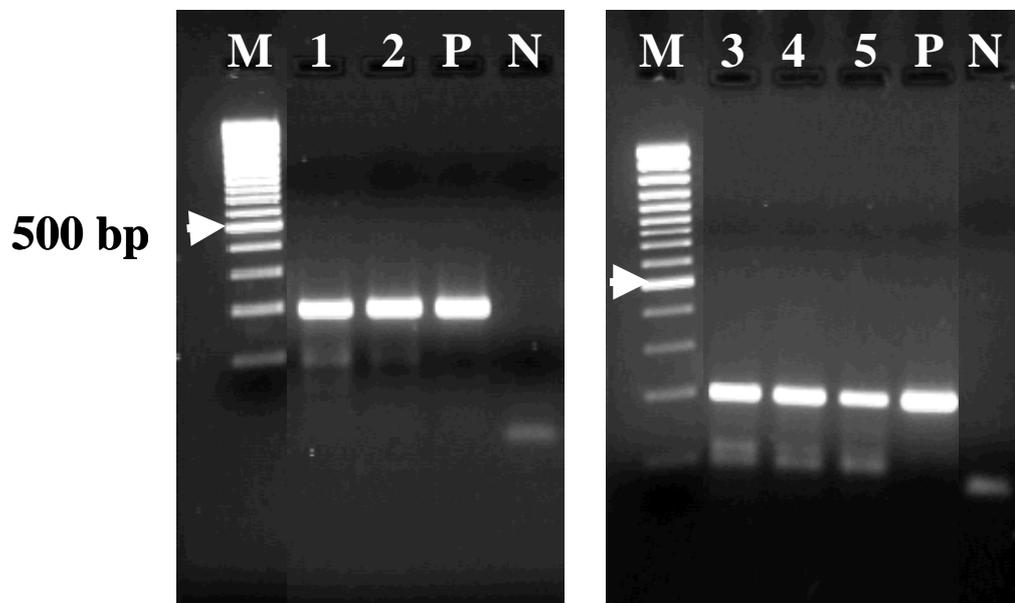


Abb. 5: Amplifikation von IL-10:
M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle;
1 = Hündin *Fee* (Tag15 p.ov.); **2** = Hündin *Tina* (Tag 15 p.ov.); **3** = Hündin
Shila (Tag 25 p.ov.); **4** = Hündin *Shari* (Tag 60-80 p.ov.); **5** = Hündin *Franzi*
 (Tag 60-80 p.ov.)

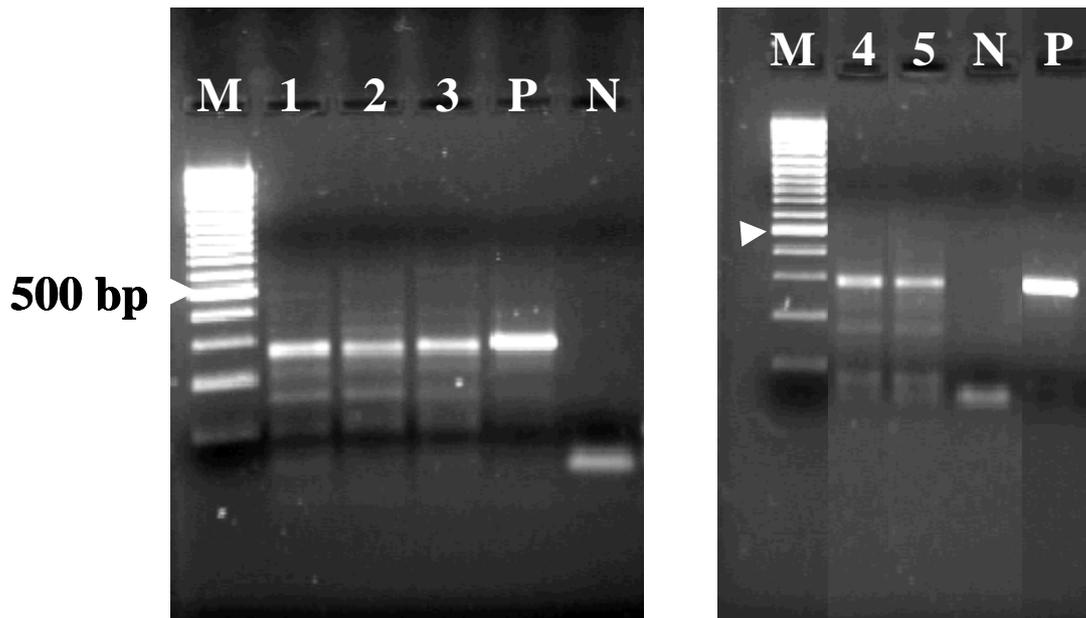


Abb. 6: Amplifikation von TNF- α :
M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle;
1 = Hündin *Rejca* (Tag 15 p.ov.); **2** = Hündin *Franzi* (Tag 60-80 p.ov.); **3** =
Hündin *Shari* (Tag 60-80 p.ov.); **4** = Hündin *Pat 2* (Tag 15 p.ov.); **5** = Hündin
Kim (Tag 15 p.ov.)

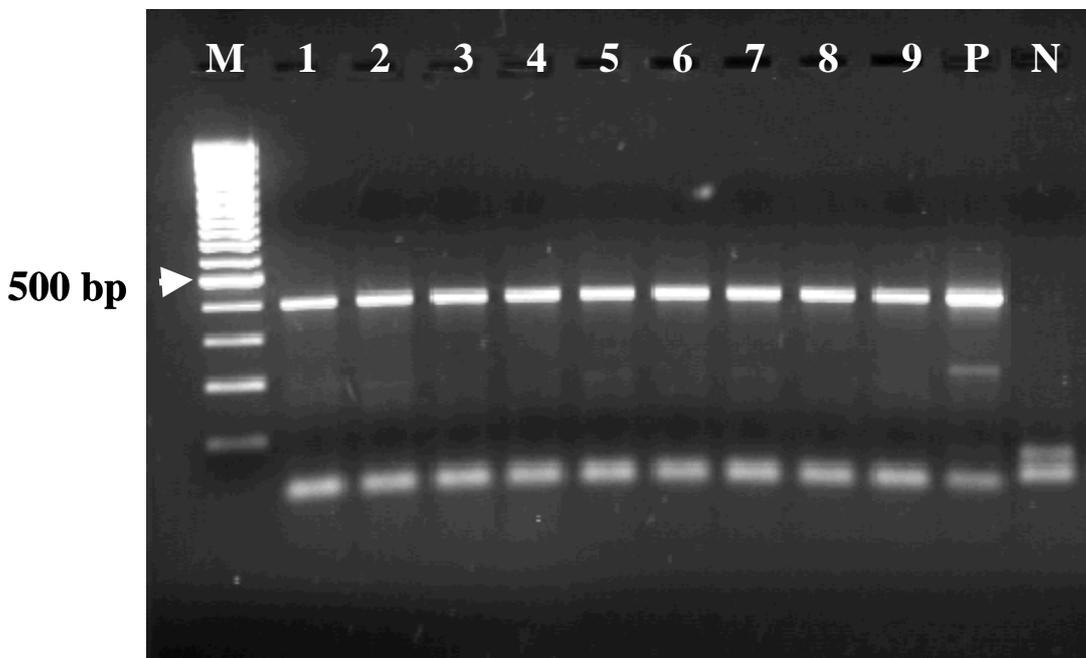


Abb. 7: Amplifikation von TGF- β 1:
M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle
1 = Hündin *Pila* (Tag 5 p.ov.); **2** = Hündin *Asta* (Tag 5 p.ov.); **3** = Hündin *Zo-
ra 2* (Tag 5 p.ov.); **4** = Hündin *Marla* (Tag 5 p.ov.); **5** = Hündin *Pat 2* (Tag 15
p.ov.); **6** = Hündin *Kim* (Tag 15 p.ov.); **7** = Hündin *Fee* (Tag 15 p.ov.);
8 = Hündin *Tina* (Tag 15 p.ov.); **9** = Hündin *Daisy* (Tag 25 p.ov.)

4.2.2 Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-6 und IFN- γ

Die Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-6 und IFN- γ im Lutealgewebe der Hündinnen zu den unterschiedlichen Zykluszeitpunkten sind in Tabelle 10 (S. 99) zusammengefasst. Für beide Zytokine gilt, dass eine Expression nur in wenigen Proben (IL-6: 5 von 38 untersuchten Proben; IFN- γ : 10 von 38 untersuchten Proben) gezeigt werden konnte, wobei positive Ergebnisse überwiegend im 1. VD erhalten wurden, obwohl auch im 2. VD die Positivkontrollen stets das erwartete Ergebnis zeigten. Für die einzelnen Zytokine ergab sich die Situation wie folgt:

IL-6:

Bei fünf Hündinnen ergaben sich zu drei Beobachtungszeitpunkten positive Ergebnisse:

Tag 5 p.ov.	1. VD	Asta	stark positives Signal
Tag 5 p.ov.	1. VD	Pila	schwach positives Signal
Tag 15 p.ov.	1. VD	Pat 2	schwach positives Signal
Tag 15 p.ov.	1. VD	Kim	schwach positives Signal
Tag 35 p.ov.	1. VD	Maja	schwach positives Signal

Diese Ergebnisse konnten im zweiten Versuchsdurchlauf nicht wieder bestätigt werden, wobei die mitgeführten Positivkontrollen in allen Fällen ein deutliches Signal zeigten.

Abbildung 8 zeigt die Gele, die eine Expression von IL-6 erkennen lassen, in Abbildung 9 sind zur Gegenüberstellung die negativen Ergebnisse aus dem 2. VD wiedergegeben.

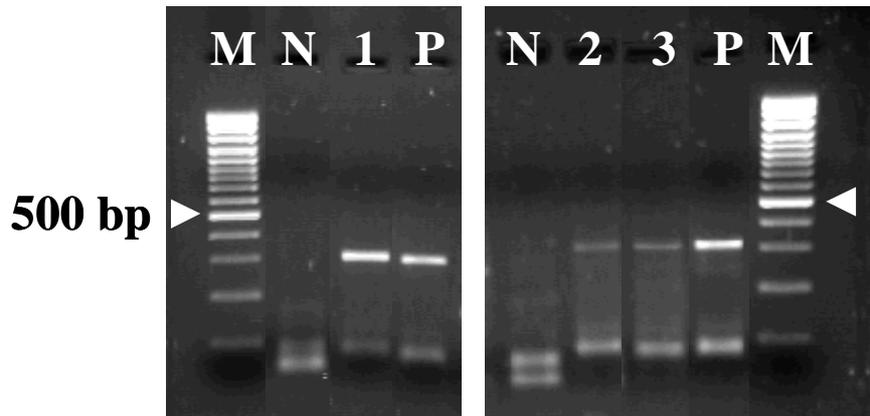


Abb. 8: Amplifikation von IL-6 (1. Versuchsdurchlauf):

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle;
1 = Hündin *Asta* (Tag 5 p.ov.); **2** = Hündin *Pat 2* (Tag 15 p.ov.); **3** = Hündin
Kim (Tag 15 p.ov.);

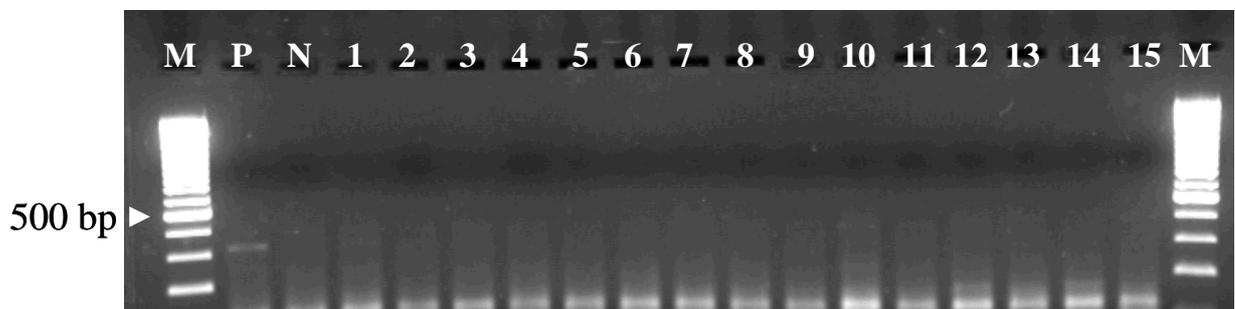


Abb. 9: Amplifikation von IL-6 (2. Versuchsdurchlauf):

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle; **N** = Negativkontrolle
1 = Hündin *Pila* (Tag 5 p. ov.); **2** = Hündin *Asta* (Tag 5 p.ov.); **3** = Hündin *Zo-
ra 2* (Tag 5 p.ov.); **4** = Hündin *Marla* (Tag 5 p.ov.); **5** = Hündin *Pat 2* (Tag 15
p.ov.); **6** = Hündin *Kim* (Tag 15 p.ov.); **7** = Hündin *Fee* (Tag 15 p.ov.);
8 = Hündin *Tina* (Tag 15 p.ov.); **9** = Hündin *Daisy* (Tag 25 p.ov.); **10** = Hün-
din *Luca* (Tag 25 p.ov.); **11** = Hündin *Shila* (Tag 25 p.ov.); **12** = Hündin *Flo*
(Tag 25 p.ov.); **13** = Hündin *Fox* (Tag 35 p.ov.); **14** = Hündin *Oda* (Tag 35
p.ov.); **15** = Hündin *Timba* (Tag 35 p.ov.);

IFN- γ :

Bei zehn Hündinnen ergaben sich zu sechs Beobachtungszeitpunkten positive Ergebnisse:

Tag 5 p.ov.	1. VD	Asta	schwach positives Signal
Tag 15 p.ov.	1. VD	Pat 2	deutlich positives Signal
Tag 25 p.ov.	1. VD	Daisy	stark positives Signal
Tag 25 p.ov.	1. VD	Luca	stark positives Signal
Tag 35 p.ov.	1. VD	Fox	schwach positives Signal
Tag 35 p.ov.	1. VD	Oda	schwach positives Signal
Tag 45 p.ov.	1. VD	Luna	stark positives Signal
Tag 45 p.ov.	1. VD	Pat	stark positives Signal
Tag 45 p.ov.	1. VD	Sinah	stark positives Signal
Tag 60-80 p.ov.	2. VD	Simba	schwach positives Signal

Die im ersten Versuchsdurchlauf bei 9 Tieren erzielten positiven Ergebnisse konnten im zweiten Versuchsdurchlauf nicht bestätigt werden, wobei die mitgeführten Positivkontrollen in allen Fällen ein deutliches Signal zeigten. Lediglich bei einer Hündin (Simba) ergab sich im 2. VD für den Zeitraum von Tag 60-80 p.ov. ein schwach positives PCR-Produkt, während der erste Versuchsdurchlauf negativ verlief.

Abbildung 10 zeigt beispielhaft einige Gele, die eine Expression von IFN- γ erkennen lassen, während in Abbildung 11 ein positives Ergebnis (Simba, 2. VD) drei negativen Ergebnissen aus dem 2. Versuchsdurchlauf gegenübergestellt sind; von diesen negativen Ergebnissen waren zwei (Daisy, Luca) im 1. VD positiv.

Die Gründe für diese auf den ersten Blick nicht übereinstimmenden Ergebnisse können derzeit nur spekulativ vermutet werden.

So könnte die Expression beider Zytokine (IL-6 und IFN- γ) im Lutealgewebe auf einem so niedrigen Niveau ablaufen, dass diese selbst durch die RT-PCR nur schwer erfasst werden kann. Werden dann noch RNA-Verluste durch den Einfrier- und Auftauvorgang bzw. bei der Lagerung unterstellt, erklärt sich das Ergebnis, dass im 2. VD praktisch keine positiven Ergebnisse mehr erzielt wurden.

Dieser These widerspricht nicht, dass in Abhängigkeit von der RNA-Ausbeute und dem Ablauf der PCR in einem Fall (IFN- γ , Hündin Simba) im 1. VD ein negatives und im 2. VD ein positives Ergebnis erzielt wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen also keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Expression der mRNA von IL-6 und IFN- γ zu; allenfalls kann von Hinweisen gesprochen werden, dass eine solche auf „niedrigem Niveau“ stattfindet.

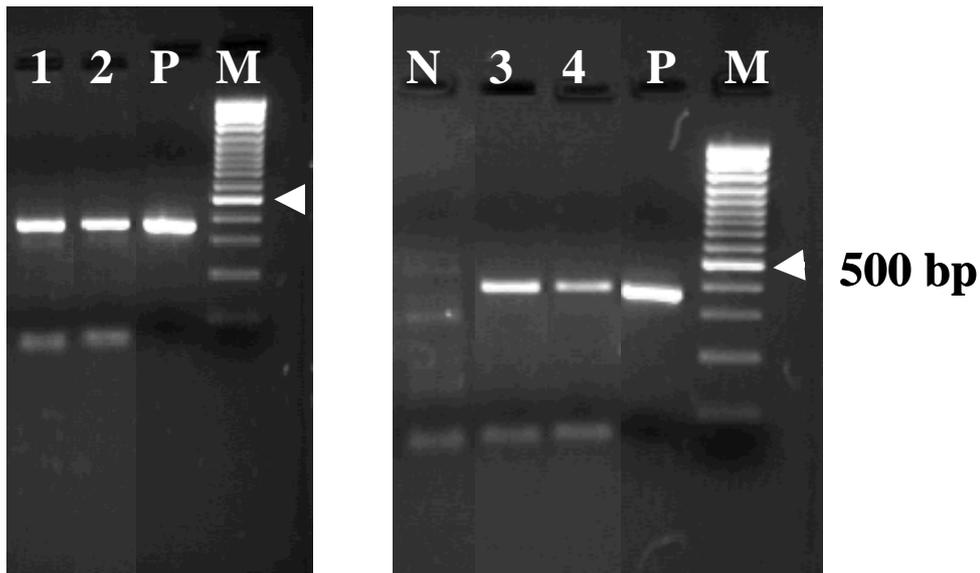


Abb. 10: Amplifikation von IFN- γ (1. Versuchsdurchlauf):

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle; **1** = Hündin *Daisy* (Tag 25 p.ov.); **2** = Hündin *Luca* (Tag 25 p.ov.); **3** = Hündin *Luna* (Tag 45 p.ov.); **4** = Hündin *Pat 2* (Tag 15 p.ov.)

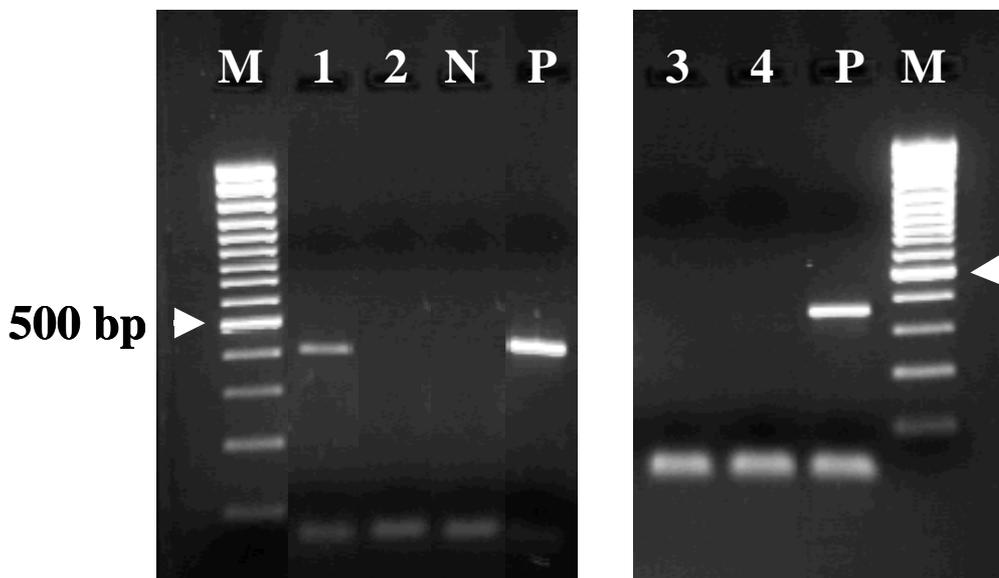


Abb. 11: Amplifikation von IFN- γ (2. Versuchsdurchlauf):

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle; **1** = Hündin *Simba* (Tag 60-80 p.ov.); **2** = Hündin *Gil* (Tag 45 p.ov.); **3** = Hündin *Daisy* (Tag 25 p.ov.); **4** = Hündin *Luca* (Tag 25 p.ov.)

Tabelle 10: Expression der Zytokine IL-6 und IFN- γ sowie GAPDH im CL von Hündinnen im ersten (1. VD) und zweiten Versuchsdurchlauf (2. VD) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tag p.ov.	Hündin	IL-6		IFN- γ		GAPDH	
		1. VD	2. VD	1. VD	2. VD	1. VD	2. VD
Tag 5	Pila	(+)	-	-	-	++	++
	Asta	++	-	(+)	-	++	++
	Zora 2	-	-	-	-	++	++
	Marla	-	-	-	-	++	++
	Tini	-	-	-	-	++	++
Tag 15	Pat 2	(+)	-	+	-	++	++
	Kim	(+)	-	-	-	++	++
	Fee	-	-	-	-	++	++
	Tina	-	-	-	-	++	++
	Rejca	-	-	-	-	++	++
Tag 25	Daisy	-	-	++	-	++	++
	Luca	-	-	++	-	++	++
	Lotte	-	-	-	-	++	++
	Shila	-	-	-	-	++	++
	Flo	-	-	-	-	++	++
Tag 35	Fox	-	-	(+)	-	++	++
	Oda	-	-	(+)	-	++	++
	Timba	-	-	-	-	++	++
	Maja	(+)	-	-	-	++	++
Tag 45	Luna	-	-	++	-	++	++
	Pat	-	-	++	-	++	++
	Sinah	-	-	++	-	++	++
	Gil	-	-	-	-	++	++
Tag 68-80	Franzi	-	-	-	-	++	++
	Shari	-	-	-	-	++	++
	Bonny	-	-	-	-	++	++
	Luna 2	-	-	-	-	++	++
	Simba	-	-	-	(+)	++	++

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

Untersuchungen zur Expression des Zytokins IL-4

Die Expression der mRNA von IL-4 konnte bei keiner Hündin zu keinem Untersuchungszeitpunkt, weder im 1. VD noch im 2. VD nachgewiesen werden. Die mit Con A stimulierten Lymphozyten der Positivkontrolle zeigten dabei in allen Fällen ein deutlich positives PCR-Produkt.

Abbildung 12 zeigt für 11 Hündinnen aus unterschiedlichen Zyklusphasen das Ergebnis der Untersuchungen auf eine Expression von IL-4 im Vergleich zur Positivkontrolle.

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine Expression von IL-4 im CL der Hündin nicht gezeigt werden konnte.

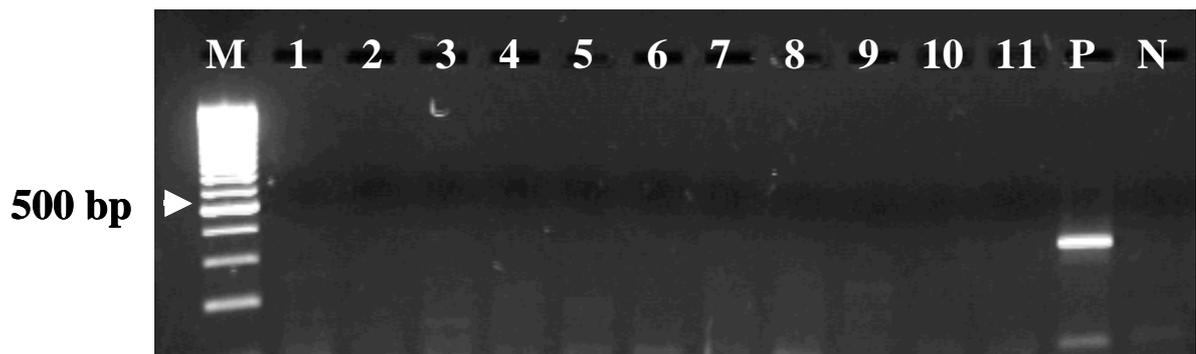


Abb. 12: Amplifikation von IL-4:

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle; **1** = Hündin *Luca* (Tag 25 p.ov.); **2** = Hündin *Shila* (Tag 25 p.ov.); **3** = Hündin *Flo* (Tag 25 p.ov.); **4** = Hündin *Fox* (Tag 35 p.ov.); **5** = Hündin *Oda* (Tag 35 p.ov.); **6** = Hündin *Timba* (Tag 35 p.ov.); **7** = Hündin *Maja* (Tag 35 p.ov.); **8** = Hündin *Luna* (Tag 45 p.ov.); **9** = Hündin *Pat 2* (Tag 15 p.ov.); **10** = Hündin *Sinah* (Tag 45 p.ov.); **11** = Hündin *Gil* (Tag 45 p.ov.)

Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-1 β und IL-2

IL-1 β :

Bei Verwendung des in Tabelle 1, Kapitel 3.11.2 (S. 72) beschriebenen Primerpaares, IL-1 β S/AS (2), ergaben sich für die Positivkontrolle (mit Con A stimulierte canine Lymphozyten) die erwarteten Banden (323 bp). Die bei 23 Hündinnen erhaltenen Expressionsprodukte wiesen jedoch eine deutlich geringere Basenlänge auf und lagen in einem Bereich von ca. 290 bp (s. Abb. 13). Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits mit dem in den Vorversuchen ausgetesteten 1. Primerpaar (IL-1 β S/AS) erhalten.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass aufgrund der Beschaffenheit der Matrize (Lutealgewebe) bei Verwendung des Primerpaares IL-1 β S/AS (2) Ableseprobleme aufgetreten waren, wurden die Untersuchungen an 6 Hündinnen an den Tagen 15 und 60-80 mit dem in Tabelle 1, Kapitel 3.11.2 angegebenen Primerpaar - IL-1 β S/AS (3) – wiederholt.

Wie Abb. 14 und 15 zeigen, ergaben sich auch hier keine Expressionsprodukte mit der erwarteten Länge, so dass das Ergebnis insgesamt als negativ bezeichnet werden muss.

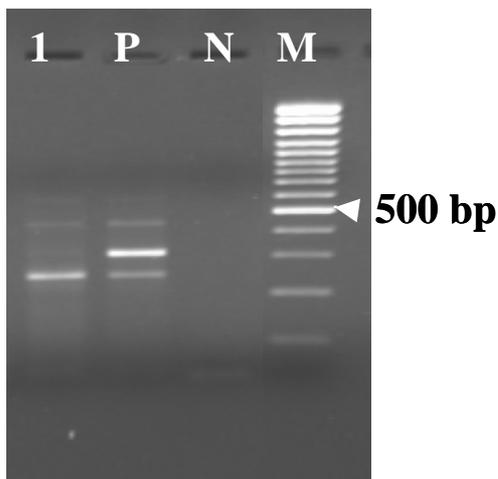


Abb. 13: Amplifikation von IL-1 β [mit dem Primerpaar IL-1 β S/AS (2)]:

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle;
1 = Hündin *Kim* (Tag 15 p.ov.)

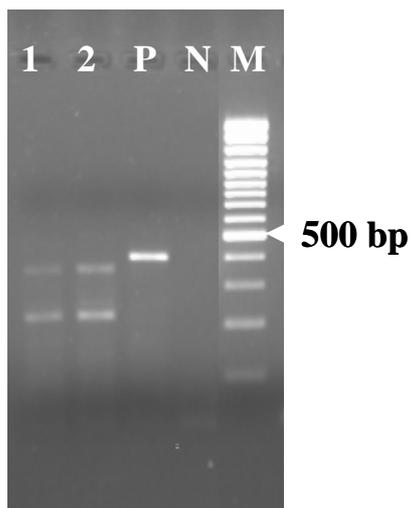


Abb. 14: Amplifikation von IL-1 β [mit dem Primerpaar IL-1 β S/AS (3)]:

M = 100 bp Marker; ; P = Positivkontrolle (LTT); N = Negativkontrolle;
1 = Hündin *Luna 2* (Tag 60-80 p. ov.; 1.VD); **2** = Hündin *Luna 2* (Tag 60-80 p.ov.; 2. VD)

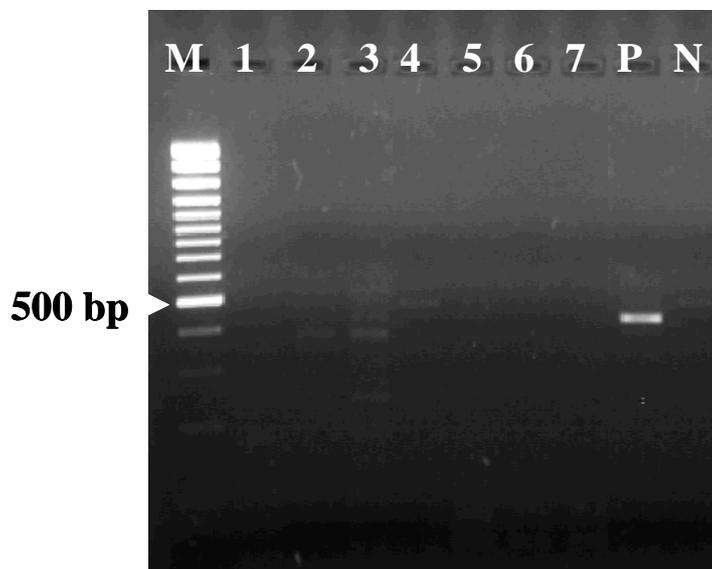


Abb. 15: Amplifikation von IL-1 β [mit dem Primerpaar IL-1 β S/AS (3)]:

M = 100 bp Marker; ; P = Positivkontrolle (LTT); N = Negativkontrolle;
1 = Hündin *Simba* (Tag 60-80 p.ov.; 1. VD); **2** = Hündin *Simba* (Tag 60-80 p.ov; 2. VD); **3** = Hündin *Bonny* (Tag 60-80 p.ov., 1. VD); **4** = Hündin *Bonny* (Tag 60-80 p. ov.; 2. VD), **5** = Hündin *Rejca* (Tag 15 p.ov.); **6** = Hündin *Franzi* (Tag 60-80 p.ov.); **7** = Hündin *Shari* (Tag 60-80 p.ov.);

IL-2:

Die Untersuchungen zur Expression von IL-2 führten zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei IL-1 β . Bei Verwendung des in Tabelle 1, Kapitel 3.11.2 (S. 72) beschriebenen Primerpaares, IL-2 S/AS, ergaben sich für die Positivkontrolle (mit Con A stimulierte canine Lymphozyten) die erwarteten eindeutigen Banden (201 bp). Die bei der Untersuchung der CL erhaltenen Ergebnisse liesen jedoch mehrere Banden erkennen, die z.T. eine deutlich höhere Basenlänge aufwiesen (ca. 290 bp) und lediglich in einem Fall eine Übereinstimmung mit der erwarteten Basenlänge zeigten (s. Abb. 16).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass aufgrund der Beschaffenheit der Matrize (Lutealgewebe) bei Verwendung des o.a. Primerpaares Ableseprobleme aufgetreten waren, wurden auch hier die Untersuchungen bei zahlreichen Hündinnen mit den in Tabelle 1, Kapitel 3.11.2 angegebenen Primerpaaren - IL-2 S/AS (2) – wiederholt.

Wie Abb. 17 und 18 zeigen, ergaben sich auch hier keine Expressionsprodukte mit der erwarteten Länge (366 bp); die unspezifischen PCR-Produkte befanden sich auf einer Bandenhöhe von ca. 400 bp, so dass das Ergebnis, das in Tabelle 11 (s. S. 105) nochmals zusammenfassend dargestellt ist, insgesamt als negativ bezeichnet werden muss.

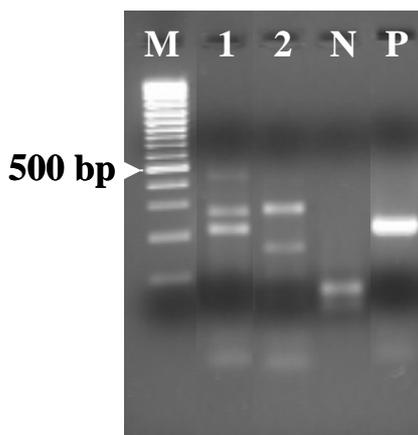


Abb. 16: Amplifikation von IL-2 (Primerpaar IL-2 S/AS):

M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle
1 = Hündin *Susi* (Vorversuch); **2** = Hündin *Georgi* (Vorversuch)

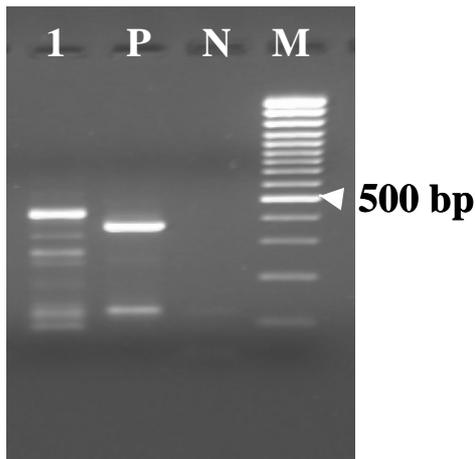


Abb. 17: Amplifikation von IL-2 im 1. VD [Primerpaar IL-2 S/AS (2)]:
M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle
1 = Hündin *Pat 2* (Tag 15 p.ov.)

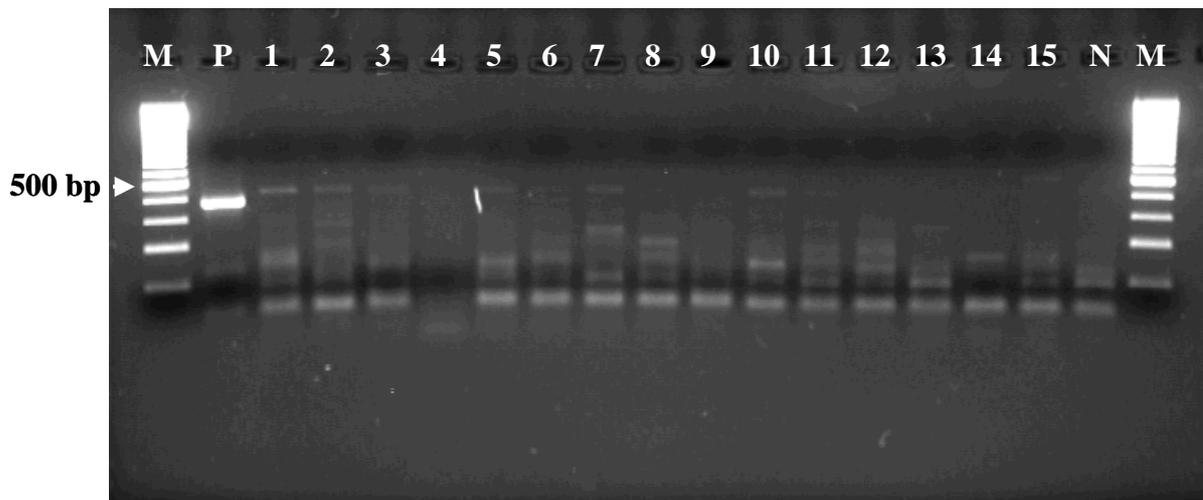


Abb. 18: Amplifikation von IL-2 im 2. VD [Primerpaar IL-2 S/AS (2)]:
M = 100 bp Marker; **P** = Positivkontrolle (LTT); **N** = Negativkontrolle
1 = Hündin *Pila* (Tag 5 p.ov.); **2** = Hündin *Asta* (Tag 5 p.ov.); **3** = Hündin *Zo-
 ra 2* (Tag 5 p.ov.); **4** = Hündin *Marla* (Tag 5 p. ov.); **5** = Hündin *Pat 2* (Tag 15
 p.ov.); **6** = Hündin *Kim* (Tag 15 p.ov.); **7** = Hündin *Fee* (Tag 15 p.ov.);
8 = Hündin *Tina* (Tag 15 p.ov.); **9** = Hündin *Daisy* (Tag 25 p.ov.);
10 = Hündin *Luca* (Tag 25 p.ov.); **11** = Hündin *Shila* (Tag 25 p.ov.);
12 = Hündin *Flo* (Tag 25 p.ov.), **13** = Hündin *Fox* (Tag 35 p.ov.); **14** = Hündin
Oda (Tag 35 p.ov.); **15** = Hündin *Timba* (Tag 35 p.ov.);

Tabelle 11: Expression der Zytokine IL-1 β und IL-2 sowie GAPDH im CL von Hündinnen im ersten (1. VD) und zweiten Versuchsdurchlauf (2. VD) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tag	Hündin	IL-1 β S/AS(2)		IL-1 β S/AS(3)		IL-2 S/AS(2)		GAPDH	
		1. VD	2. VD	1. VD	2. VD	1.VD	2. VD	1.VD	2.VD
Tag 5	Pila	x	-	/	/	x	x	++	++
	Asta	x	-	/	/	x	x	++	++
	Zora 2	x	-	/	/	-	-	++	++
	Marla	x	-	/	/	-	-	++	++
	Tini	/	/	/	/	/	/	++	++
Tag 15	Pat 2	x	-	/	/	x	x	++	++
	Kim	x	-	/	/	x	-	++	++
	Fee	x	-	/	/	-	x	++	++
	Tina	x	-	/	/	-	-	++	++
	Rejca	x	-	/	-	-	/	++	++
Tag 25	Daisy	x	-	/	/	x	-	++	++
	Luca	x	-	/	/	x	x	++	++
	Lotte	/	/	/	/	/	/	++	++
	Shila	-	x	/	/	-	-	++	++
	Flo	x	-	/	/	-	-	++	++
Tag 35	Fox	x	-	/	/	x	-	++	++
	Oda	x	-	/	/	x	-	++	++
	Timba	x	-	/	/	-	-	++	++
	Maja	x	-	/	/	-	-	++	++
Tag 45	Luna	x	-	/	/	-	-	++	++
	Pat	x	-	/	/	-	-	++	++
	Sinah	x	-	/	/	-	-	++	++
	Gil	x	-	/	/	-	-	++	++
Tag 68-80	Franzi	-	/	/	-	/	/	++	++
	Shari	x	/	/	-	/	/	++	++
	Bonny	/	/	-	-	/	/	++	++
	Luna 2	/	/	-	x	/	/	++	++
	Simba	/	/	-	-	/	/	++	++

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

x = unspezifisches PCR-Produkt

/ = nicht gemessen*

* nachdem bei der Sequenzierung des IL-1 β S/AS (2) bzw. des IL-2 S/AS (2) ein unspezifisches PCR-Produkt nachgewiesen wurde

4.2.3 Gesamtübersicht zu den Ergebnissen aus der RT-PCR im CL der Hündin

Tabelle 12: Darstellung der Expression von Zytokinen im Lutealgewebe von Hündinnen mittels RT-PCR in Abhängigkeit vom Tag der Ovulation:
Zusammenfassung der Ergebnisse

Zytokin	Tage nach der Ovulation					
	5	15	25	35	45	60-80
IL-8	++	++	++	++	++	++
IL-10	++	++	++	++	++	++
IL-12	++	++	++	++	++	++
TNF- α	+	+	+	+	+	(+)
TGF- β 1	++	++	++	++	++	++
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-6	(-)	(-)	-	(-)	-	-
IFN- γ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
IL-1 β	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-

++ = stark positives PCR-Produkt

(+) = schwaches PCR-Produkt

+ = deutlich positives PCR-Produkt

- = kein PCR-Produkt

(-) = Hinweis auf Expression auf niedrigem Niveau

Tabelle 12 gibt eine Gesamtübersicht über die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Erfassung der Expression der mRNA unterschiedlicher Zytokine im CL der Hündinnen zu den verschiedenen Zeitpunkten des Diöstrus.

Dabei zeigte sich, dass die mRNA der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TGF- β 1 und TNF- α im CL der Hündin zu jedem Untersuchungszeitpunkt exprimiert wurde, wobei die Expression von TNF- α im Vergleich zu den anderen Zytokinen insgesamt schwächer ausfiel. Zyklusabhängigkeiten ließen sich nicht erkennen.

Eine Expression der mRNA von IL-4 sowie von IL-1 β und IL-2 konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen auf eine Expres-

sion der mRNA von IL-6 und IFN- γ lassen keine eindeutigen Aussagen zu; es ergaben sich jedoch Hinweise auf eine Expression auf niedrigem Niveau.

4.3 Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Überprüfung des Grades der Übereinstimmung des in der Gelelektrophorese nachgewiesenen Amplikons mit der Originalsequenz der Genbank, wurden – wie in Kapitel 3.15 angegeben – willkürlich ein bis zwei PCR-Produkte des nachgewiesenen Zytokins der Sequenzierung unterworfen.

Nachfolgend ist – soweit sich positive Ergebnisse ergaben - zu jedem Zytokin die entsprechend nachgewiesene Gensequenz aufgeführt, wobei die Nummerierung auf der linken Seite die Position innerhalb der Gesamtsequenz angibt.

4.3.1 Sequenzierung des Amplikons von IL-8

Für die Sequenzierung wurde das PCR-Produkt von Tag 35, Hündin Maja, herangezogen. Es ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen.

Sequenz des PCR-Produktes von IL-8:

39				ac	ttccaagctg	gctgttgctc
61	tcttggcagc	ttttgcctt	tctgcagctc	tctgtgaagc	tgcagttctg	tcaagagtca
121	gttcagaact	tcgatgccag	tgtataaaaa	cacactccac	acctttccat	cccaaatata
181	ttaaagaact	gagagtgatt	gacagtggcc			

4.3.2 Sequenzierung des Amplikons von IL-10

Für die Sequenzierung wurde zunächst das PCR-Produkt von Tag 60-80, Hündin Simba, herangezogen. Es ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 95,1-97 %.

Auffällig war dabei eine Deletion von 6 Basen (ctgaga) in beiden Leserichtungen an der Position 365-370.

Auch die danach durchgeführte Sequenzierung des PCR-Produktes von Tag 15, Hündin Pat 2, zeigte diese Deletion mit einer Sequenzhomologie von 94,1 %.

Zudem wurde im Amplikon beider Hündinnen an der Position 399 der Einbau von „g“ anstelle von „t“ festgestellt.

Die beobachteten Abweichungen von der Originalsequenz könnten zum Einen auf einem fehlerhaften Einbau der Nukleotide durch die Taq-Polymerase beruhen, zum Anderen aber auch auf einer abweichenden Sequenz im Lutealgewebe.

Sequenz des PCR-Produktes von IL-10:

235						cctggg
241	ttccaagcc	ctgtcggaga	tgatccagtt	ttacttgag	gagtgatgc	cccgggctga
301	gaaccacgac	ccagacatca	agaaccacgt	gaactccctg	ggagagaagc	tcaagaccct
361	caggctgaga	ctgaggctgc	gacgctgtca	ccgattctt	ccctgtgaga	ataagagcaa
421	ggcgggtggag	caggtgaaga	gcgcat			

ctgaga = Deletion in der Sequenz des PCR-Produktes von IL-10

t = statt „t“ Einbau von „g“ im PCR-Produkt von IL-10

4.3.3 Sequenzierung des Amplikons von IL-12 p40 Subunit

Für die Sequenzierung wurde das PCR-Produkt von Tag 60-80, Hündin Shari, herangezogen. Es ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen. Das ebenfalls sequenzierte PCR-Produkt der Hündin Timba (Tag 35) zeigte eine Übereinstimmung von 98 %.

Sequenz des PCR-Produktes von IL-12 p 40 Subunit:

```

144          cacctgc      catacccctg   aagaagatga   catcacttgg
181  acctcagcgc  agagcagtgga agtcttaggt   tctggtaaaa   ctctgaccat   ccaagtcaaa
241  gaattggag   atgctggcca   gtatacctgc   cataaaggag   gcaaggttct   gagccgctca
301  ctctgttga   ttcacaaaaa   agaagatgga   atttggcca    ctgatatctt   aaaggaacag
361  aaagaatcca  aaaataagat   ctttctgaaa   tgtgaggcaa   agaattattc   tggacgttcc
421  acatgctggt  ggctgacggc   aatcagtact   gatttgaat   tcagtgtcaa   aagtagcaga
481  ggcttctctg  accccaaggg   ggtgacatgt   ggagcagtgga cactttcagc   agagagggtc
541  a
    
```

4.3.4 Sequenzierung des Amplikons von TNF- α

Für die Sequenzierung wurde das PCR-Produkt von Tag 5, Hündin Asta, herangezogen. Es ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen. Das PCR-Produkt aus den mit Con A stimulierten caninen Lymphozyten zeigte bei der Sequenzierung eine Übereinstimmung von 99,1 %.

Sequenz des PCR-Produktes von TNF- α :

```

40          c          aagccagtag   ctcatgttgt
61  agcaaaccce  gaagctgagg   ggcagctcca   gtggetgagc   cgacgtgcca   atgccctcct
121 ggccaacggc   gtggagctga   cagacaacca   gctgatagtg   ccgtcagatg   ggttgtacct
181 catctactcc   caggtcctct   tcaagggccca   aggggtgccct   tccacccatg   tgctctcac
241 ccacaccatc  agccgcttcg   ccgtctccta   ccagacaaag   gtcaacctac   tctctgccat
301  caaga
    
```

4.3.5 Sequenzierung des Amplikons von TGF-β1

Für die Sequenzierung wurde das PCR-Produkt von Tag 60-80, Hündin Shari, herangezogen. Es ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen. Das Amplikon der Hündin Timba, Tag 35, zeigte bei der Sequenzierung eine Übereinstimmung von 95,7 %.

Sequenz des PCR-Produktes von TGF-β1:

826					ttcct	gctcctcatg
841	gccacccac	tggagagggc	ccagcacctg	cacagctccc	ggcagcgccg	ggcctggac
901	accaactact	gcttcagctc	cacggagaag	aactgctgcg	tccggcagct	ctacattgac
961	ttccgcaagg	atctgggctg	gaagtggatc	catgagccca	agggttacca	cgtaacttc
1021	tgctggggc	cctgcccta	catttgagc	ctggacacgc	agtacagcaa	ggtcctggcc
1081	ctgtacaacc	agcacaacc	gggcgcgctc	gcggcgccgt	gctgcgtgcc	gcaggcgctg
1141	gagccactgc	ccatcgtgta	ctacgtgggc	cgcaagccca	aggtggagca	gctgtcgaac
1201	atgatcgtgc	gctcctgc				

4.3.6 Sequenzierung des Amplikons von IL-4 aus der Positivkontrolle

Nachdem sich kein PCR-Produkt für IL-4 aus dem Lutealgewebe der Hündin ergeben hatte, wurde zu Kontrollzwecken die Sequenzierung des PCR-Produktes der mit Con A stimulierten caninen Lymphozyten durchgeführt. Es zeigte sich eine Übereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen.

4.3.7 Sequenzierung des Amplikons von IFN- γ

Die Sequenzierung des im ersten Versuchsdurchlauf erhaltenen PCR-Produktes von Tag 15, Hündin Pat 2, ergab eine Übereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen; für die Hündin Luca, Tag 25, ergab sich eine Übereinstimmung von 99,1 %.

Sequenz des PCR-Produktes von IFN- γ :

```

67      gcaa  gtaatccaga  tgtatcggac  ggtgggtctc  ttttcgtaga  tattttgaag
121    aatggagag  aggagagtga  caaaacaatc  attcagagcc  aaattgtctc  tttctacttg
181    aaactgtttg  acaactttaa  agataaccag  atcattcaaa  ggagcatgga  taccatcaag
241    gaagacatgc  ttggcaagt  cttaaatagc  agcaccagta  agagggagga  cttccttaag
301    ctgattcaaa  ttctgtgaa  cgatctgcag  gtccagcgca  aggcgataaa  tgaactcatc
361    aaagtgatga  atgatctctc  accaagatcc  aacctaagga  agcggaaaag  gagtcagaat
421    ctgtttcgag
    
```

4.3.8 Sequenzierung des Amplikons von IL-1 β

Die Sequenz des PCR-Produktes von Tag 15, Hündin Pat 2, zeigte im Gegensatz zur Positivkontrolle keine Übereinstimmung mit der Originalsequenz der Genbank, so dass davon auszugehen ist, dass IL-1 β im CL der Hündin nicht exprimiert wird.

4.3.9 Sequenzierung des Amplikons von IL-2

Die Sequenz des PCR-Produktes von Tag 15, Hündin Kim, zeigte im Gegensatz zu einer Übereinstimmung von 99 % im PCR-Produkt der Positivkontrolle keine Übereinstimmung mit der Originalsequenz der Genbank, so dass davon auszugehen ist, dass IL-2 im CL der Hündin nicht exprimiert wird.

4.3.10 Sequenzierung des Amplikons von GAPDH

Für die Sequenzierung wurde das PCR-Produkt von Tag 15, Hündin Rejca, herangezogen. Es ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 100 % in beiden Leserichtungen.

GAPDH, partielle cDNA:

```

1      tgctcctct      gctgatgccc      ccatgtttgt      gatgggcgtg      aaccatgaga      agtatgacaa
61     ctccctcaag     attgtcagca     atgctcctg      caccaccaac     tgcttggtc     ctctagccaa
121    agtcatcat     gaccacttcg     gcatcgtgga     gggcctcatg     accaccgtcc     atgccatcac
181    tgccaccag     a
    
```

4.3.11 Sequenzierung des Amplikons von IL-6

Nachdem sich hier nur im 1. VD positive Ergebnisse erzielen ließen und dabei nur in einem Fall (Hündin Asta, Tag 5) ein „stark positives“ PCR-Produkt erhalten wurde, ergab sich für eine Sequenzierung nicht mehr die notwendige Menge an Amplifikat. Es liegt demnach kein Ergebnis vor.

4.4 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen

Rabbit Anti-human Tumor Necrosis Factor- α , polyklonal (DPC Biermann, Bad Nauheim)

Ergebnis: kein cytoplasmatisches Signal, Lutealzellen zeigten ein schwaches, unspezifisches nukleäres Signal

Mouse Anti-human Transforming Growth Factor- β , monoklonal

(Klon TB21; DPC Biermann, Bad Nauheim)

Ergebnis: kein Signal

Rabbit Anti-porcine Transforming Growth Factor- β 1, polyklonal

(DPC Biermann, Bad Nauheim)

Ergebnis: kein cytoplasmatisches Signal, Lutealzellen zeigten ein schwaches, unspezifisches nukleäres Signal

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

Im Hinblick auf die Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen, die im Verlauf des Diöstrus eine unterschiedliche Verteilung von T- und B-Lymphozyten sowie MHC II Antigen-exprimierenden Zellen im CL der Hündin aufgezeigt haben, war es Ziel vorliegender Arbeit, durch den Nachweis der Expression unterschiedlicher Zytokine, Informationen zum funktionellen Status dieser Zellen zu erhalten.

In der Literatur fanden sich zahlreiche Angaben über die Beteiligung von Zytokinen in der Phase der Differenzierung, Aufrechterhaltung und der lutealen Regression des CL bei Wiederkäuer, Schwein, Kaninchen, Mensch, Ratte und Maus, wobei die Untersuchungen sowohl auf der Ebene der mRNA als auch der Proteinexpression durchgeführt wurden. Entsprechende Untersuchungen und Erkenntnisse über die Rolle von Zytokinen im Corpus luteum der Hündin existieren jedoch bis dato nicht.

Wie in Kap. 2.1.1 angegeben erstreckt sich der Diöstrus über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen, wobei die dabei zugrunde liegende Progesteron-Verlaufskurve durch einen Anstieg bis zum ca. 25./30. Tag gekennzeichnet ist, wonach - nach einer kurzen Plateauphase - ein allmählicher Abfall einsetzt.

Um eine eventuelle Korrelation zwischen dem Progesteronverlauf und der Zytokinexpression darstellen zu können, wurden die für die Untersuchung vorgesehenen CL an den folgenden Tagen nach der Ovulation (Tag 1) gewonnen: Tag 5, 15, 25, 35 und 45.

Im Hinblick auf die Ergebnisse im ersten Versuchsdurchgang, die zeigten, dass sich das Expressionsmuster der Zytokine im Verlauf des Diöstrus nicht wesentlich veränderte, wurde noch eine Gruppe von Tag 60-80 p.ov. zur Beurteilung der späten Lutealphase in die Untersuchungen einbezogen.

5.2 Diskussion der Methodik

Ziel der Untersuchungen war es, Hinweise auf das CL als Syntheseort der Zytokine zu erhalten. Nachdem beim Hund die Gensequenzen einer großen Anzahl an Zytokinen bekannt sind, bot sich als Nachweismethode die RT-PCR an.

Die PCR kann heute als die Methode der Wahl angesehen werden, da sie schnell in der Durchführung ist, eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzt und für ein breites Spektrum spezieller Anwendungen nutzbar ist (z.B. Charakterisierung, Klonierung und Expression von Genen; Nachweis von Krankheitserregern und Mutationen; genetischer Fingerabdruck).

Für den Nachweis der Expression der Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ und TGF- β 1 mittels RT-PCR wurde das von FRISK et al. (1999) sowie GRÖNE et al. (1999) beschriebene Protokoll herangezogen, mit dem der Nachweis dieser Zytokine im Gehirn von an Staupe erkrankten Hunden und in einer speziesspezifischen (Hund) monozytären Zelllinie (DH82) sowie in Leukozyten des peripheren Blutes vom Hund gelungen war. Die Anwendung erfolgte nach Optimierung des Protokolls für die Darstellung der Expression im CL (siehe Kapitel 3.7.1. und 3.11.1.).

Die Sequenzen der caninen Zytokin-Primer, IL-4 S/AS und IL-1 β S/AS (3) wurden der Veröffentlichungen von VAN DER KAAIJ et al. (1999) und BARNES et al. (2000) entnommen.

Da Lymphozyten nach Stimulierung mit Lektinen mit der Produktion eines breiten Spektrums an Zytokinen beginnen, wurden entsprechend behandelte canine Lymphozyten als Positivkontrolle bei jeder RT-PCR-Reaktion mitgeführt. Parallel dazu wurde Wasser als Negativkontrolle verwendet. Somit konnten unspezifische Wechselwirkungen von Primer und Matrize sowie eine Kontamination der verwendeten Reagenzien überprüft und erfasst werden.

Für die Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 wurden in dieser Arbeit praktisch in jeder untersuchten Probe positive PCR-Produkte erhalten. Dagegen konnte IL-4 in keiner der untersuchten Probe nachgewiesen werden. Diese reproduzierbaren Ergebnisse sprechen dafür, dass für die Extraktion der mRNA ein „homogenes“ Ausgangsmaterial zugrunde lag und Kontaminationen mit mRNA anderer Provenienz vermieden werden konnte. Es ist daher davon auszugehen, dass die für die Zytokine IL-6 und IFN- γ in einzelnen Versuchsansätzen erhaltenen Amplikons nicht auf extern eingebrachten Verunreinigungen beruhen, sondern sich wahrscheinlich eher aus der Empfindlichkeit des angewandten Analyseverfahrens und dem dabei zugrunde liegenden Ja/Nein-Charakter der analytischen Aussage ergeben.

Dementsprechend zeigen die Ergebnisse in dieser Arbeit die Expression bzw. Nichtexpression von Zytokinen im CL der Hündin an, sie lassen jedoch keine quantitative Aussage über die Genexpression oder die Genexpression zu.

Für jedes Zytokin wurde das Ergebnis der PCR durch eine Sequenzanalyse der PCR-Produkte anhand einer Auswahl an Proben bestätigt, so dass davon auszugehen ist, dass der Nachweis der Expression der im Lutealgewebe ermittelten Zytokine gesichert ist.

Der Nachweis der Expression der mRNA von Zytokinen lässt allerdings nur die Vermutung zu, dass auch eine entsprechende Translation stattgefunden hat und bioaktives Protein gebildet wurde.

In zahlreichen Untersuchungen hat sich die Immunhistochemie als Nachweis der Proteinexpression bei gleichzeitiger Identifikation der Protein-exprimierenden Zelle bewährt (PIQUETTE et al. 1994; SIMON et al. 1994; LORET DE MOLA et al. 1996; KONDO et al. 1995; HEHNKE-VAGONI et al. 1995; ZHAO et al. 1998; CHEN et al. 1993; CHEGINI & FLANDERS 1992; CHEGINI & WILLIAMS 1992; CHRISTOPHER 2000; JUNEJA et al. 1996; TEERDS & DORRINGTON 1992; MATSUYAMA & TAKAHASHI 1995).

Zur Darstellung der zellulären Proteinsynthese von Zytokinen beim Hund liegen bisher allerdings nur wenige Untersuchungen vor. DAY (1996) untersuchte in caninen Lymphknoten mit Mineral-assoziiertes Lymphadenopathie, granulomatöse Lymphadenitis und reaktiver Hyperplasie die Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α immunhistologisch. Die von ihm verwendeten Antikörper stammten vom Kaninchen und waren gegen eine Aminosäuresequenz des humanen IL-1 β , IL-6 und TNF- α gerichtet, die mit der vom Hund eine hohe Homologie aufweist. Die in dieser Studie verwendeten Antikörper (Fa. Genzyme) standen jedoch zum Untersuchungszeitpunkt nicht mehr zur Verfügung, so dass Antikörper, die gegen humanes TNF- α sowie humanes und porcines TGF- β 1 (Fa. DPC Biermann) gerichtet waren, ausgetestet wurden. Leider konnten weder TNF- α noch TGF- β 1 spezifisch im CL der Hündin nachgewiesen werden. Andere geeignete, paraffingängige Antikörper waren zum Zeitpunkt der Untersuchung weder kommerziell noch anderweitig erhältlich.

Zur Identifikation der Sekretion von Zytokinen durch das „CL“ bietet sich alternativ auch an, entsprechend empfindliche Bioassays zum Einsatz zu bringen. Zur Anwendung beim Hund wurden Bioassays für IL-1 (D10 [N4]M-Proliferationstest), IL-6 (B9-Proliferationsassay) und TNF- α (WEHI 164, Klon 13 Zytotoxizitätsassay) adaptiert (CARTER et al. 1999). Eine Zu-

ordnung der Zytokin-produzierenden Zelle ist mit diesen Tests jedoch nicht möglich; ihre Anwendung erscheint jedoch dann sinnvoll, wenn z.B. nach Etablierung spezifischer caniner Lutealzellkulturen die Möglichkeit der Erfassung komplexer Reaktionsmechanismen auf zelluärer Ebene möglich ist. Parallel zu vorliegender Arbeit wird derzeit in der eigenen Arbeitsgruppe an der Einrichtung solcher Systeme gearbeitet.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Nachweis der Expression von IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TNF α und TGF- β 1

IL-8:

Die Expression der mRNA von IL-8 wurde im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus ohne erkennbare Variationen nachgewiesen. Die anschließende Sequenzierung bestätigte die Zuverlässigkeit dieses Ergebnisses. Vergleichbare Untersuchungen zur Expression der mRNA im CL existieren zur Zeit nur für die Spezies Mensch. Hier wurde die mRNA und auch das Protein von IL-8 in Granulosaluteinzellen exprimiert, wobei die Expression beider Parameter unter der Stimulation mit IL-1 α und TNF- α anstieg (ARICI et al. 1996); Progesteron hemmte die basale als auch die durch IL-1 α stimulierte Expression von IL-8.

Da IL-8 an der Regulation der Proliferation und der Neubildung vaskulärer Strukturen beteiligt ist (KOCH et al. 1992), könnte es daher als Wachstumsfaktor die Transformation des ovulierten Follikels zum CL cyclicum fördern. Die Tatsache, dass Gonadotropine die Produktion von IL-8 in Granulosazellen, aber nicht in Thekazellen induzieren, deutet auf eine solche spezifische Funktion von IL-8 hin (RUNESSON et al. 2000).

Da in vorliegender Studie die mRNA über die gesamte Untersuchungsdauer offensichtlich mehr oder weniger konstant exprimiert wurde, sind weitere Untersuchungen – auch im Zellsystem – zur Charakterisierung der Bedeutung von IL-8 für die CL-Funktion notwendig.

IL-10:

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch die mRNA von IL-10 im Untersuchungszeitraum (Diöstrus) bei der Hündin konstant exprimiert wurde. Die Zuverlässigkeit des Ergebnisses wurde durch die anschließende Sequenzierung bestätigt. Erwähneswert ist die bei der Sequenzierung festgestellte Deletion von 6 Basen (ctgaga) an der Position 365-370 und der Einbau der Base „g“ anstelle der Base „t“ an der Position 399 im PCR-Produkt. Die beobachteten Abweichungen von der Originalsequenz könnten zum Einen auf einem fehlerhaften Einbau der Nukleotide durch die Taq-Polymerase beruhen oder zum Anderen auf einer abweichenden Sequenz des Zytokins im Lutealgewebe.

Funktionale Untersuchungen zur Bedeutung von IL-10 für die Regulation der CL-Funktion beim Hund liegen nicht vor.

Jedoch lieferten in vitro-Studien mit Lutealzellen bei der Frau einen Hinweis auf eine Mitbeteiligung von IL-10 an der Regulation der CL-Funktion als luteotroper Faktor. So stimulierte IL-10 die Progesteronsynthese sowohl in Probenmaterial zyklischer als auch gravider Frauen (HASHII et al. 1998). Als essentiell erwies sich für die immunologische Aktivierung und Sekretion von IL-10 die Interaktion zwischen den Zellverbänden, denn nach Einfügen einer Interzellschicht zwischen die Lutealzellen und die mononukleären Zellen unterblieb der durch die mononukleären Zellen vermittelte Anstieg von IL-10; die Progesteronproduktion wurde davon jedoch nicht beeinflusst.

Untersuchungen beim Mensch haben gezeigt, dass TGF- β 1 die Produktion von IL-10 durch Makrophagen aufregulieren kann (MAEDA et al. 1995) und dass die Expression von TGF- β Rezeptoren auf Tumorzellen aus dem Ovar, die mit IL-10 behandelt wurden, anstieg (NASH et al. 1999). Nachdem in vorliegender Untersuchung sowohl die Expression von IL-10 als auch die von TGF- β 1 im CL der Hündin gezeigt werden konnte, kann dies möglicherweise auf entsprechende Regulationsmechanismen hindeuten.

IL-12 p40 Subunit:

Auch die Expression der mRNA von IL-12 p40 Subunit konnte zu allen Untersuchungszeitpunkten dargestellt werden, die Ergebnisse wurden durch die anschließende Sequenzierung bestätigt. Weder für den Hund noch für andere Spezies fanden sich in der Literatur Hinweise zur Expression der mRNA dieses Zytokins im CL.

Die IL-12 p40 Subunit wird im allgemeinen anscheinend überwiegend von Makrophagen exprimiert. Beziehungen zum Zyklusverlauf konnten BOUMAN et al. (2001) nicht zeigen, da sich nach in vitro-Stimulation mit Endotoxin der Anteil an IL-12 produzierenden Monozyten im Blut von Frauen aus der Luteal- und der Follikelphase nicht unterschied.

TNF- α :

Im Verlauf des Diöstrus der Hündin konnte auch für TNF- α eine relativ konstante Expression der mRNA dargestellt werden, das Ergebnis wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Auch im Lutealgewebe von Rind (PENNY et al. 1999; PETROFF et al. 1999; SAKUMOTO et al. 2000b), Schwein (WUTTKE et al. 1993), Ratte (SANCHO-TELLO et al. 1992) sowie in Granulosaluteinzellen von Mensch (LOY et al. 1992) und Maus (CHEN et al. 1993) wurde die Expression von TNF- α nachgewiesen. In Übereinstimmung mit den eigenen Befunden zeigte sich auch bei PETROFF et al. (1999) und SAKUMOTO et al. (2000b) eine nahezu unveränderte Expression der mRNA von TNF- α im CL beim Rind während des Zyklus und auch während der PGF_{2 α} -induzierten Luteolyse.

Beim Schaf war dagegen die Expression der mRNA von TNF- α im CL mittels Northern Blot in den verschiedenen Stadien der lutealen Regression nicht nachweisbar. Mittels in situ-Hybridisierung konnten allerdings positive Signale in einer kleinen Population residenter mononukleärer Zellen nachgewiesen werden, wobei sich allerdings keine signifikanten zeitabhängigen Unterschiede ergaben (JI et al. 1991).

Im CL des Rindes wurde immunreaktives TNF- α in makrophagenähnlichen Zellen, Endothel- und Thekazellen lokalisiert (TERRANOVA 1997). Im CL vom Schwein wurde die mRNA von TNF- α mittels Aspiration aus der Zellkultur in den großen Lutealzellen (WUTTKE et al. 1993) sowie die Proteinexpression von TNF- α in Endothelzellen (HEHNKE-VAGONI et al. 1995) und in der Nähe von Gefäßwänden (ZHAO et al. 1998) nachgewiesen. Im CL der Frau zeigten sich positive immunhistologische Signale besonders während der mittleren Lutealphase in den Granulosa- und Thekaluteinzellen sowie in makrophagenähnlichen Zellen (KONDO et al. 1995; ROBY et al. 1990). Bei der Maus wurden im CL Hybridisierungssignale für TNF

in Lutealzellen und makrophagenähnlichen Zellen nachgewiesen, die mit steigendem Alter des CL stärker wurden (CHEN et al. 1993).

PATE (1995) folgerte aus den bis dahin erhaltenen Ergebnissen, dass TNF- α in der frühen Lutealphase die Differenzierung der Lutealzellen fördern könnte, während es in der späten Lutealphase die Induktion der Apoptose einleiten und eine zytotoxische Wirkung auf die Lutealzellen ausüben könnte. Dabei wird der Mechanismus der Interaktion von Immunzellen und Zytokinen mit Lutealzellen im bovinen Modell wie folgt gesehen:

Zum Zeitpunkt der lutealen Regression, die beim Rind durch das aus dem Endometrium freigesetzte PGF_{2 α} eingeleitet wird, steigt die Expression von MHC I und insbesondere die Expression von MHC-II auf bovinen Lutealzellen an, wodurch Th1-, Th2- und zytotoxische T-Zellen aktiviert werden und daraufhin mit der Sekretion von TNF- α , IFN- γ und IL-2 beginnen. Durch IFN- γ aktivierte im CL residente Makrophagen sezernieren ebenfalls TNF- α sowie IL-1 β . Sowohl das freigesetzte TNF- α als auch IFN- γ und IL-1 β bewirken einen weiteren Abfall der Progesteronsekretion und einen Anstieg der lutealen Prostaglandinproduktion. Die Interaktionen werden durch eine Verstärkung der Aktivierung von Th1- und Th2-Zellen durch die Sekretion von IL-2 weiter unterhalten und führen letztlich auch durch die infolge von TNF- α und IFN- γ ausgelösten zytotoxischen Effekte zu einem weiteren Fortschreiten der lutealen Regression. Ob die Hypothese auch der lutealen Regression beim Hund zugrunde gelegt werden kann, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

TGF- β 1:

Auch die Expression der mRNA von TGF- β 1 im CL der Hündin wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen und das Ergebnis durch anschließende Sequenzierung gesichert.

Immunhistologisch wurde beim Menschen in kleinen und großen Lutealzellen die Expression von TGF- β 1 nachgewiesen; ein sehr schwaches Signal wurde auch noch im Corpus albicans beobachtet (CHEGINI & FLANDERS 1992, CHEGINI & WILLIAMS 1992). Die Intensität des Signals war in der mittleren Lutealphase am Stärksten ausgeprägt und zeigte in der späten Lutealphase einen Abfall. Bei der Maus lokalisierten JUNEJA et al. (1996) TGF- β 1 mittels Immunhistologie in Theca-, Granulosa- und Lutealzellen; sie konnten dabei keinen substantiellen Unterschied in der Intensität oder Verteilung feststellen. Ebenfalls bei der Maus beschrieben SCHMID et al. (1994) eine starke Expression der mRNA von TGF- β 1 mittels in

situ-Hybridisierung im CL, sowie in der äußeren Granulosazellschicht von postantralen Follikeln.

Im CL der adulten Ratte wurde überwiegend in den großen Lutealzellen ein unregelmäßig auftretendes immunhistologisches Signal für TGF- β 1 nachgewiesen (TEERDS & DORRINGTON 1992). MATSUYAMA & TAKAHASHI (1995) lokalisierten TGF- β 1 in Makrophagen aus der Lutealzellkultur und im Lutealgewebe von Ratten.

VINATIER et al. (1995) folgerten aus den bis dahin erhaltenen Ergebnissen, dass TGF- β 1 in der frühen und mittleren Lutealphase an der Aufrechterhaltung der Lutealfunktion beteiligt sein könnte, während es in der späten Lutealphase zur lutealen Regression durch Induktion der Apoptose von Endothel- und Lutealzellen beitragen könnte.

TGF- β 1 und IL-10 scheinen eine gegenseitig stimulierende Wirkung zu besitzen (MAEDA et al. 1995, NASH et al. 1999), welche die konstante Expression der mRNA beider Zytokine im Verlauf des Diöstrus der Hündin widerspiegelt.

Zusammenfassend ergibt sich, dass IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 während der gesamten Lutealphase mehr oder weniger konstant exprimiert wurden. Damit ergeben sich erste Hinweise, für welches Zytokin weiterführende quantifizierende Untersuchungen hinsichtlich der Expression der mRNA sinnvoll erscheinen. Ebenso ist damit definiert, für welches Zytokin auf posttranskriptioneller und translationeller Ebene weitere Untersuchungen notwendig erscheinen, um ihre regulative (luteolytische) Rolle im CL weiter zu verifizieren.

Hier steht sicherlich die bei anderen Spezies gemachte Beobachtung im Vordergrund, dass in zahlreichen in vitro-Untersuchungen eine hemmende Wirkung verschiedener Zytokine auf die FSH-, LH- und hCG-stimulierte Synthese von Östrogen und Progesteron deutlich wurde. Dies deutet darauf hin, dass die durch Gonadotropine regulierte Steroidbiosynthese in der Granulosaluteinzellkultur verschiedener Spezies zusätzlich noch von nichtsteroidalen Faktoren, einschließlich der Zytokine, moduliert werden kann.

5.3.2 Expression von IL-4

Die Expression der mRNA von IL-4 konnte im Lutealgewebe der Hündin zu keinen der gewählten Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden. Die Expression der bei jeder Untersuchung mitgeführten Positivkontrolle konnte dabei in allen Fällen mittels PCR und auch Sequenzierung nachgewiesen werden, so dass die erhaltenen Ergebnisse für ihre Zuverlässigkeit sprechen.

Dieses Resultat deutet darauf hin, dass IL-4 im Corpus luteum der Hündin beim physiologischen Zyklusverlauf keine regulative Bedeutung zukommt. Möglicherweise ist das Fehlen der Expression von IL-4 auf eine Gegenregulation durch TGF- β 1 zurückzuführen, da dieses die durch IL-4 induzierte Antwort zytotoxischer T-Zellen unterdrückt (HERRMANN & ABDI 1996).

Untersuchungen beim Menschen belegen, dass der Nachweis von IL-4 weder im peripheren Blut (AL-HARTHI et al. 2000, BOUMAN et al. 2001) noch in der Lutealzellkultur (HASHII et al. 1998) während des Zyklusverlaufes Schwankungen unterlegen ist. Jedoch konnte ein Anstieg von IL-4 unter Kokultivierung von Granulosaluteinzellen mit mononukleären Zellen bei graviden Frauen beobachtet werden, so dass es – wie HASHII et al. (1998) vermuten - bei der Umwandlung des Corpus luteum periodicum zum Corpus luteum graviditatis beteiligt sein könnte, ebenso wie an der Aufrechterhaltung des CL graviditatis.

Im Hinblick auf die von der Frau jedoch deutlich abweichende Steuerung der Lutealfunktion beim nicht-graviden und graviden Hund (s. Kap. 2.1.2), können entsprechende Schlussfolgerungen nicht gezogen werden.

5.3.3 Untersuchungen zur Expression von IL-6 und IFN- γ

IL-6:

Die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse der Expression von IL-6 im CL der Hündin gestaltet sich schwierig. Die Expression von IL-6 konnte im ersten Versuchsdurchlauf im CL von 5 verschiedenen Hündinnen, vorwiegend in der ersten Hälfte des Diöstrus, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten im zweiten Versuchsdurchlauf jedoch nicht bestätigt werden.

In der 3'-untranslatierten Region von caninem IL-6 wurden 5 Kopien des Pentamers AUUUA entdeckt, welche die Fähigkeit besitzen sollen, die Stabilität der mRNA zu reduzieren und den nukleären Transport zu beschleunigen (KUKIELKA et al. 1995), so dass

ein Abbau der mRNA für die Nichtreproduzierbarkeit der Ergebnisse ab einem bestimmten Zeitpunkt verantwortlich sein könnte, insbesondere dann, wenn die Proben mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden. Dafür sprechen auch die mit der Positivkontrolle erhaltenen Ergebnisse, die nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren eine Abnahme in der Signalintensität der PCR-Produkte zeigten.

Ein solches Ergebnis könnte sich auch daraus erklären, dass die Expression von IL-6 im Lutalgewebe auf einem so niedrigen Niveau abläuft, dass sie selbst durch die RT-PCR nur schwer erfasst werden kann. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Expression von IL-6 im CL der Hündin ergeben demnach allenfalls Hinweise auf eine Expression auf niedrigem Niveau.

IFN- γ :

Analog zu IL-6 ist auch für IFN- γ die Interpretation des Ergebnisses der Expression dieses Zytokins im CL der Hündin problematisch. Einerseits konnte IFN- γ im CL von 10 verschiedenen Hündinnen im ersten Versuchsdurchlauf eindeutig nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.2.2. und 4.3.7), andererseits konnten diese Ergebnisse in einem weiteren Versuchsdurchlauf nicht reproduziert werden. Auch hier stellt sich die Frage, ob dieses Zytokin von den im Lutalgewebe ansässigen Zellen auf einem derart niedrigen Niveau exprimiert wird, dass es selbst durch die RT-PCR nur schwer erfasst werden kann. Eine solche auf niedrigem Niveau ablaufende Expression in Verbindung mit einem Abbau der mRNA nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen könnte das erhaltene Ergebnis erklären. Auch aus dem Blut stammende Leukozyten, die bei der Isolierung miterfasst wurden, könnten zu diesem Ergebnis geführt haben.

Die durchgeführten Untersuchungen geben daher keinen abschließenden Hinweis auf eine Expression von IFN- γ im CL der Hündin. Eine weitere Verifizierung der erhaltenen Befunde an frischem Probenmaterial erscheint daher notwendig.

5.3.4 Expression von IL-1 β und IL-2

Obwohl die Expression von IL-1 β und IL-2 mit den in dieser Untersuchung verwendeten Primerpaaren im Gehirn von an Staupe erkrankten Hunden (FRISK et al. 1999) und in den Con A stimulierten Lymphozyten vom Hund sowohl bei GRÖNE et al. (1999) als auch in den vorliegenden Untersuchungen jeweils eindeutig positive Resultate lieferte, zeigten sich sowohl für IL-1 β als auch für IL-2 im Lutealgewebe bei einigen Hündinnen unspezifische Produkte, d.h. Amplifikate, deren Basensequenz von ca. 290 bp unterhalb der erwarteten Amplifikate für IL-1 β (323 bp) bzw. oberhalb (ca. 400 bp) der erwarteten Amplifikate (366 bp) für IL-2 lagen. Die Entstehung der Amplifikate mit einer kürzeren bzw. längeren Basensequenz kann möglicherweise damit erklärt werden, dass aufgrund der Beschaffenheit der Matrize (Lutealgewebe) Ableseprobleme aufgetreten sind.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen jedoch eher vermuten, dass die mRNA der Zytokine IL-1 β und IL-2 im Lutealgewebe der Hündin im Verlauf des physiologischen Diöstrus nicht exprimiert wird.

Die Expression der mRNA von IL-2 wurde auch im bovinen CL von PETROFF et al. (1999) untersucht; wie in den eigenen Untersuchungen ergaben sich jedoch ebenfalls lediglich unspezifische Produkte.

Anders als in den eigenen Untersuchungen konnte im bovinen CL während der gesamten Lutealphase (PETROFF et al. 1999) sowie in humanen Granulosaluteinzellen (PIQUETTE et al. 1994) die mRNA von IL-1 β nachgewiesen werden. Hinsichtlich der biologischen Wirkungen wurden für IL-1 β inhibitorische Effekte auf die Progesteron- und Östrogensekretion bei Rind und Schwein (TOWNSON & PATE 1994; PITZEL et al. 1993) sowie stimulierende Effekte auf die Prostaglandinsynthese bei Mensch, Rind, Schwein und Nager (WATANABE et al. 1993; NOTHNICK & PATE 1990; PITZEL et al. 1993; KOKIA et al. 1992) beobachtet und es wurde daher postuliert (PATE 1995), dass es bei der Luteolyse eine nicht unerhebliche Rolle spielen könnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu anderen Spezies sind beim Hund die die Luteolyse steuernden Mechanismen noch weitgehend unklar. Dazu durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass zumindest bei der ingraviden Hündin und anders als z.B. bei den landwirtschaftlichen Nutztieren, die Luteolyse nicht durch ein uterines Luteolysin ($\text{PGF}_{2\alpha}$) initiiert wird.

Dies legte die Vermutung nahe, dass die Lutealfunktion und insbesondere die luteale Regression bei der Hündin parakrinen und/oder autokrinen Steuerungsmechanismen unterlegen ist. Sowohl der immunhistologische Nachweis als auch der Nachweis der Expression der mRNA von Progesteron- und Östrogenrezeptoren im CL der Hündin haben erstmals eine solche Rolle für luteales Progesteron und Estradiol- 17β erkennen lassen.

Ebenso konnte in vorausgehenden Untersuchungen der immunhistologische Nachweis von CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten sowie von MHC Klasse II exprimierenden Makrophagen im CL der Hündin nachgewiesen werden. Dabei wurde ein Anstieg der CD8-positiven Population sowie der MHC Klasse II exprimierenden Population zum Zeitpunkt der einsetzenden Luteolyse beobachtet. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression der von diesen Immunzellen sezernierten Zytokine ermittelt werden. Um erste Erkenntnisse über das Expressionsmuster von Zytokinen im CL der Hündin zu gewinnen, wurde dabei ein breites Spektrum an Zytokinen zu definierten Zeitpunkten im Diöstrus im Rahmen ansteigender und wieder abfallender Progesteronkonzentrationen mittels RT-PCR untersucht.

Dazu wurden jeweils 5 Hündinnen an den Tagen 5, 15, 25 und zwischen dem 60.-80. Tag sowie jeweils 4 Hündinnen an den Tagen 35 und 45 nach der Ovation einer Ovariohysterektomie unterzogen. Die Corpora lutea wurden möglichst vollständig vom umgebenden Ovargewebe separiert, in Tissue Tec® bzw. RNAlater™ eingebettet und bei -80°C gelagert. Die komplette RNA wurde mit Trizol® Reagent isoliert und einer Behandlung mit DNase unterzogen, um Rückstände genomischer DNA zu eliminieren. Danach wurde die RNA unter Verwendung des RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer) in cDNA umgeschrieben und anschließend unter Verwendung spezifischer caniner Primer für IL- 1β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ und TGF- β 1 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igem Agarosegel, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, sichtbar gemacht.

Als Positivkontrolle diente RNA von mit Con A stimulierten caninen Leukozyten und das „Housekeeping Gene“ GAPDH. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von RNA mitgeführt, um eine Kontamination der Lösungen auszuschließen.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Untersuchung aller Proben nochmals wiederholt und durch Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte zusätzlich abgesichert.

Die mRNA der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 wurde mit gewissen individuellen und experimentell bedingten Variationen weitgehend unabhängig vom Untersuchungstag in beiden Versuchsdurchläufen relativ konstant exprimiert. Die Expression von TNF- α stellte sich dabei visuell im Vergleich zur Expression von IL-8, IL-10, IL-12 und TGF- β 1 insgesamt etwas schwächer dar. Die Untersuchungen zur Expression der mRNA von IL-4 ergaben in allen Proben eindeutig negative Ergebnisse. Entsprechend negativ verliefen die Untersuchungen zur Expression der mRNA von IL-1 β und IL-2, wobei der Erhalt unspezifischer Amplifikate eine abschließende Interpretation allerdings nicht erlaubt. Die Ergebnisse der Untersuchung zur Expression der mRNA von IL-6 und IFN- γ sind heterogen. So gelang der Nachweis bei einem Teil der Proben im 1. Versuchsdurchlauf, nicht mehr jedoch im 2. Versuchsdurchlauf. Nachdem die Richtigkeit des Amplifikates für IFN- γ durch Sequenzierung bestätigt wurde, muss derzeit davon ausgegangen werden, dass die Expression beider Zytokine auf so niedrigem Niveau verläuft, dass ihre Detektion an der Empfindlichkeitsgrenze des angewandten PCR-Verfahrens ist, insbesondere wenn im Rahmen des „Probenhandling“ mRNA verloren geht. Insgesamt gesehen scheinen die Untersuchungsergebnisse jedoch auf eine eher untergeordnete Rolle von IL-6 und IFN- γ im CL der Hündin hin zu deuten.

Die in vorliegender Untersuchung dargestellte Expression der mRNA von IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α und TGF- β 1 im CL der Hündin suggeriert, dass diese Zytokine eine möglicherweise modulatorische Funktion bei der Differenzierung, Aufrechterhaltung und Regression des CL besitzen könnten. Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-10 als luteotroper Faktor die Progesteronproduktion fördert, während TGF- β 1 sowohl luteotrope als auch luteolytische Eigenschaften zugesprochen werden. Wie TGF- β 1 scheint auch TNF- α die Differenzierung der Lutealzellen in der frühen Lutealphase zu fördern, während es in der späten Lutealphase die Apoptose durch zytotoxische Effekte zu induzieren scheint. Die Wirkung von IL-8 wird hauptsächlich in der Förderung der Angiogenese des sich entwickelnden CL gesehen.

Diese bei anderen Spezies gemachte Beobachtungen jedoch auf Vorgänge im CL bei der Hündin zu übertragen, wären zum gegenwärtigen Zeitpunkt rein spekulativ. Daher sind weitere Untersuchungen, z.B. in einem geeigneten in vitro-System oder der Nachweis des Bil-

dungsortes der Zytokine im CL mittels Immunhistochemie notwendig, um die Ergebnisse weiter zu verifizieren. Mangels geeigneter Antiseren konnten in vorliegender Arbeit diesbezügliche Ergebnisse nicht erhalten werden.

7 SUMMARY

Luteolysis in the dog is still poorly understood and different to other domestic animal species. At least in nonpregnant bitches luteolysis is not initiated by a luteolytic agent (PGF_{2α}) secreted from endometrium.

It was therefore postulated that paracrine and/or autocrine regulatory mechanisms are involved in luteal regression in the dog. Detection of progesterone- and estrogenreceptors in the CL of the dog on the protein- and mRNA-level have first indicated such a role for luteal progesterone and estradiol-17β.

Preceding immunohistological investigations have demonstrated the presence of CD4- and CD8-positive T-lymphocytes and also of MHC class II antigen positive cells in the CL of the bitch with an increase in the population of the CD8-positive and MHC class II positive cells towards luteolysis. The present investigation were therefore designed to detect by means of RNA-technology the expression of a broad spectrum of cytokines possibly secreted by these cells during the course of diestrus covering the periods of increasing and decreasing progesterone concentrations.

Five bitches were ovariectomised on days 5, 15, 25 and between days 60-80 after ovulation and 4 bitches on days 35 and 45 respectively. The corpora lutea were separated from surrounding ovarian tissue, embedded in Tissue Tec® or RNAlater™ and stored at -80°C. Total RNA was isolated using Trizol® Reagent and treated with DNase to eliminate genomic DNA. RNA was translated in cDNA using the RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer) and then amplified with canine specific primers for IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α, IFN-γ and TGF-β1. The amplicons were visualised on a 2 % ethidium bromide stained agarose gel.

RNA isolated from canine leukocytes stimulated with Con A and the “housekeeping gene” GAPDH were used as positive controls. To exclude contamination of solutions, water was used as a negative control instead of RNA.

For confirmatory purposes each sample was investigated a second time; the results were additionally confirmed by sequencing selected samples of positive PCR-products for each cytokine.

The expression of mRNA for IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α and TGF-β1 could be detected in all samples during the course of diestrus in both experimental runs without any obvious variations. Expression of TNF-α mRNA seemed to be weaker than expression of mRNA for IL-8,

IL-10, IL-12 or TGF- β 1. All tests for the expression of IL-4 were clearly negative. Also the expression of the mRNA of IL-1 β and IL-2 could not be detected although some unspecific amplicons showed up. Results concerning the expression of IL-6 and IFN- γ mRNA were ambiguous. Thus expression of IL-6 mRNA was clearly shown in 5 samples during the first run; however, results were negative during the second run performed several months later. Similarly expression of IFN- γ mRNA could only be demonstrated during one run. Based on the accuracy of the controls run in each assay it is assumed that expression of these two cytokines is at the lower limit of detection of the applied mRNA assay, particularly if a loss of mRNA is considered during the thawing and freezing procedures. In summary the importance of IL-6 and IFN- γ in the CL of the bitch rather seems to be negligible.

The expression of mRNA for IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α and TGF- β 1 suggests that they may have a modulatory function in differentiation, maintenance and regression of the canine CL. Other studies have shown that IL-10 acts as a luteotrophic agent by promotion of progesterone production while TGF- β 1 seemed to have luteotrophic as well as luteolytic properties. Similarly TNF- α seems to promote the differentiation of luteal cells in the earlier phases of diestrus while it induces apoptosis by cytotoxic effects in late diestrus. IL-8 seems to be mainly involved in promotion of angiogenesis by reorganising the CL in the early luteal phase. These observations may also apply to the canine CL. However, at present this remains merely speculative. Hence further investigations are necessary which should also include adequate in vitro systems and methods allowing the identification of the cytokine-producing cells. Due to the lack of adequate antisera the latter information could not be obtained during the course of these studies.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1996)

Immunologie.

Verlag Hans Huber; Bern, Göttingen, Toronto, Seattle

Adashi EY, Resnick CE (1986)

Antagonistic interactions of transforming growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation.

Endocrinology, 119: 1879-81

Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Purchio AF, Twardzik DR (1989)

Ovarian transforming growth factor-beta (TGF beta): cellular site(s) and mechanism(s) of action.

Mol Cell Endocrinol, 61: 247-56

Adashi EY, Resnick CE, Packman JN, Hurwitz A, Payne DW (1990)

Cytokine-mediated regulation of ovarian function: tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells.

Am J Obstet Gynecol, 162: 889-96

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990)

Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF).

FASEB J, 4: 2860-7

Al-Harhi L, Wright DJ, Anderson D, Cohen M, Matity Ahu D, Cohn J, Cu-Unvin S, Burns D, Reichelderfer P, Lewis S, Beckner S, Kovacs A, Landay A (2000)

The impact of the ovulatory cycle on cytokine production: evaluation of systemic, cervico-vaginal and salivary compartments.

J Interferon Cytokine Res, 20: 719-24

Alpizar E, Spicer LJ (1994)

Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle.

Biol Reprod, 50: 38-43

Andersen A, Simpson ME (1973)

The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle).

Geron-X, Inc, Los Altos, CA

Angstwurm MW, Gartner R, Ziegler-Heitbrock HW (1997)

Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle.

Cytokine, 9: 370-4

Arici A, Head JR, MacDonald PC, Casey ML (1993)

Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture.

Mol Cell Endocrinol, 94: 195-204

Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Engin O, Olive DL (1996)

Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells.

Endocrinology, 137: 3762-9

Bagavandoss P, Kunkel SL, Wiggins RC, Keyes PL (1988)

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum.

Endocrinology, 122:1185-7

Bagavandoss P, Wiggins RC, Kunkel SL, Remick DG, Keyes PL (1990)

Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits.

Biol Reprod, 42: 367-76

Baggiolini M, Loetscher P, Moser B (1995)

Interleukin-8 and the chemokine family.

Int J Immunopharmacol, 17: 103-8

Barnes A, Bee A, Bell S, Gilmore W, Mee A, Morris R, Carter SD (2000)

Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82.

Vet Immunol Immunopathol, 75: 9-25

Barrack ER (1997)

TGF beta in prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity.

Prostate, 31: 61-70

Belayet H, Kanayama N, Khatun S, Asahina T, Okada Y, Kitamura K, Kobayashi T, Terao T (2000)

Pharmacologic doses of interleukin 8 suppositories induce follicular maturation in rabbits.

Cytokine, 12: 361-7

Benyo DF, Pate JL (1992)

Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability.

Endocrinology, 130: 854-60

Best CL, Hill JA (1995)

Interleukin-1 alpha and -beta modulation of luteinized human granulosa cell oestrogen and progesterone biosynthesis.

Hum Reprod, 10: 3206-10

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997)

Cellular responses to interferon-gamma.

Annu Rev Immunol, 15: 749-95

Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist RS, Bierschwal CJ (1991)

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

Theriogenology, 35: 603-11

Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Faas MM (2001)

The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin.

Fertil Steril, 76: 555-9

Brännström M, Friden BE, Jasper M, Norman RJ (1999)

Variations in peripheral blood levels of immunoreactive tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) throughout the menstrual cycle and secretion of TNF alpha from the human corpus luteum.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 83:213-7

Brännström M, Giesecke L, Moore IC, van den Heuvel CJ, Robertson SA (1994):

Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy.

Biol Reprod, 50: 1161-7

Brännström M, Wang L, Norman RJ (1993)

Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat.

Biol Reprod, 48: 165-71

Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK (1993)

Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors.

J Exp Med, 178: 1223-30

Büsges F (2003)

Immunhistologischer Nachweis von Leukozyten, MHC II Antigen und Gefäßendothelien am Corpus luteum der Hündin im Verlauf des Zyklus.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus Liebig-Universität Gießen

Büttner M, Belke-Louis G, Rziha HJ, McInnes C, Kaaden OR (1998)

Detection, cDNA cloning and sequencing of canine interleukin 12

Cytokine, 10: 241-8

Buyalos RP, Watson JM, Martinez-Maza O (1992)

Detection of interleukin-6 in human follicular fluid.

Fertil Steril, 57: 1230-4

Calogero AE, Nicoletti F, Palumbo MA, Burrello N, Di Mauro M, Lunetta M, Bendtzen K, Cianci A (1998)

Macrophage-derived cytokines in the follicular fluids of women with infertility due to immunological causes. Elevated levels of interleukin 6 and low levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Cytokine, 10: 814-8

Campbell IL, Bizilj K, Colman PG, Tuch BE, Harrison LC (1986)

Interferon induces the expression of HLA-A, B, C but not HLA-DR on human pancreatic β -cells.

J Clin Endocrinol Metab, 62: 1101-09

Cannon JG, Dinarello CA (1985)

Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation.

Science, 227: 1247-9

Cantrell DA, Smith KA (1984)

The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model.

Science, 224: 1312-6

Carter SD, Barnes A, Gilmore WH (1999)

Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines.

Vet Immunol Immunopathol, 69: 201-14

Castro A, Castro O, Troncoso JL, Kohen P, Simon C, Vega M, Devoto L (1998)

Luteal leukocytes are modulators of the steroidogenic process of human mid-luteal cells.

Hum Reprod, 13: 1584-9

Chegini N, Flanders KC (1992)

Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human

ovarian tissue of various reproductive stages.

Endocrinology, 130: 1707-15

Chegini N, Williams RS (1992)

Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues.

J Clin Endocrinol Metab, 74: 973-80

Chen HF, Shew JY, Chao KH, Chang LJ, Ho HN, Yang YS (2000)

Luteinizing hormone up-regulates the expression of interleukin-1 beta mRNA in human granulosa-luteal cells.

Am J Reprod Immunol, 43: 125-33

Chen HL, Marcinkiewicz JL, Sancho-Tello M, Hunt JS, Terranova PF (1993)

Tumor necrosis factor- α gene expression in mouse oocytes and follicular cells.

Biol Reprod, 48: 707-14

Chen YJ, Feng Q, Liu YX (1999)

Expression of the steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor and their regulation by tumor necrosis factor α in rat corpora lutea.

Biol Reprod, 60: 419-27

Christopher B (2000)

Immunolocalization of transforming growth factor-beta 1 during follicular development and atresia in the mouse ovary.

Endocr J, 47: 475-480

Chudaska C, Schlegel W (1993)

The influence of growth factors on the prostaglandin synthesis in cultured rabbit luteal cells.

Horm Metab Res, 25: 301-4

Colditz IG (1990)

Effect of exogenous prostaglandin E2 and actinomycin D on plasma leakage induced by neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8.

Immunol Cell Biol, 68: 397-403

Concannon PW (1980)

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

J Reprod Fertil, 58: 407-10

Concannon PW (1993)

Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs.

J Reprod Fertil, Suppl, 47: 3-27

Concannon PW, Hansel W (1977)

Prostaglandin F₂α induced luteolysis, hypothermia and abortion in beagle bitches.

Prostaglandins, 13: 533-42

Concannon PW, McCann JP, Temple M (1989)

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

J Reprod Fert, Suppl, 39: 3-25

Concannon PW, Weinstein P, Whaley S, Frank D (1987)

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

J Reprod Fertil, 81: 175-80

Coskun S, Uzumcu M, Jaroudi K, Hollanders JM, Parhar RS, al-Sedairy ST (1998)

Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth.

Am J Reprod Immunol, 40: 13-8

Coutelier JP, Van Broeck J, Wolf SF (1995)

Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse.

J Virol, 69: 1955-8

Critchley HO, Kelly RW, Kooy J (1994)

Perivascular location of a chemokine interleukin-8 in human endometrium: a preliminary report.

Hum Reprod, 9: 1406-9

Critchley HOD, Jones RL, Lea RG, Drudy TA, Kelly RW, Williams ARW, Baird DT (1999)

Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy.

J Clin Endocrinol Metab, 84: 240-8

Daemen AJJM, Buurman WA, Linden CJVD, Groenewegen G, Kootstra G (1983/84)

Canine IL-2: Characterization and optimal conditions for production.

Vet Immunol Immunopathol, 5: 247-58

Darbon JM, Oury F, Laredo J, Bayard F (1989)

Hormone-induced differentiation in cultured rat granulosa cells.

Biochem Biophys Res Commun, 163: 1038-46

Dawood MY, Chellaram R, Khan-Dawood FS (1997)

Interleukin-1 beta inhibits in vitro pulsatile progesterone secretion and stimulates prostaglandin F2 alpha secretion by micro-retrodialyzed baboon corpus luteum.

Horm Metab Res, 29: 483-90

Day MJ (1996)

Expression of interleukin-1 β interleukin-6 and tumour necrosis factor α by macrophages in canine lymph nodes with mineral-associated lymphadenopathy, granulomatous lymphadenitis or reactive hyperplasia.

J Comp Path, 114: 31-42

de Carvalho Papa P (2001)

Darstellung von Estradiol-17 β - und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus Liebig-Universität Gießen

Del Vecchio RP, Sutherland WD (1997)

Prostaglandin and progesterone production by bovine luteal cells incubated in the presence or absence of the accessory cells of the corpus luteum and treated with interleukin-1 beta, indomethacin and luteinizing hormone.

Reprod Fertil Dev, 9: 651-8

Derman SG, Kol S, Ben-Shlomo I, Resnick CE, Rohan RM, Adashi EY (1999)

Transforming growth factor- β_1 is a potent inhibitor of interleukin-1 β action in whole ovarian dispersates.

J Endocrinol, 160: 415-23

Dinarello CA (1996)

Biologic basis for interleukin-1 in disease.

Blood, 87: 2095-147

Dodson WC, Schomberg DW (1987)

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

Endocrinology, 120: 512-6

Dumont FJ, Kastner CA (1994)

Transforming growth factor beta 1 inhibits interleukin-1-induced but enhances ionomycin-induced interferon-gamma production in a T cell lymphoma: comparison with the effects of rapamycin.

J Cell Physiol, 160: 141-53

Dunham SP, Argyle DJ, Onions DE (1995)

The isolation and sequence of canine interleukin-2.

DNA Seq, 5: 177-80

Endo T, Kanayama K (1997)

Effects of TNF-alpha injection into the ovary on blood progesterone concentration in pseudo-

pregnant rabbits.

J Med, 28: 405-10

Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R (1998)

Chemokines IL-8, GRO alpha, MCP-1, IP-10 and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing.

Am J Pathol, 153: 1849-60

Engelhardt H, Tekpetey FR, Gore-Langton RE, Armstrong DT (1992)

Regulation of steroid production in cultured porcine thecal cells by transforming growth factor-beta.

Mol Cell Endocrinol, 85: 117-126

Eramaa M, Ritvos O (1996)

Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 induce inhibin and activin beta B-subunit messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells.

Fertil Steril, 65: 954-60

Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M (1988)

Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene.

J Biol Chem, 263: 15335-41

Evagelatou M, Peterson SL, Cooke BA (1997)

Leukocytes modulate 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD) activity in human granulosa-lutein cell culture.

Mol Cell Endocrinol, 133: 81-8

Faas M, Bouman A, Moesa H, Heineman MJ, de Leij L, Schuiling G (2000)

The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2 type response?

Fertil Steril, 74: 1008-13

Fairchild DL, Pate JL (1989)

Interferon-gamma induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine

luteal cells.

Biol Reprod, 40: 453-7

Fairchild DL, Pate JL (1991)

Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma.

Biol Reprod, 44: 357-363

Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC (1992)

Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis.

Am J Pathol, 140: 539-44

Feldman EC, Nelson RW (1987)

Canine and feline reproduction.

Canine and feline endocrinology and reproduction,

W. B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, pp: 399-480

Feng P, Catt KJ, Knecht M (1986)

Transforming growth factor beta regulates the inhibitory actions of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation.

J Biol Chem, 261: 14167-70

Fernandes PA, Bowen RA, Kostas AC, Sawyer HR, Nett TM, Olson PN (1987)

Luteal function in the bitch; changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptor for luteinizing hormone and prolactin.

Biol Reprod, 37: 804-11

Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W, Dolken G (1993)

An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR.

Biotechniques, 14: 448-53

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A (1991)

IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.

J Immunol, 146: 3444-51

Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP (1998)

Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues.

Anim Biotechnol, 9: 67-78

Friedman A, Weiss S, Levy N, Meidan R (2000)

Role of tumor necrosis factor α and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells.

Biol Reprod, 63: 1905-12

Frisk AL, Baumgärtner W, Gröne A (1999)

Dominating interleukin-10 mRNA expression induction in cerebrospinal fluid cells of dogs with natural canine distemper virus induced demyelinating and non-demyelinating CNS lesions.

J Neuromimmunol, 97: 102-9

Fujita T, Reis LF, Watanabe N, Kimura Y, Taniguchi T, Vilcek J (1989)

Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways.

Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 9936-40

Fukuoka M, Mori T, Taii S, Yasuda K (1988)

Interleukin-1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture.

Endocrinology, 122 (Suppl 1): 367-9

Fukuoka M, Taii S, Yasuda K, Takakura K, Mori T (1989)

Inhibitory effects of interleukin-1 on luteinizing hormone-stimulated adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation by cultured porcine granulosa cells.

Endocrinology, 125: 136-43

Fukuoka M, Yasuda K, Emi N, Fujiwara H, Iwai M, Takakura K, Kanzaki H, Mori T (1992b)

Cytokine modulation of progesterone and estradiol secretion in cultures of luteinized human granulosa cells.

J Clin Endocrinol Metab, 75: 254-8

Fukuoka M, Yasuda K, Fujiwara H, Kanzaki H, Mori T (1992a)

Interactions between interferon γ , tumour necrosis factor α , and interleukin-1 in modulating progesterone and oestradiol production by human luteinized granulosa cells in culture.

Hum Reprod, 7: 1361-4

Gangrade BK, Gotcher ED, Davis JS, May JV (1993)

The secretion of transforming growth factor-beta by bovine luteal cells in vitro.

Mol Cell Endocrinol, 93: 117-23

Gangrade BK, May JV (1990)

The production of transforming growth factor-beta in the porcine ovary and its secretion in vitro.

Endocrinology, 127: 2372-80

Gazvani MR, Bates M, Vince G, Christmas S, Lewis-Jones DI, Kingsland C (2000)

Follicular fluid concentrations of interleukin-12 and interleukin-8 in IVF cycles.

Fertil Steril, 74: 953-8

Gazvani MR, Christmas S, Quenby S, Kirwan J, Johnson PM, Kingsland CR (1998)

Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease.

Hum Reprod, 13: 1957-61

Gerber JD, Brown AL (1974)

Effect of development and aging on the response of canine lymphocytes to phytohemagglutinin.

Infect Immun, 10: 695-9

Gillis S, Mochizuki DY, Conlon PJ, Hefeneider SH, Ramthun CA, Gillis AE, Frank MB, Henney CS, Watson JD (1982)

Molecular characterization of interleukin 2.

Immunol Rev, 63: 167-209

Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozián D, Augustin HG (1998)

Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis.

Lab Invest, 78: 1385-94

Gondolf C (1994)

Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natural Killer (NK)- und Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)- Zellen aus dem peripheren Blut des Hundes.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus Liebig-Universität Gießen

Gorospe WC, Hughes FM Jr, Spangelo BL (1992)

Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro.

Endocrinology, 130: 1750-2

Gorospe WC, Tuchel T, Kasson BG (1988)

Gamma-interferon inhibits rat granulosa cell differentiation in culture.

Biochem Biophys Res Commun, 157: 891-7

Gottschall PE, Katsuura G, Arimura A (1989)

Interleukin-1 suppresses follicle-stimulating hormone-induced estradiol secretion from cultured ovarian granulosa cells.

J Reprod Immunol, 15: 281-90

Gottschall PE, Katsuura G, Dahl RR, Hoffmann ST, Arimura A (1988)

Discordance in the effects of interleukin-1 on rat granulosa cell differentiation induced by follicle-stimulating hormone or activators of adenylate cyclase.

Biol Reprod, 39: 1074-85

Gottschall PE, Uehara A, Hoffmann ST, Arimura A (1987)

Interleukin-1 inhibits follicle stimulating hormone-induced differentiation in rat granulosa

cells in vitro.

Biochem Biophys Res Commun, 149: 502-9

Gräf KJ (1978)

Serum oestrogen and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs.

J Reprod Fertil, 52: 9-14

Grasso G, Asano A, Minagawa T, Tanaka T, Fujimoto S, Muscettola M (1994)

Immunohistochemical localization of interferon-gamma in normal human ovary.

Gynecol Endocrinol, 8: 161-8

Gröne A, Fonfara S, Markus S, Baumgärtner W (1999)

RT-PCR Amplification of Various Canine Cytokines and So-called House-keeping Genes in a Species-Specific Macrophage Cell Line (DH82) and Canine Peripheral Blood Leukocytes.

J Vet Med B, 46:301-310

Gröne A, Weckmann MT, Capen CC, Rosol TJ (1996)

Canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complementary DNA: polymerase chain reaction amplification, cloning, partial sequence analysis, and use as loading control in ribonuclease protection assays.

American Journal of Veterinary Research, 57:254-7

Hales DB, Diemer T, Hales KH (1999)

Role of cytokines in testicular function.

Endocrine, 10: 201-17

Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N, Yamada S, Hirano T, Mori T, Fujii S, Maeda M (1998)

Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin 10 in corpus luteum function and differentiation.

Hum Reprod, 13:2738-44

Hehnke-Vagnoni KE; Clark CL, Taylor MJ, Ford SP (1995)

Presence and localization of tumor necrosis factor alpha in the corpus luteum of nonpregnant and pregnant pigs.

Biol Reprod, 53: 1339-44

Herrmann S, Abdi K (1996)

Both IL-2 and IL-4 synergize with IL-12 to induce a CTL response, a response completely blocked by TGF-beta.

Ann N Y Acad Sci, 795: 168-80

Hill JA, Welch WR, Faris HM, Anderson DJ (1990)

Induction of class II major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma: potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure.

Am J Obstet Gynecol, 162: 534-40

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al. (1986)

Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.

Nature, 324: 73-6

Hoffmann B, Büttner G (1998)

Biochemical and immunohistochemical investigations on the occurrence of the estrogen receptor in the canine uterus during the estrous cycle.

Exp Clin Endocrinol Diabetes, 106, Suppl 1: 42

Hoffmann B, Höveler R, Hasan SH, Failing K (1992)

Investigations on ovarian and pituitary function in the dog following hysterectomy.

J Reprod Fertil, 96: 837-845

Hoffmann B, Kyrein HJ, Ender ML (1973)

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.

Hormone Research, 4: 302-310

Hoffmann B, Riesenbeck A, Klein R (1996)

Reproductive endocrinology of bitches.

Anim Reprod Sci, 42: 275-88

Hoffmann B, Schneider S (1993)

Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog.

J Reprod Fertil Suppl, 47: 85-91

Hu X, Zuckerman KS (2001)

Transforming growth factor: signal transduction pathways, cell cycle mediation and effects on hematopoiesis.

J Hematother Stem Cell Res, 10: 67-74

Hurteau J, Rodriguez GC, Whitaker RS, Shah S, Mills G, Bast RC, Berchuck A (1994)

Transforming growth factor-beta inhibits proliferation of human ovarian cancer cells obtained from ascites.

Cancer, 74: 93-9

Hurwitz A, Finci-Yeheskel Z, Dushnik M, Milwidsky A, Shimonovitz S, Yagel S, Adashi EY, Mayer M (1995)

Interleukin-1-mediated regulation of plasminogen activation in pregnant mare serum gonadotropin-primed rat granulosa cells is independent of prostaglandin production.

J Soc Gynecol Investig, 2: 691-9

Hurwitz A, Finci-Yeheskel Z, Yagel S, Shimonovitz S, Laufer N, Adashi EY, Mayer M (1997)

Interleukin-1 β inhibits progesterone accumulation in rat corpora luteal cell cultures in a mechanism dissociated from its effects on nitric oxide and prostaglandin E accumulation.

Mol Cell Endocrinol, 133: 41-8

Hurwitz A, Loukides J, Ricciarelli E, Botero L, Katz E, McAllister JM, Garcia JE, Rohan R, Adashi EY, Hernandez ER (1992)

Human intraovarian interleukin-1 (IL-1) system: highly compartmentalized and hormonally dependent regulation of the genes encoding IL-1, its receptor and its receptor antagonist.

J Clin Invest, 89: 1746-54

Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM (1987)

Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine activin-A on granulosa cell differentiation.

Biochem Biophys Res Commun, 146: 1405-12

Ihle JN, Kerr IM (1995)

Jaks and stats in signaling by the cytokine receptor superfamily.

Trends Genet, 11: 69-74

Ito A, Imada K, Sato T, Kubo T, Matsushima K, Mori Y (1994)

Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix.

Biochem J, 301: 183-6

Jacobsen SE, Veiby OP, Smeland EB (1993)

Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells.

J Exp Med, 178: 413-8

Jenab S, Morris PL (1997)

Transcriptional regulation of sertoli cell immediate early genes by interleukin-6 and interferon- γ is mediated through phosphorylation of STAT-3 and STAT-1 proteins.

Endocrinol, 138: 2740-6

Ji I, Slaughter RG, Ellis JA, Ji TH, Murdoch WJ (1991)

Analyses of ovine corpora lutea for tumor necrosis factor mRNA and bioactivity during prostaglandin-induced luteolysis.

Mol Cell Endocrinol, 81: 77-80

Jo T, Terada N, Takauchi Y, Saji F, Nishizawa Y, Tanaka S, Kosaka H (1995)

Cytotoxic actions of cytokines on cultured mouse luteal cells are independent of nitric oxide.

J Steroid Biochem Mol Biol, 55: 291-6

Juneja SC, Chegini N, Williams RS, Ksander GA (1996)

Ovarian intrabursal administration of transforming growth factor beta1 inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice.

Biol Reprod, 55: 1444-51

Kasson BG, Gorospe WC (1989)

Effects of interleukins 1, 2 and 3 on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of rat granulosa cells.

Mol Cell Endocrinol, 62: 103-11

Kato T, Yamane H, Nariuchi H (1997)

Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages.

Cell Immunol, 181: 59-67

Keck C, Rajabi Z, Pfeifer K, Bettendorf H, Brandstetter T, Breckwoldt M (1998)

Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptors in human granulosa lutein cells.

Mol Hum Reprod, 4: 1071-6

Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brouwer S, Calder AA (1994)

Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition.

Hum Reprod, 9: 253-8

Kelso A (1995)

Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?

Immunol Today, 16: 374-9

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995)

Interleukin-6 family of cytokines and gp130.

Blood, 86:1243-54

Knapp DW, Williams JS, Andrisani OM (1995)

Cloning of the canine interleukin-2-encoding cDNA.

Gene, 159: 281-2

Ko TC, Sheng HM, Reisman D, Thompson EA, Beauchamp RD (1995)

Transforming growth factor-beta 1 inhibits cyclin D1 expression in intestinal epithelial cells.

Oncogene, 10: 177-84

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM (1992)

Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.

Science, 258: 1798-1801

Kohen P, Castro A, Caballero-Campo P, Castro O, Vega M, Makrigrannakis A, Simon C, Carvallo P, Devoto L (1999)

Interleukin-1 (IL-1) is a modulator of human luteal cell steroidogenesis: localization of the IL type I system in the corpus luteum.

J Clin Endocrinol Metab, 84: 4239-45

Kokia E, Hurwitz A, Ricciarelli E, Tedeschi C, Resnick CE, Mitchell MD, Adashi EY (1992)

Interleukin-1 stimulates ovarian prostaglandin biosynthesis: evidence for heterologous contact-independent cell-cell interaction.

Endocrinology, 130: 3095-7

Kol S, Donesky BW, Ruutiainen-Altman K, Ben-Shlomo I, Irahara M, Ando M, Rohan RM, Adashi EY (1999)

Ovarian interleukin-1 receptor antagonist in rats: gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of interleukin-1 action.

Biol Reprod, 61: 274-82

Kondo H, Maruo T, Mochizuki M (1995)

Immunohistochemical evidence for the presence of tumor necrosis factor- α in the infant and adult human ovary.

Endocr J, 42: 771-80

Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Aoki M, Kasahara K, Morimoto N (2001)

Atopy and mutations of IL-12 receptor β chain gene.

Clin Exp Allergy, 31: 1189-93

Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML (1995)

Induction of Interleukin-6 synthesis in the myocardium.

Circulation, 92: 1866-75

Kuwano K, Hara N (2000)

Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family.

Am J Respir Cell Mol Biol, 22: 147-49

Lanzavecchia A (1993)

Identifying strategies for immune intervention.

Science, 260: 937-44

Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989)

Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor.

Immunology, 68: 31-6

Le Page C, Genin P, Baines MG, Hiscott J (2000)

Interferon activation and innate immunity.

Rev Immunogenet, 2: 374-86

Lein DH, Concannon PW, Hornbuckle WE, Gilbert RO, Glendening JR, Dunlap HL (1989)

Termination of pregnancy in bitches by administration of prostaglandin F₂alpha.
J Reprod Fertil Suppl, 39: 231-40

Liebermann J, Schams D, Miyamoto A (1996)

Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrus cycle and pregnancy in vitro.
Reprod Fertil Dev, 8: 1003-11

Loercher AE, Nash MA, Kavanagh JJ, Platsoucas CD, Freedman RS (1999)

Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells.
J Immunol, 163: 6251-60

Loret de Mola JR, Flores JP, Baumgardner GP, Goldfarb JM, Gindlesperger V, Friedlander MA (1996)

Elevated interleukin-6 levels in the ovarian hyperstimulation syndrom: ovarian immunohistochemical localization of interleukin-6 signal.
Obstet Gynecol, 87: 581-7

Loy R, Loukides J, Polan M (1992)

Ovarion steroids modulate human monocyte tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes.
Fertil Steril, 58: 730-3

Lu P, Zucker K, Fuller L, Tzakis A, Esquenazi V, Miller J (1995)

Cloning and expression of canine interleukin-10.
J Interferon Cytokine Res, 15: 1103-9

Luo L, Ibaragi T, Maeda M, Nozawa M, Kasahara T, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Saito S (2000)

Interleukin-8 levels and granulocyte counts in cervical mucus during pregnancy.

Am J Reprod Immunol, 43: 78-84

Machelon V, Emilie D, Lefevre A, Nome F, Durand-Gasselien I, Testart J (1994a)

Interleukin-6 biosynthesis in human preovulatory follicles: some of its potential roles at ovulation.

J Clin Endocrinol Metab, 79: 633-42

Machelon V, Nome F, Salesse R (1994b)

Comparative IL-6 effects on FSH and hCG-induced functions in porcine granulosa cell cultures.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 40: 373-80

Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shirashi A (1995)

TGF- β enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice.

J Immunol, 155: 4926-32

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S (1993)

Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.

J Exp Med, 177: 1199-204

Manning AM, Auchampach JA, Drong RF, Slightom JL (1995)

Cloning of a canine cDNA homologous to the human transforming growth factor- β 1-encoding gene.

Gene, 155: 307-8

Maskill JK, Laird SM, Okon M, Li TC, Blakemore AI (1997)

Stability of serum interleukin-10 levels during the menstrual cycle.

Am J Reprod Immunol, 38: 339-42

Massague J, Wotton D (2000)

Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system.

EMBO J, 19: 1745-54

Matsubara H, Ikuta K, Ozaki Y, Suzuki Y, Suzuki N, Sato T, Suzumori K (2000)

Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells.

J Clin Endo Metab, 85: 1620-6

Matsumoto Y, Mohamed A, Onodera T, Kato H, Ohashi T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A, Furusawa S, Yoshihara K, et al. (1994):

Molecular cloning and expression of canine interleukin 8 cDNA.

Cytokine, 6: 455-61

Matsuyama S, Shiota K, Takahashi M (1990)

Possible role of transforming growth factor-beta as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures.

Endocrinology, 127: 1561-7

Matsuyama S, Takahashi M (1995)

Immunoreactive (ir)-transforming growth factor (TGF)- β in rat corpus luteum: ir-TGF β is expressed by luteal macrophages.

Endocr J, 42: 203-17

Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E, Germann T (1993)

The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer.

Eur J Immunol, 23: 2202-8

Mazzeo D, Vigano P, Di Blasio AM, Sinigaglia F, Vignali M, Panina-Bordignon P (1998)

Interleukin-12 and its free p40 Subunit regulate immune recognition of endometrial cells: potential role in endometriosis.

J Clin Endocrinol Metab, 83: 911-6

Milne SA, Critchley HOD, Drudy TA, Kelly RW, Baird DT (1999)

Perivascular interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression in human endometrium varies across the menstrual cycle and in early pregnancy decidua.

J Clin Endocrinol Metab, 84: 2563-7

Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D (1992)

Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro.

J Endocrinol, 135:103-14

Montaldo PG, Carbone R, Corrias MV, Ferraris PC, Ponzoni M (1994)

Synergistic differentiation-promoting activity of interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha: role of receptor regulation on human neuroblasts.

J Natl Cancer Inst, 86: 1694-701

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993)

Interleukin-10.

Annu Rev Immunol, 11: 165-90

Morgan DA, Russette FW, Gallo RG (1976)

Selective in vitro growth of lymphocytes from normal human bone marrows.

Science, 193: 1007-8

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986)

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.

J Immunol, 136: 2348-57

Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E (1990)

Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis.

Proc Natl Acad Sci, 87: 3092-6

Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K (1994)

Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression.

J Leukocyte Biol, 56: 554-8

Nariai K, Kanayama K, Endo T, Tsukise A (1995)

Effects of TNF-alpha injection into the ovarian parenchyma on luteal blood vessels in rabbits.
Endocr J, 42: 761-6

Narko K, Ritvos O, Ristimäki A (1997)

Induction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F_{2α} receptor expression by interleukin-1β in cultured human granulosa-luteal cells.
Endocrinol, 138: 3638-44

Narko K, Saukkonen K, Ketola I, Butzow R, Heikinheimo M, Ristimäki A (2001)

Regulated expression of prostaglandin E(2) receptors EP2 and EP4 in human ovarian granulosa-luteal cells.
J Clin Endocrinol Metab, 86: 1765-8

Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS (1999)

The role of cytokines in both the normal and malignant ovary.
Endocrine-Related Cancer, 6: 93-107

Niswender GD, Nett J (1988)

The corpus luteum and its control.
In: The Physiology of Reproduction, E. Knobil and J. D. Neill (ed.), Raven Press, New York, pp. 489-525

Nothnick WB, Pate JL (1990)

Interleukin-1β is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells.
Biol Reprod, 43: 898-903

O'Shea JD, Rodgers RJ, D'Occhio MJ (1989)

Cellular composition of cyclic corpus luteum of the cow.
J Reprod Fertil, 85: 483-7

Okkens AC, Bevers MM (1990)

Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog.

Veterinary Quarterly, 12: 193-201

Okkens AC, Dieleman DJ, Bevers MM, Lubberink AAME, Willemse AH (1986)

Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog.

J Reprod Fertil, 77: 187-92

Okuda Y, Xiao-Rong S, Morris PL (1994)

Interleukin-6 (IL-6) mRNAs expressed in leydig and sertoli cells are regulated by cytokines, gonadotropins and neuropeptides.

Endocrine, 2: 617-24

Olson PN, Bowen RA, Behrendt MO, Olson JD, Nett TM (1984)

Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrus bitches before and after hysterectomy.

Am J Vet Res, 45: 149-53

Onclin K, Verstegen JP (1997a)

In vivo investigation of luteal function in dogs: effect of cabergoline, a dopamine agonist and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and –diestrus.

Domest Anim Endocrinol, 14: 25-38

Onclin K, Verstegen JP (1997b)

Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches.

J Reprod Fertil, Suppl, 51: 203-8

Orava M, Voutilainen R, Vihko R (1989)

Interferon- γ inhibits steroidogenesis and accumulation of mRNA of the steroidogenic enzymes P450_{ssc} and P450_{C17} in cultured porcine leydig cells.

Mol Endocrinol, 3: 887-894

Orvieto R, Genazzani AR, Petraglia F, Schwartz A, Shelef M, Ben-Rafael Z (1997)

Interleukin-2 production by cultured human granulosa cells.

Int J Fertil Womens Med, 42: 297-300

Pate JL (1995)

Involvement of immune cells in regulation of ovarian function.

J Reprod Fertil, Suppl, 49: 365-77

Penny LA, Armstrong D, Bramley TA, Webb R, Collins RA, Watson ED (1999)

Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis

J Reprod Fertil, 115:87-96

Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai JC, Hsieh CM, Kourembanas S, Lee ME (1994)

Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells.

J Biol Chem, 269: 14595-600

Petroff MG, Petroff BK, Pate JL (1999)

Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum.

Endocrinology, 140:1018-21

Petroff MG, Petroff BK, Pate JL (2001)

Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells.

J Reprod Fertil, 121: 753-60

Piccinni MP, Romagnani S (1996)

Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines.

Immunol Res, 15: 141-50

Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I, Pellegrini S, Livi C, Romagnani S, Maggi E (2001)

Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development.

Eur J Immunol, 31: 2431-7

Piquette GN, Simon C, el Danasouri I, Frances A, Polan ML (1994)

Gene regulation of interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor type I and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in human granulosa-luteal cells.

Fertil Steril, 62: 760-70

Pitzel L, Jarry H, Wuttke W (1993)

Effects and interactions of prostaglandin F2 alpha, oxytocin and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells.

Endocrinology, 132: 751-6

Polan ML, Loukides J, Nelson P, Carding S, Diamond M, Walsh A, Bottomly K (1989)

Progesterone and estradiol modulate interleukin-1 beta messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes.

J Clin Endocrinol Metab, 69: 1200-6

Polan ML, Loukides JA, Honig J (1994)

Interleukin-1 in human ovarian cells and in peripheral blood monocytes increases during the luteal phase: evidence for a midcycle surge in the human.

Am J Obstet Gynecol, 170: 1000-6

Prakash BS, Pedina J, Steiner A, Wuttke W (1997)

Demonstration of luteotrophic responses of human recombinant gamma interferon in porcine corpora lutea using an in-vivo microdialysis system.

J Steroid Biochem Molec Biol, 63: 189-94

Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP (1995)

Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells.

Biol Reprod, 52: 279-87

Quirk SM, Harman RM, Huber SC, Cowan RG (2000)

Responsiveness of mouse corpora luteal cells to Fas antigen (CD95)-mediated apoptosis.

Biol Reprod, 63: 49-56

Rabinovitch A, Baquerizo H, Sumoski W (1990)

Cytotoxic effects of cytokines on islet β -cells: evidence for involvement of eicosanoids.
Endocrinology, 126: 67-71

Ray P, Ghosh SK, Zhang DH, Ray A (1997)

Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor.
FEBS Lett, 409: 79-85

Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA (1992)

Angiogenesis in the female reproductive system.
FASEB J, 6: 886-92

Richards RG, Almond GW (1994a)

Tumour necrosis factor-alpha differentially alters progesterone and prostaglandin F2 alpha production by porcine luteal cells.
J Endocrinol, 143: 75-83

Richards RG, Almond GW (1994b)

Identification and distribution of tumor necrosis factor alpha receptors in pig corpora lutea.
Biol Reprod, 51: 1285-91

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH et al. (1986)

Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.
Proc Natl Acad Sci USA, 83: 4167-71

Roby KF, Son DS, Terranova PF (1999)

Alterations of events related to ovarian function in tumor necrosis factor receptor type I knockout mice.
Biol Reprod, 61: 1616-21

Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF (1990)

Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor- α .

J Clin Endocrinol Metab, 71: 1096-102

Roitt I, Brostoff J, Male D (1993)

Immunology, 3rd edition.

Mosby-Year Book Europe Ltd, England

Roy SK (2000)

Regulation of transforming growth factor- β -receptor type I and type II messenger ribonucleic acid expression in the hamster ovary by gonadotropins and steroids.

Biol Reprod, 62: 1858-65

Runesson E, Ivarsson K, Janson PO, Brännström M (2000)

Gonadotropin- and cytokine-regulated expression of the chemokine interleukin 8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle.

J Clin Endocrinol Metab, 85: 4387-95

Sagawa K, Mochizuki M, Sugita S, Nagai K, Sudo T, Itoh K (1996)

Suppression by IL-10 and IL-4 of cytokine production induced by two-way autologous mixed lymphocyte reaction.

Cytokine, 8: 501-6

Sakumoto R, Berisha B, Kawate N, Schams D, Okuda K (2000b)

Tumor necrosis factor- α and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle.

Biol Reprod, 62: 192-9

Sakumoto R, Murakami S, Okuda K (2000a)

Tumor necrosis factor- α stimulates prostaglandin F₂ α secretion by bovine luteal cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phospholipase A₂ pathways.

Mol Reprod Dev, 56: 387-91

Salmassi A, Lü S, Hedderich J, Oettinghaus C, Jonat W, Mettler L (2001)

Interaction of interleukin-6 on human granulosa cell steroid secretion.

J Endocrinol, 170: 471-8

Sancho-Tello M, Perez-Roger I, Imakawa K, Tilzer L, Terranova PF (1992)

Expression of tumor necrosis factor- α in the rat ovary.

Endocrinology, 130: 1359-64

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A, 74: 5463-7

Sato Y, Ohshima T, Kondo T (1999)

Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing.

Biochem Biophys Res Commun, 265: 194-9

Schams D (1992)

Regulation of bovine intra-luteal function by peptide hormones.

J Physiol Pharmacol, 43 (4 Suppl 1): 117-29

Schebitz H, Brass W (1985)

Ovariohysterektomie.

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

Schmid P, Cox D, van der Putten H, McMaster GK, Bilbe G (1994)

Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes.

Biochem Biophys Res Commun, 201: 649-56

Shaw DW, Britt JH (1995)

Concentrations of tumor necrosis factor alpha and progesterone within the bovine corpus luteum sampled by continuous-flow microdialysis during luteolysis in vivo.

Biol Reprod, 53: 847-54

Simon C, Frances A, Piquette G, Polan ML (1994)

Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation and luteinization.

Biol Reprod, 50: 449-57

Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta R, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dowe SK (1993)

Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type I receptor.

Proc Natl Acad Sci USA, 90: 6155-9

Sonnack M, Leiser R, Meyer W, Hoffmann B (2003)

Morphological changes in the regressing canine corpus luteum and the occurrence of apoptotic events.

Reproduction in Domestic Animals, 38:354-5

Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM (1989)

Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro.

Endocrinology, 125: 575-7

Srivastava MD, Lippes J, Srivastava BI (1996)

Cytokines of the human reproductive tract.

Am J Reprod Immunol, 36: 157-66

Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF (1997)

An essential role for C/EBPbeta in female reproduction.

Genes Dev, 11: 2153-62

Suter J, Hendry IR, Ndjountche L, Obholz K, Pru JK, Davis JS, Rueda BR (2001)

Mediators of interferon γ -initiated signalling in bovine luteal cells.

Biol Reprod, 64: 1481-6

Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT (1989)

Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 beta.

J Immunol, 142: 3134-9

Takehara Y, Dharmarajan AM, Kaufman G, Wallach EE (1994)

Effect of interleukin-1 β on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary.

Endocrinology, 134: 1788-93

Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, Yagita H, Okumura K, Hamaoka T, Trinchieri G, Fujiwara H (1997)

Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6 and IL-4.

J Leukoc Biol, 61: 80-7

Tamura K, Kawaguchi T, Hara T, Takatoshi S, Tohei A, Miyajima A, Seishi T, Kogo H (2000)

Interleukin-6 decreases estrogen production and messenger ribonucleic acid expression encoding aromatase during in vitro cytodifferentiation of rat granulosa cell.

Mol Cell Endocrinol, 170: 103-11

Tamura K, Kawaguchi T, Kogo H (2001)

Interleukin-6 inhibits the expression of luteinizing hormone receptor mRNA during the maturation of cultured rat granulosa cells.

J Endocrinol, 170: 121-7

Taylor MJ, Clark CL (1992)

Transforming growth factor- β is a potent inhibitor of basal and stimulated relaxin release by porcine luteal cells maintained in monolayer culture.

J Endocrinol, 135: 543-50

Teerds KJ, Dorrington JH (1992)

Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β 1 and - β 2 during follicular

development in the adult rat ovary.

Mol Cell Endocrinol, 84: R7-R13

Tekpetey FR, Armstrong DT (1991)

In vitro effects of interleukins 2 and 3 on progesterone production by porcine luteal cells.

Program of the 73rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Washington, DC, p 117 (Abstract)

Tekpetey FR, Engelhardt H, Armstrong DT (1993)

Differential modulation of porcine theca, granulosa and luteal cell steroidogenesis in vitro by tumor necrosis factor.

Biol Reprod, 48: 936-43

Telleria CM, Ou J, Sugino N, Gerguson S, Gibori G (1998)

The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid.

Endocrinology, 139: 3597-3605

Terranova PF (1997)

Potential roles of tumor necrosis factor- α in follicular development, ovulation and the life span of the corpus luteum.

Domest Anim Endocrinol, 14:1-15

Townson DH, Pate JL (1994)

Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1 β in cultured bovine luteal cells.

Biol Reprod, 51: 480-5

Townson DH, Pate JL (1996)

Mechanism of action of TNF- α -stimulated prostaglandin production in cultured bovine luteal cells.

Prostaglandins, 52: 361-73

Trinchieri G (1993)

Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells.

Immunol Today, 14: 335-8

**Van der Kaaij SY, Pinelli E, Broeren CPM, Schetters TPM, Haghparast A, Ruitenber
EJ, Rutten VPMG (1999)**

Molecular cloning and sequencing of the cDNA for dog interleukin-4.

Immunogenetics, 49: 142-3

Van Snick J (1990)

Interleukin-6: an overview.

Annu Rev Immunol, 8: 253-78

**Vinatier D, Dufour P, Tordjeman-Rizzi N, Prolongeau JF, Depret-Moser S, Monnier JC
(1995)**

Immunological aspects of ovarian function: role of cytokines.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 63:155-68

Vollmerhaus B, Sinowatz F, Amselgruber W (1994)

Weibliche Geschlechtsorgane

In: Anatomie von Hund und Katze; Hrsg: Josef Frewein und Bernd Vollmerhaus; Blackwell-
Wiss Verlag Berlin, pp. 224-40

Wang HZ, Lu SH, Han XJ, Zhou W, Sheng WX, Sun ZD, Gong YT (1992)

Inhibitory effect of interferon and tumor necrosis factor on human luteal function in vitro.

Fertil Steril, 58: 941-5

**Wang LJ, Brännström M, Cui KH, Simula AP, Hart RP, Maddocks S, Norman RJ
(1997)**

Localisation of mRNA for interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the
rat ovary.

J Endocrinol, 152: 11-7

Wang LJ, Brännström M, Pascoe V, Norman RJ (1995)

Cellular composition of primary cultures of human granulosa-lutein cells and the effect of
cytokines on cell proliferation.

Reprod Fertil Dev, 7: 21-6

Wang LJ, Robertson S, Seamark RF, Norman RJ (1991)

Lymphokines, including interleukin-2, alter gonadotropin-stimulated progesterone production and proliferation of human granulosa-luteal cells in vitro.

J Clin Endocrinol Metab, 72: 824-31

Watanabe H, Nagai K, Yamaguchi M, Ikenoue T, Mori N (1993)

Interleukin-1 beta stimulates prostaglandin E2 and F2 alpha synthesis in human ovarian granulosa cells in culture.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 49: 963-7

Williams BJ, Watts JR, Wright PJ, Shaw G, Renfree MB (1999)

Effect of sodium cloprostenol and flunixin meglumine on luteolysis and the timing of birth in bitches.

J Reprod Fertil, 116: 103-11

Wuttke W, Jarry H, Pitzel L, Knoke I, Spiess S (1993)

Luteotrophic and luteolytic actions of ovarian peptides.

Hum Reprod, 8, Suppl. 2: 141-6

Wuttke W, Spiess S, Knoke I, Pitzel L, Leonhardt S, Jarry H (1998)

Synergistic effects of prostaglandin F2 alpha and tumor necrosis factor to induce luteolysis in the pig.

Biol Reprod, 58: 1310-5

Xiao S, Findlay JK (1992)

Modulation of differentiation of rat granulosa cells in vitro by interferon-gamma.

J Endocrinol, 133: 131-9

Yan Z, Hunter V, Weed J, Hutchison S, Lyles R, Terranova P (1993)

Tumor necrosis factor-alpha alters steroidogenesis and stimulates proliferation of human ovarian granulosa cells in vitro.

Fertil Steril, 59: 332-8

Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M (1997)

Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis.

Mol Cell Biol, 17: 4015-23

Young JE, Friedman CI, Danforth DR (1997)

Interleukin-1 beta modulates prostaglandin and progesterone production by primate luteal cells in vitro.

Biol Reprod, 56: 663-7

Yu CL, Sun KH, Shei SC, Tsai CY, Tsai ST, Wang JC, Liao TS, Lin WM, Chen HL, Yu HS et al. (1994)

Interleukin 8 modulates interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release from normal human mononuclear cells.

Immunopharmacology, 27: 207-14

Zhao J, Buick RN (1995)

Regulation of transforming growth factor beta receptors in H-ras oncogene-transformed rat intestinal epithelial cells.

Cancer Res, 55: 6181-8

Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF, Brannian JD (1998)

Macrophages are the major source of tumor necrosis factor α in the porcine corpus luteum.

Biol Reprod, 59: 1385-91

Zolti M, Meirom R, Shemesh M, Wollach D, Mashiach S, Shore L, Ben Rafael Z (1990)

Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor- α .

FEBS LETTERS, 261: 253-5

Zucker K, Lu P, Esquenazi V, Miller J (1992)

Cloning of the cDNA for canine interferon- γ .

J Interferon Res, 12: 191-4

Zucker K, Lu P, Fuller L, Asthana D, Esquenazi V, Miller J (1994)

Cloning and expression of the cDNA for canine tumor necrosis factor-alpha in E. coli.

Lymphokine Cytokine Res, 13: 191-6

Zucker C, Zucker K, Asthana D, Carreno M, Viciano AL, Ruiz P, Esquenazi V, Nery J, Burke G, Miller J (1996)

Longitudinal induced IL-2 mRNA monitoring in renal transplant patients immunosuppressed with cyclosporine and in unmodified canine renal transplant rejection.

Hum Immunol, 45: 1-12

9 ANHANG

9.1 Verlauf der Progesteronkonzentrationen (P₄; ng/ml) im Blutplasma als Indikator für den Zeitpunkt der Ovulation

Tabelle 13: Gruppe OHE am *Tag 5* p. ov.

Pila		Asta		Zora 2		Marla		Tini	
Datum	P ₄								
16.11.99*	4,75	28.11.99*	3,72	10.01.00*	3,15	07.05.00*	4,56	31.10.01*	1,66
17.11.99	6,78	29.11.99	6,22	13.01.00	11,92	08.05.00	7,07	05.11.01	6,73
22.11.99	50,99	04.12.99	24,65	17.01.00	47,34	12.05.00	42,15	09.11.01	22,41

* unterstelltes Datum Tag 1 p. ov.

Blutprobe aus der V. ovarica

Tabelle 14: Gruppe OHE am *Tag 15* p. ov.

Pat 2		Kim		Fee		Tina		Rejca	
Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄
11.08.99*	3,03								
13.08.99	8,08	08.08.99*	3,63			21.04.99	3,14		
						*			
15.08.99	20,89	10.08.99	6,37	05.08.99*	2,89	23.04.99	7,38		
16.08.99	27,25	11.08.99	11,45	07.08.99	6,96	26.04.99	> 16,1	14.10.98	6,36
								*	
27.08.99	55,87	25.08.99	51,25	22.08.99	55,98	07.05.99	fehlt	29.10.98	51,78
27.08.99	181 [#]	25.08.99	801 [#]	22.08.99	813 [#]	07.05.99	[#] fehlt	29.10.98	[#] fehlt

* unterstelltes Datum Tag 1 p. ov.

Blutprobe aus der V. ovarica

Tabelle 15: Gruppe OHE am *Tag 25* p. ov.

Daisy¹		Luca		Lotte		Shila		Flo	
Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄
								23.05.99	2,02
								*	
								24.05.99	7,29
		14.06.99*	3,95					25.05.99	14,65
03.07.99*	5,13	15.06.99	9,41	18.10.01*	5,12	23.08.00*	2,60	04.06.99	33,10
07.07.99	50,17	17.06.99	33,58	21.10.01	20,07	25.08.00	6,15	11.06.99	43,26
28.07.99	9,13	10.07.99	70,23	12.11.01	26,42	18.09.00	fehlt	18.06.99	58,67
28.07.99	384 [#]	10.07.99	759 [#]			18.09.00	163 [#]	18.06.99	959,8 [#]

* unterstelltes Datum Tag 1 p. ov.

Blutprobe aus der V. ovarica

Tabelle 16: Gruppe OHE am *Tag 35* p. ov.

Fox		Oda		Timba		Maja	
Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄	Datum	P ₄
						19.05.99*	5,14
						20.05.99	12,03
						21.05.99	17,25
						04.06.99	36,75
05.08.99*	3,27			21.04.99*	9,45	11.06.99	48,55
06.08.99	5,25	03.08.99*	3,48	23.04.99	27,80	18.06.99	49,48
08.08.99	16,11	05.08.99	9,14	25.04.99	> 16,1	21.06.99	34,39
10.09.99	33,75	08.09.99	27,3	25.05.99	25,76	23.06.99	33,87

* unterstelltes Datum Tag 1 p. ov.

Blutprobe aus der V. ovarica

Tabelle 17: Gruppe OHE am *Tag 45* p. ov

Luna		Pat		Sinah		Gil	
Datum	P ₄						
				11.01.99*	2,13		
				13.01.99	8,62		
				15.01.99	18,70		
				17.01.99	34,39		
				19.01.99	32,41		
03.08.99*	5,08			22.01.99	52,6	29.05.99*	5,58
05.08.99	17,83	26.06.98*	4,68	26.01.99	75,4	31.05.99	25,22
17.09.99	21,01	12.08.98	15,73	26.02.99	25,7	13.07.99	29,34

* unterstelltes Datum Tag 1 p. ov.

Blutprobe aus der V. ovarica

9.2 komplette Sequenzen der untersuchten Zytokine

Komplette Sequenz von IL-8:

```

1   agaaagaac   cagaacgaag   gcaccttg   taacatgac   ttccaagctg   gctgttgctc
61  tcttggcagc   tttgtcctt   tetgcagctc   tctgtgaagc   tgcagttctg   tcaagagtca
121 gttcagaact   tcgatgccag   tgtataaaa   cactccac   accttccat   cccaatata
181 ttaagaact   gagagtgatt   gacagtggc   cacattgtga   aaactcagaa   atcattgtaa
241 agctttcaa   tggaaatgag   gtgtgcctgg   accccaagga   aaaatgggta   caaaagggtg
301 tgcagatatt   tctaaagaag   gctgagaaac   aagatccgtg   aaacaacaaa   cac

```

Komplette Sequenz von IL-10:

1	catgcatggc	tcagcactgc	tctgttgctg	cctggtcctc	ctggccgggg	tgggagccag
61	ccgacaccag	agcaccctac	ttgaggacga	ctgcaccac	ttcccagcca	gcctgcccc
121	catgctccga	gagctccgag	ctgccttcgg	gagggtgaag	atctctttc	aatgaagga
181	caagctggac	aacatactgc	tgaccgggtc	cctgctggag	gactttaaga	gttacctggg
241	ttgccaagcc	ctgtcggaga	tgatccagtt	ttacttgag	gaggtgatgc	cccgggctga
301	gaaccacgac	ccagacatca	agaaccacgt	gaactccctg	ggagagaagc	tcaagaccct
361	caggctgaga	ctgaggctgc	gacgctgtca	ccgatttctt	ccctgtgaga	ataagagcaa
421	ggcgggtggag	caggtgaaga	gcgcathtag	taagctccag	gagaaagggtg	tctacaagc
481	catgagtgag	ttgacatct	tcatcaacta	catagaaacc	tacatgacaa	tgaggatgaa
541	aatctgaaac	gtgctggaga	acaaaacacc	caggatggca	actcttctcg	actctaggac
601	atgaattgga	gatctgcaaa	ataccatccc	gagatgtagg	agagccgacc	aactgcttgg
661	agaaccccgt	catacctctc	tcttagaata	tttattactc	tgatacctca	actcccattt
721	gtatttattt	actgagcttc	tctgtgaa			

Komplette Sequenz von IL-12 p 40 Subunit:

1	atgcatcctc	agcagttggt	catctcctgg	tttccctcg	ttttgctggc	gtcttccctc
61	atgaccatat	gggaactgga	gaaagatggt	tatgtttag	agttggactg	gcaccctgat
121	gccccgggag	aatggtggt	cctcacctgc	catacccctg	aagaagatga	catcacttgg
181	acctcagcgc	agagcagtga	agtcttaggt	tctggtaaaa	ctctgaccat	ccaagtcaaa
241	gaatttgag	atgctggcca	gtatacctgc	cataaaggag	gcaaggttct	gagccgctca
301	ctcctgttga	ttcacaaaa	agaagatgga	atttggtcca	ctgatatctt	aaaggaacag
361	aaagaatcca	aaaataagat	ctttctgaaa	tgtgaggcaa	agaattattc	tggacgtttc
421	acatgctggt	ggctgacggc	aatcagtact	gatttgaat	tcagtgtcaa	aagtagcaga
481	ggcttctctg	acccccaaag	ggtgacatgt	ggagcagtga	cactttcagc	agagagggtc
541	agagtggaca	acagggatta	taagaagtac	acagtggagt	gtcaggaagg	cagtgcctgc
601	ccctctgccg	aggagagcct	acccatcgag	gtcgtggtgg	atgctattca	caagctcaag
661	tatgaaaact	acaccagcag	cttcttcac	agagacatca	tcaaaccaga	cccaccaca
721	aacctgcagc	tgaagccatt	gaaaaattct	cggcacgtgg	aggtcagctg	ggaatacccc
781	gacacctgga	gcaccacaca	ttcctacttc	tcctgacat	tttgcgtaca	ggcccagggc
841	aagaacaata	gagaaaagaa	agatagactc	tgcgtggaca	agacctcagc	caaggtcgtg
901	tgccacaagg	atgccaagat	ccgcgtgcaa	gcccagagacc	gctactatag	ttcatctggt
961	agcgactggg	catctgtgtc	ctgcagttag	gttccacccc	caggatgaat	cttgg

Sequenz von TNF- α :

1	tgtccagaca	gtcaaatcat	cttctcgaac	cccaagtgac	aagccagtag	ctcatgttgt
61	agcaaacc	gaagctgagg	ggcagctcca	gtggctgagc	cgacgtgcca	atgcctctct
121	ggccaacggc	gtggagctga	cagacaacca	gctgatagtg	ccgtcagatg	ggttgtacct
181	catctactcc	caggctctct	tcaagggcca	agggtgccct	tccacctatg	tgtctctcac
241	ccacaccatc	agccgcttcg	ccgtctccta	ccagacaaag	gtcaacctac	tctctgceat
301	caagagccct	tgccaaaggg	agaccccaga	ggggaccgag	gccaagccct	ggtacgagcc
361	catctacctg	ggaggggtct	tccaactgga	gaaggg		

Komplette Sequenz von TGF- β 1:

1	gaattcggca	cgagccccgc	tcgcgctctc	ggcagtgccg	ggggcgcccgc	ctccccatg
61	ccgcctccg	ggctgcggct	gctgccgctg	ctgctgccgc	tgtgcgggt	actagtctg
121	acgcctggcc	ggccggcccgc	cggactgtcc	acctgcaaga	ccatcgacat	ggaactggtg
181	aagcgggaagc	gcatcgaggc	catccgcggc	cagatcctgt	ccaagctgcg	gtctccagc
241	ccccgagcc	agggggaggt	gccgcccgtg	ccgctgcccg	aggccgtgct	ggcctctac
301	aacagcacc	gcgaccgggt	ggcgggggag	agcggcggagc	cggagcccga	gcccgaggcg
361	gactactacg	ccaaggaggt	caccgcgctg	ctaattgtgg	aaaacaccaa	caaatctat
421	gagaaagtca	agaaaagtcc	gcacagcata	tatatgctct	tcaacacatc	agagtccga
481	gaagcagtgc	ctgagcccgt	cttgctctcc	cgggcagagt	tgcgctgct	gaggctcaag
541	ttaaagcgg	agcagcatgt	ggagctgtac	cagaaatata	gcaatgattc	ctggcgctac
601	ctcagcaacc	ggctgctggc	gcccagcgac	acgccagaat	ggctgtcctt	tgatgtcact
661	ggagtcgtga	ggcagtggct	gagccatgga	ggggaagtgc	agggtttcg	cctcagtgcc
721	cactgttct	gtgacagcaa	agataacaca	ctgcaagtag	acattaacgg	gttcagttcc
781	agccgccgag	gtgacctggc	caccattcat	ggcatgaacc	gaccttctct	gtctctcatg
841	gccaccccac	tggagagggc	ccagcacctg	cacagctccc	ggcagcgccc	ggcctggac
901	accaactact	gcttcagctc	cacggagaag	aactgctgcg	tccggcagct	ctacattgac
961	ttccgaagg	atctgggctg	gaagtggatc	catgagccca	agggttacca	cgtaacttc
1021	tgctggggc	cctgccccta	catttgagc	ctggacacgc	agtacagcaa	ggtcctggcc
1081	ctgtacaacc	agcacaacc	gggcgcgctc	gcggcgccgt	gctgcgtgcc	gcaggcgctg
1141	gagccactgc	ccatcgtgta	ctactggggc	cgcaagccca	aggtggagca	gctgtcgaac
1201	atgatcgtgc	gctctgcaa	gtgcagctga	ggccccgcc	cgccggcag	gccccgcca
1261	ccggcaggnc	cgccccgcc	cccgccgct	gcgccgggct	gtatttaagg	acaccgccc
1321	ccaggcatcc	cccccatcc	cccggggctc	attaaaggtg	gagagaggg	

Komplette Sequenz von IL-6:

1	gccctcgagc	ccaccaggaa	cgaaagagag	ctccatctgc	cctccaggac	cccagctatg
61	aactccctct	ccacaagcgc	cttctccctg	gggctgctcc	tggatgagc	tactgctttc
121	cctaccccgg	gaccctggc	aggagattcc	aaggatgatg	ccactcaaa	tagtctacca
181	ctcacctctg	caaacaagt	ggaagaactg	attaagtaca	tcctcggcaa	aatctctgca
241	ctgagaaagg	agatgtgtga	caagttaac	aagtgtgaag	acagcaaaga	ggcactggca
301	gaaaataacc	tacatctcc	caactggag	ggaaaagatg	gatgctcca	atctgggttc
361	aatcaggaga	cctgcttgac	aagaatcact	accggcttg	tggagttca	gctacacctg
421	aatatcctcc	agaacaacta	tgagggtgat	aaggaaaatg	tcaagtctgt	gcatatgagt
481	accaagatcc	tggccagat	gctaaagagc	aaggtaaaga	atcaggatga	agtgaccact
541	cctgacccaa	ccacagacgc	cagcctgcag	gctatcttgc	agtcgcagga	tgagtgcgtg
601	aagcacacaa	caattcacct	catcctgcgg	agtctggagg	atctctgca	gttcagtctg
661	agggctgttc	ggataatgta	gcctgggcat	ctaagattgc	tgtagttcat	gggcattcct
721	ttctccagtc	agaaacctgt	gcagtgggca	caaaacttat	gtgttctct	gtgaggaact
781	aaaagtatga	gcgttaggac	actattttaa	ttatttttaa	tttattgata	tttaaatatg
841	tgatatggag	ttaattata	taagtaatag	atatttatat	ttttatgaa	gtgccacttg
901	aaatatttta	tgtattcatt	ttgaaaaagt	taacgtaaaa	tgctatcggg	cttgaatata
961	ctcgatgttt	cggagccagg	tcatttcttg	gaatgtgtag	gtttacctca	aatacatggc
1021	taacttatgc	atatttttaa	aagaaatatt	tatactgtgt	ttatataatg	tttaaatgtg
1081	ttttatacca	ataaacacct	tttt			

Partielle Sequenz von IFN- γ :

1	tctcttgget	gttactgcca	ggccatgttt	tttaaagaaa	tagaaaacct	aaaggaatat
61	tttaatgcaa	gtaatccaga	tgtatcggac	ggtgggtctc	tttctgtaga	tattttgaag
121	aaatggagag	aggagagtga	caaaacaatc	attcagagcc	aaattgtctc	tttctacttg
181	aaactgtttg	acaactttaa	agataaccag	atcattcaaa	ggagcatgga	taccatcaag
241	gaagacatgc	ttggcaagtt	cttaaatagc	agcaccagta	agagggagga	cttcttaag
301	ctgattcaaa	ttcctgtgaa	cgatctgcag	gtccagcgc	aggcgataaa	tgaactcatc
361	aaagtgatga	atgatctctc	accaagatcc	aacctaagga	agcggaaaag	gagtcagaat
421	ctgtttcgag	gccgcagagc	atcgaaataa	tggtcatcct	gccagcacta	tttgaatttt

komplette Sequenz von GAPDH:

1	atggtgaagg	tggagtcaa	cggattggc	cgtattggc	gcctggcac	cagggctgct
61	ttaactctg	gcaaagtga	tattgtgcc	atcaatgacc	ccttcattga	tctcaactac
121	atggtgtaca	tgtccagta	tgattctacc	cacggcaaat	tccacggcac	agtcaaggct
181	gagaacggga	aactgtcat	caacgggaag	tccatctcca	tctccagga	gcgagatccc
241	gccaacatca	aatggggtga	tgctggtgct	gagtatgtg	tggagtccac	tggggtcttc
301	ccaccatgg	agaaggctgg	ggctcacttg	aaaggcgggg	ccaagagggt	catcatctct
361	gctcettctg	ctgatcccc	catgtttgtg	atgggcgtga	accatgagaa	gtatgacaac
421	tcctcaaga	ttgtcagcaa	tgctcctgc	accaccaact	gcttggctcc	tctagccaaa
481	gtcatccatg	accactcgg	catcgtggag	ggcctcatga	ccaccgtcca	tgccatcact
541	gccaccaga	agaccgtgga	cggcccctct	gggaagatgt	ggcgtgacgg	ccgaggggct
601	gccagaaca	tcatccctgc	ttcactggc	gctgccaagg	ctgtgggcaa	ggtcacccct
661	gagctgaacg	ggaagctcac	tgcatggcc	ttccgtgtcc	ccaccccaaa	tgtatcagtt
721	gtgatctga	cctgccgct	ggagaaagct	gccaaatag	acgacatcaa	gaaggtagtg
781	aagcaggcat	cggagggacc	cctcaaaggc	atcctgggct	acactgagga	ccaggtggtc
841	tcctgtgact	tcaacagtga	caccactct	tccacctcg	acgccggggc	tggcattgcc
901	ctcaatgacc	actttgcaa	gctcatttc	tggtatgaca	atgaatttgg	ctacagcaac
961	cgggtggtgg	acctcatggt	ctacatggcc	tccaaggagt	aa	

Danksagung

- An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit sowie für seine Diskussionsbereitschaft.
- Herrn PD Dr. K. D. Hinsch danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme ins Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“; Frau PD Dr. E. Hinsch danke ich herzlich für die gute und intensive Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. Allen Stipendiaten des Graduiertenkollegs, insbesondere Herrn Dr. R. Brehm, möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung.
- Frau Dr. R. Klein möchte ich ganz herzlich danken für die freundliche Betreuung der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und die jederzeit gewährte schnelle Hilfe bei großen und kleinen Problemen.
- Herrn Prof. Dr. Baumgärtner (Institut für Veterinär-Pathologie, Gießen) möchte ich herzlich danken für die freundliche Unterstützung bei der Etablierung der RT-PCR sowie Ute Kaim für die nette Einarbeitung in die PCR-Technik.
- Herrn Prof. Dr. M. Bergmann (Institut für Anatomie, Histologie und Embryologie der Haustiere, Gießen) möchte ich herzlich danken für die freundliche Aufnahme ins molekularbiologische Labor. Bei Herrn PD Dr. K. Steger bedanke ich mich herzlich für die jederzeit gewährte Hilfe bei allen Fragen.
- Allen Mitarbeitern der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II danke ich für das nette Arbeitsklima, ihre Unterstützung und die wertvollen Tipps bei vielen Problemen.
- Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Großmutter, die mir jederzeit hilfreich und geduldig zur Seite gestanden haben, -nicht nur in finanzieller Hinsicht.
- Besonders danken möchte ich auch Patric, der mir insbesondere beim Zusammenschreiben aufmunternd und geduldig zur Seite gestanden hat.
- Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.