

**Untersuchungen zur Rolle des Prostaglandin Systems in der Regulation
der Corpus Luteum Funktion der Hündin durch Erfassung der
Expression von Cyclooxygenase 1 und-2 (Cox1,-2), Prostaglandin F2 α
Synthase (PGFS), Prostaglandin E2 Synthase (PGES) und
Prostaglandin F2 α Rezeptor (PGFR)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Mariusz Pawel Kowalewski
Tierarzt aus Włocławek (Polen)

Gießen 2007

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

Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II
Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Hubertus Jarry

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. Hans Michael Piper

(Vorsitzender) und

Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 16. Januar 2007

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Mariusz P. Kowalewski

**Meinen geliebten Eltern,
meiner Schwester Mariola
Familie und Freunden gewidmet**

**Moim kochanym Rodzicom,
mojej Siostrze Marioli
Rodzinie i Przyjaciółom dedykuję**

Die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in folgenden
Publikationen veröffentlicht:

Hoffmann, B., Büsges, F., Engel, E., **Kowalewski, MP.**, Papa, P.
Regulation of corpus luteum-function in the bitch.
Reproduction Domestic Animals 2004;39:232-240

Kowalewski, MP., Mason, JI., Howie, AF., Morley, SD., Schuler, G., Hoffmann, B.
Characterization of the canine 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in
the corpus luteum during diestrus.
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2006;101:254-262

Kowalewski, MP., Schuler, G., Taubert, A., Engel, E., Hoffmann, B.
Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus.
Theriogenology 2006;66:1432-1430

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG.....	6
2 LITERATURÜBERSICHT	8
2.1 Verlauf der Sekretion von Progesteron bei der ingraviden und graviden Hündin	8
2.2 Morphologie des Corpus luteum (CL)	10
2.3 Endokrin wirksame luteotrope Regelfaktoren.....	11
2.4 Ausbildung endokrin wirksamer luteolytischer Mechanismen	12
2.5 Allgemeine Aspekte der parakrinen/autokrinen Regulation der CL - Funktion	16
2.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - System.....	16
2.5.2 Steroide.....	18
2.5.3 Immunsystem	20
2.5.4 Prostaglandine	22
2.5.4.1 Expression und Beeinflussung der CL-Funktion	22
2.5.4.2 Beeinflussung der lutealen Steroidhormonbiosynthese durch Prostaglandine.....	24
2.6 Spezielle Aspekte zur para-/autokrinen Regulation der CL-Funktion beim Hund .	25
2.6.1 Steroide.....	25
2.6.2 Rolle des Immunsystems in der Regulation der CL-Funktion der Hündin	26
2.6.3 VEGF-System.....	26
2.7 Fragestellungen.....	27
2.7.1 Frage I: werden- und wenn „ja“ in welchem Umfang- PGF2 α , PGE2 und PGF2 α - Rezeptor im CL der nicht graviden Hündin exprimiert?.....	27
2.7.1.1 Begründung und erfasste Parameter	27
2.7.1.2 Prostaglandin-Biosynthese und Definition der in der vorliegenden Untersuchung erfassten Parameter.....	28
2.7.2 Frage II: Bedeutung der Expression der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β HSD) als ein möglicher Rate-limiting-Step für die Progesteronsynthese im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus.....	30
3 MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE DER KLONIERUNGEN	33
3.1 Versuchsdesign.....	33
3.2 Probengewinnung	33
3.3 Qualitative RT-PCR	34
3.3.1 RNA-Isolierung aus dem CL.....	34
3.3.2 DNase-Behandlung.....	35
3.3.3 Reverse Transkription (RT).....	36
3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	40
3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	40
3.6 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR.....	43
3.6.1 TaqMan PCR-Prinzip	44
3.6.2 Durchführung	45
3.6.3 Auswertung.....	48
3.6.4 Statistische Verfahren.....	49
3.7 Molekulares Klonieren der caninen 3 β HSD Sequenz	50

3.7.1	RACE PCR - Prinzip.....	50
3.7.2	Klonierung der 3 β HSD.....	52
3.8	Klonieren der caninen PGFS, PGES und PGFR Sequenzen.....	57
3.8.1	RACE PCR und Klonierung der Prostaglandin F2 α Synthase (PGFS).....	57
3.8.2	Klonierung der Prostaglandin E Synthase (PGES).....	60
3.8.3	Klonierung des Prostaglandin F2 α Rezeptors (PGFR).....	62
3.9	In situ Hybridisierung zur Lokalisation der 3 β HSD- und PGFR- Expression.....	63
3.9.1	Herstellung einer cRNA - Sonde.....	64
3.9.2	Überprüfung der cRNA-Sonden mittels Dot Blot.....	65
3.9.3	Vorbereitung der Gewebeschnitte für die in situ Hybridisierung.....	66
3.9.4	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	67
3.9.5	Stringentes Waschen und immunhistologischer Nachweis der Sondenbindung....	68
3.10	One-step in situ RT-PCR zur Lokalisation der Cox2-Expression.....	69
3.11	Immunhistochemischer Nachweis der Cox2- und 3 β HSD-Expression.....	72
3.11.1	Qualitative und Quantitative Auswertung der Immunhistochemie.....	74
3.12	Puffer und Lösungen.....	75
3.13	Reagenzien.....	79
3.14	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	82
4	ERGEBNISSE	85
4.1	Expression der 3 β HSD im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus.....	85
4.1.1	cDNA-Sequenz der caninen 3 β HSD.....	85
4.1.2	Qualitative RT-PCR.....	86
4.1.3	Real Time (TaqMan) PCR.....	87
4.2	Lokalisation der Expression der 3 β HSD im CL der Hündin während des Diöstrus..	87
4.2.1	Immunhistochemie.....	87
4.2.2	In situ Hybridisierung (ISH).....	90
4.3	Expression der Cox1 und Cox2 im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus.....	92
4.3.1	Qualitative RT-PCR.....	92
4.3.2	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR.....	93
4.4	Lokalisation der Expression der Cox2 im CL der Hündin während des Diöstrus..	95
4.4.1	Immunhistochemie.....	95
4.4.2	In situ one step RT-PCR.....	98
4.5	Expression der PGFS im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus.....	99
4.5.1	cDNA-Sequenz der caninen PGFS.....	100
4.5.2	Qualitative RT-PCR.....	101
4.6	Expression der PGES im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus.....	102
4.6.1	Qualitative RT-PCR.....	102
4.6.2	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR.....	103
4.7	Expression des PGFR im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus.....	104
4.7.1	Molekulares Klonieren.....	104
4.7.2	Qualitative RT-PCR.....	105
4.7.3	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR.....	105
4.8	Lokalisation der Expression des PGFR im CL der Hündin während des Diöstrus....	106
4.8.1	In situ Hybridisierung.....	106
4.9	Schematische Übersicht der durchgeführten Untersuchungen.....	109
4.10	Zusammenstellung der erhaltenen Ergebnisse.....	109
4.10.1	Steroidogenese.....	109

4.10.2 Prostaglandin-System	110
5 DISKUSSION	112
5.1 Versuchsaufbau	112
5.2 Methoden	113
5.2.1 In vitro RT-PCR, RACE PCR und semiquantitative TaqMan PCR.....	113
5.2.2 Immunhistochemie (IHC).....	115
5.2.3 In situ RT-PCR und in situ Hybridisierung	116
5.3 Ergebnisse.....	116
5.3.1 Prostaglandin- System	116
5.3.2 Expression der 3 β HSD	120
5.4 Weiterführende Untersuchungen	121
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	123
7 SUMMARY	126
8 LITERATURVERZEICHNIS	128
9 LEBENSLAUF	144

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verlauf der Hormone Estradiol-17 β und Progesteron im Reproduktionszyklus der nicht-graviden (a) und graviden (b) Hündin (nach Hoffmann et al., 1999).....	9
Abb. 2: Corpus luteum der Hündin, Tag 65 p.o., Hämatoxin-Färbung	10
Abb. 3: Verlauf von Progesteron (A) und Estradiol-17 β (B) im peripheren Blutplasma bei der Hündin bevor (a) und in zwei nachfolgenden Zyklen nach erfolgter Hysterektomie (b, c). (nach Hoffmann et al., 1992 (A) und Höveler, 1991 (B))....	14
Abb. 4: Verlauf der Progesteron (●-●) und PGFM (▲-▲) Konzentration im peripheren Plasma einer Hündin vor und während der Geburt.....	16
Abb. 5: Schematische Darstellung der enzymatischen Kaskade der durch die Prostaglandine induzierten lutealen Regression (nach Pate und Keyes, 2001)	25
Abb. 6: PGF2 α -Synthesewege (nach Madore et al, 2003).....	29
Abb. 8: Rolle der 3 β HSD in der Steroidhormon-Biosynthese	32
Abb. 9: Schema des pGEM \oplus -T Vektors für die Ligation	41
Abb. 10: TaqMan-Prinzip	45
Abb. 11: Schema der 5'-cDNA- Synthese	51
Abb. 12: Schema der 3'-cDNA- Synthese	52
Abb. 13: Amplifikation der caninen 3 β HSD mittels 3' - 5'- RACE PCR	55
Abb. 14: Nukleotid- und Aminosäuren-Sequenz der caninen 3 β HSD.....	56
Abb. 15: Klonierungsstrategie der caninen PGFS	58
Abb. 16: Amplifikation der caninen PGFS im Uterus/Plazenta-Komplex mittels 3' - 5'- RACE PCR.....	59
Abb. 17: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz der caninen PGFS	60
Abb. 18: Klonierungsstrategie der caninen PGES	61
Abb. 19: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz der caninen PGES.....	62
Abb. 20: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz des caninen PGFR	63
Abb. 21: Genomische Anordnung des caninen 3 β HSD Gens.....	85
Abb. 22: Qualitative RT-PCR: Expression der mRNA der 3 β HSD an den Tagen 5 - 65 nach der Ovulation.....	86
Abb. 23: Real Time (TaqMan) PCR: Expression der mRNA der 3 β HSD an den Tagen 5 - 65 nach der Ovulation	87
Abb. 24: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation des Proteins der 3 β HSD in caninen CL	90
Abb. 25: In situ Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β HSD-spezifischer mRNA im CL der Hündin am Tag 5 p.o.....	91
Abb. 26: Negativkontrolle der in situ Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β HSD- spezifischer mRNA (CL, Tag 5 p.o.)	91
Abb. 27: RT-PCR zur Amplifikation der Cox1 und Cox2 im CL der Hündin am Tag 5 p.o.92	
Abb. 28: RT-PCR zur Amplifikation der Cox1, Cox2 und GAPDH (als Kontrolle) im CL der Hündin, am Tag 35 p.o.....	93
Abb. 29: Expression der Cox1 mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR	94
Abb. 30: Expression der Cox2 mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR	94
Abb. 31: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation der Cox2-Expression im caninen CL	98
Abb. 32: In situ one step RT-PCR zur Lokalisation der Cox2-Expression im CL der Hündin am Tag 5 p.o.....	99
Abb. 33: Genomische Anordnung des caninen PGFS Gens.	100

Abb. 34: Amplifikation der caninen PGFS- und GAPDH-mRNA im CL im Verlauf des Diöstrus.....	101
Abb. 35: Amplifikation der caninen PGFS- und GAPDH-mRNA im CL von graviden und nicht graviden Hündinnen und im Uterus/Plazenta-Komplex.....	102
Abb. 36: Amplifikation der caninen PGES- und GAPDH-mRNA im Verlauf des Diöstrus.....	103
Abb. 37: Expression der PGES-mRNA mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR.....	104
Abb. 38: Amplifikation der caninen PGFR- und GAPDH-mRNA im Verlauf des Diöstrus	105
Abb. 39: Expression des PGFR mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR	106
Abb. 40: In situ Hybridisierung zur Lokalisierung PGFR-spezifischer mRNA im CL der Hündin am Tag 5 p.o.	108

1 EINLEITUNG

Die neuroendokrine Steuerung der Ovarfunktion beim Hund weist im Vergleich zu anderen Haussäugetieren zahlreiche Besonderheiten auf. Ein solches Spezifikum ist der bereits präovulatorisch einsetzende Progesteronanstieg folliculären Ursprungs. Über die Mechanismen, die bei der Hündin zur Luteolyse bzw. lutealen Regression führen, ist jedoch wenig bekannt. Anders als z.B. bei den landwirtschaftlichen Nutztieren, scheidet beim nicht graviden Hund ein Luteolysin (Prostaglandin F_{2α}; PGF_{2α}) uterinen Ursprungs aus (Hoffmann et al., 1992). Der unmittelbar präpartal und parallel zur Luteolyse auftretende PGF_{2α}-Anstieg (Nohr et al., 1993b) weist jedoch auf eine mögliche luteolytische Wirkung endogenen PGF_{2α}'s hin. In Übereinstimmung mit dieser Folgerung haben Untersuchungen bei graviden Hündinnen gezeigt, dass mit PGF_{2α} bei entsprechenden Dosierungen eine Luteolyse und damit ein Abort induziert werden konnte (Romagnoli et al., 1991; Übersicht bei Riesenbeck, 1997).

Insgesamt weisen die Beobachtungen beim Hund somit auf eine Bedeutung von PGF_{2α} als luteolytischer Faktor hin. Informationen über die dabei zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen sowie über den Ort der Synthese von PGF_{2α} liegen jedoch nicht vor.

Untersuchungen bei Mensch (Rossmannith et al., 1990) und Schwein (Wuttke et al., 1998a,b) haben gezeigt, dass Substanzen, die im Corpus luteum (CL) produziert werden, wie z.B. Steroide, Eicosanoide, Zytokine und Wachstumsfaktoren, als auto- und/oder parakrine Faktoren ebenfalls an der Steuerung der lutealen Progesteron- und Estradiol-17β- Sekretion beteiligt sind. Hoffmann et al. (1996) vermuteten daher, dass ähnliche Mechanismen auch bei der Hündin zur Wirkung kommen.

Im Hinblick auf diese These war es Ziel der vorliegenden Untersuchungen, Informationen über eine eventuelle Bedeutung von PGF_{2α} als parakriner/ autokriner Regelfaktor bei der lutealen Regression der Hündin zu erhalten. Dieser Frage wurde durch Erfassung der Expression der Cyclooxygenase 1 (Cox1) und Cyclooxygenase 2 (Cox2) auf mRNA-Ebene und Proteinebene sowie der Prostaglandin F- und E-Synthase (PGFS, PGES) und des Prostaglandin F Rezeptors (PGFR) auf mRNA- Ebene nachgegangen.

Den in Ergänzung dazu durchgeführten Untersuchungen zur Erfassung der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase- Δ 4/5-Isomerase (3 β HSD) lag die Überlegung zugrunde, dass die Expression dieses Schlüsselenzyms der Steroidbiosynthese einmal als Parameter zur Charakterisierung des Funktionszustandes der Luteinzellen herangezogen werden kann, darüberhinausgehend möglicherweise aber auch den Endpunkt einer die Progesteronsekretion kontrollierenden Reaktionskaskade darstellt, an der u.a. auch Eicosanoide beteiligt sein können.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Verlauf der Sekretion von Progesteron bei der ingraviden und graviden Hündin

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nomenklatur der Zyklusphasen der Hündin wurde 1987 von Feldman und Nelson definiert. Entsprechend dieser Definition lässt sich der Zyklus der Hündin in den Proöstrus, mit der Dauer von 3 - 16 Tagen, den Östrus, der etwa 4 - 12 Tage dauert, den Diöstrus, dessen Dauer zwischen 60-90 Tagen schwankt, und den Anöstrus mit der Dauer von 15 - 265 Tagen unterteilen (Feldman und Nelson, 1987).

Analog zu anderen Spezies ist der Diöstrus auch bei der Hündin die Zyklusphase, die durch die Progesteronsekretion der sich an- und rückbildenden Corpora lutea (Gelbkörper) gekennzeichnet ist.

Eine Besonderheit der Hündin ist, dass die Luteinisierung der Granulosazellen schon vor der Ovulation, also während des Östrus, durch den Anstieg der Progesteronkonzentration im peripheren Blutplasma erkennbar wird. Bei einer Progesteronkonzentration von etwa 5 ng/ml wird die Ovulation beobachtet (Concannon, 1993).

Bei der Hündin wird Progesteron sowohl im Diöstrus als auch während der Trächtigkeit nahezu ausschließlich in den Corpora lutea gebildet.

Der präovulatorische Progesteronanstieg setzt sich post ovulationem (p.o.) weiter fort und erreicht innerhalb von 20 - 30 Tagen p.o., d.h. im ersten Drittel des Diöstrus, den Höhepunkt. Die Progesteron- und Estradiol-17 β - Konzentrationen im Plasma sind bei graviden und ingraviden Hündinnen nahezu identisch (Concannon et al., 1989; Hoffmann et al., 1999; Jones et al., 1973).

Allerdings läuft bei ingraviden Tieren die Progesteronproduktion in den Corpora lutea langsam aus; der Fixpunkt von 1 ng/ml, bei dem definitionsgemäß die Phase des Anöstrus erreicht wird (Concannon, 1993), wird teilweise erst nach mehr als 100 Tagen p.o. erreicht. Bei graviden Tieren fällt dagegen die Progesteronproduktion 12-42 Stunden ante partum von Konzentrationen um 10 ng/ml abrupt auf < 2 ng/ml mit der Geburt ab (Concannon und Hansel, 1977; Concannon et. al., 1989). Dieser Verlauf lässt auf ein zu diesem Zeitpunkt aktiv wirksam werdendes luteolytisches Prinzip schließen.

Abb. 1 zeigt schematisch den Progesteron (P_4) -Verlauf bei der ingraviden und graviden Hündin. Daraus ist ersichtlich, dass die luteale Regression zunächst einheitlich etwa ab dem 35. Tag p.o. einsetzt, dass eine aktive und nur über wenige Stunden anhaltende Luteolyse jedoch nur bei den graviden Tieren zu erkennen ist.

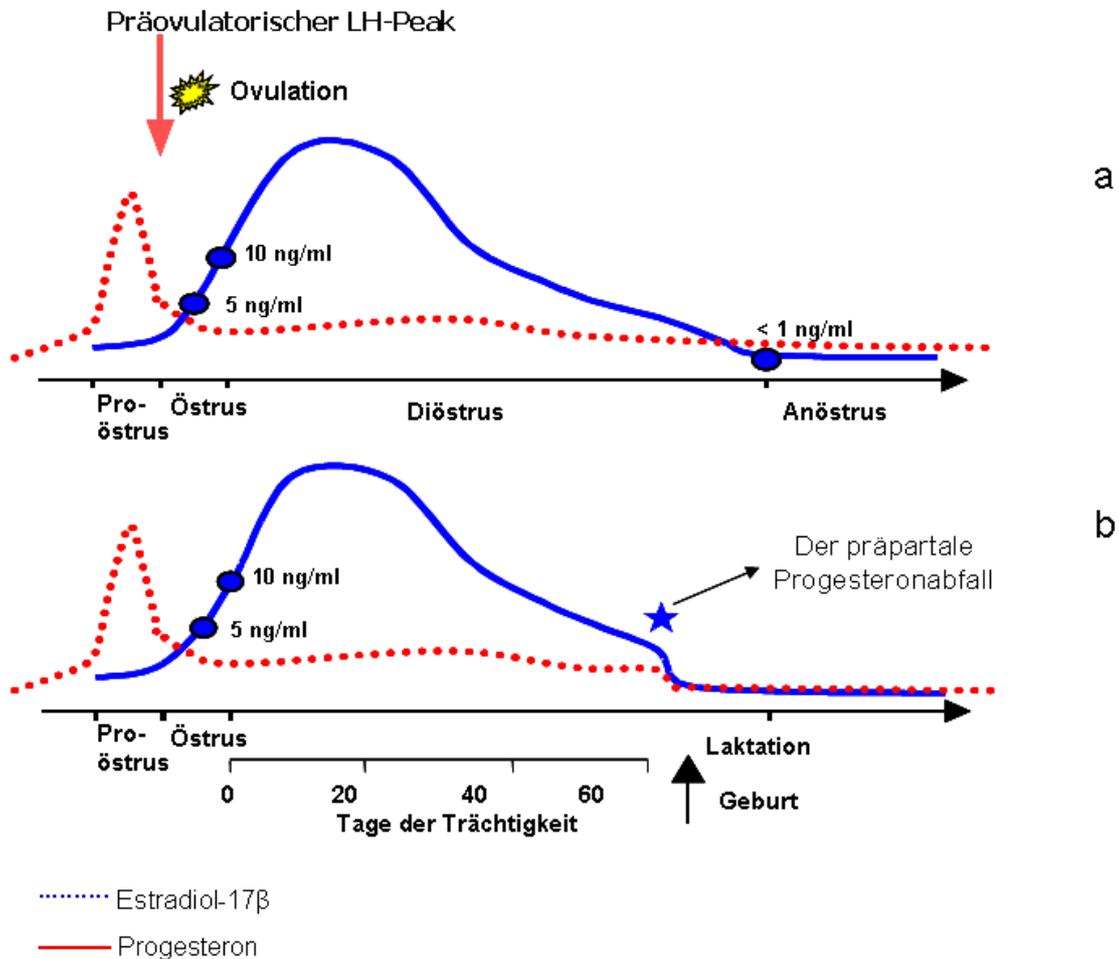


Abb. 1: Verlauf der Hormone Estradiol-17 β und Progesteron im Reproduktionszyklus der nicht-graviden (a) und graviden (b) Hündin (nach Hoffmann et al., 1999).

2.2 Morphologie des Corpus luteum (CL)

Beim CL handelt es sich um eine endokrine Drüse von zeitlich begrenzter Lebensdauer, die sich nach der Ovulation aus den Granulosa- und Theca interna-Zellen des ovulierten Follikels anbildet, wobei - in Abhängigkeit von der Tierart - die Granulosa-Zellen in große und die Theca-Zellen in kleine Luteinzellen umgewandelt werden. Beide Zellpopulationen stellen z.B. beim Schaf etwa 23 % der Gesamtanzahl der Zellen im CL, was ca. 43 % des gesamten Volumens entspricht. Die Stromazellen, bei denen es sich hauptsächlich um Endothelzellen und Fibroblasten handelt, bilden beim Schaf ca. 70 % der gesamten Zellpopulation (Farin et al., 1986). Im Unterschied zu Schaf, Mensch, Rind oder Schwein, ist die Einteilung in große und kleine Luteinzellen beim Hund lichtmikroskopisch nicht möglich (Andersen and Simpson, 1973) (Abb. 2).

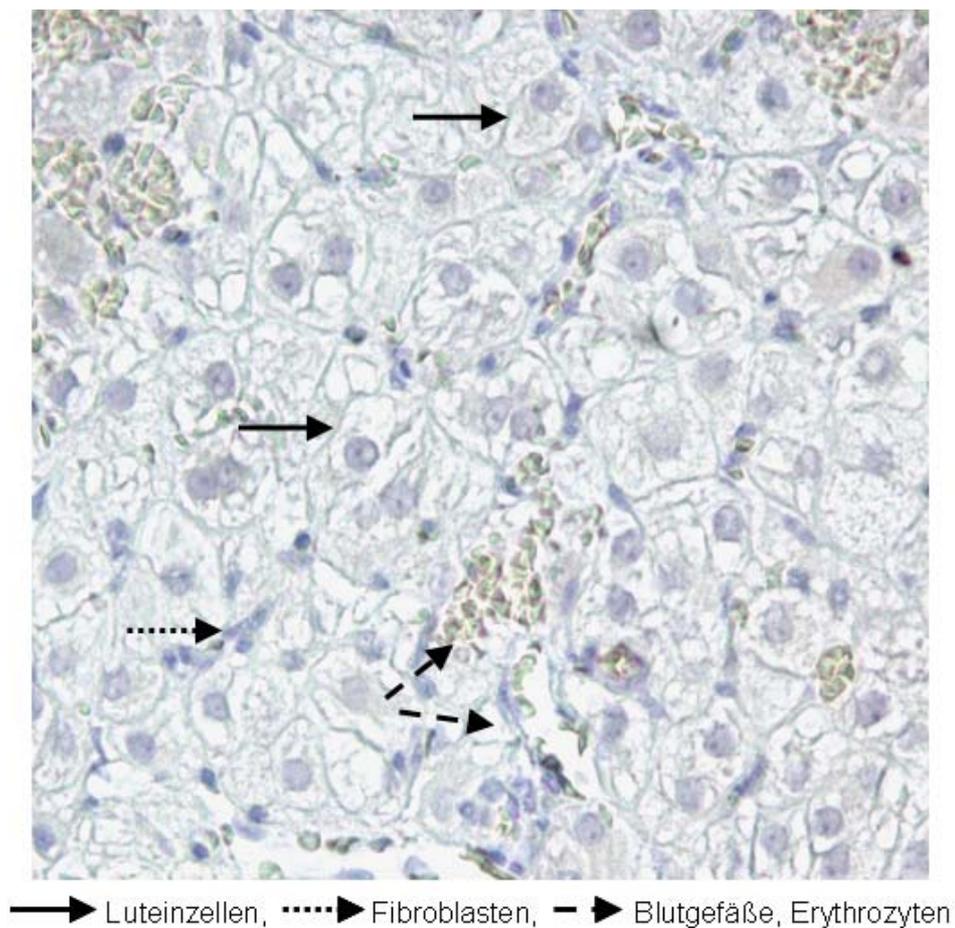


Abb. 2: Corpus luteum der Hündin, Tag 65 p.o., Hämatoxylin-Färbung.

Elektronenmikroskopisch weisen die Luteinzellen bis zum ca. 30. Tag p.o. runde Zellkerne mit homogenem Chromatin, ein ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum (gER) und kleine Lipidvakuolen im Zytoplasma der Luteinzellen auf. Die Luteinzellen liegen zu diesem Zeitpunkt dicht nebeneinander. Ab dem 45. Tag p.o. nimmt der interzelluläre Abstand zwischen den Luteinzellen allmählich zu, gleichzeitig sinkt die Anzahl an Blutkapillaren und es werden zunehmend Kollagenfasern in der interzellulären Matrix sichtbar, die Struktur des glatten endoplasmatischen Reticulum der Luteinzellen wird undeutlicher. Diese ersten Degenerationserscheinungen der CL werden ab dem 60. Tag p.o. markanter, erkennbar an dem Auftreten einer zunehmenden Anzahl polygonaler und pyknotischer Zellkerne, was als Ausdruck einer beginnenden Chromatinkondensation angesehen wird. Das degenerierende glatte endoplasmatische Reticulum nimmt eine wirbelähnliche Struktur an; es umgibt große Lipidvakuolen. Zwischen den Tagen 75 und 113 p.o. stellen sich die Zellkerne überwiegend lobuliert mit einem Anstieg des Gehaltes an Heterochromatin dar. Erste vereinzelte apoptotische Signale in den CL der Hündin wurden am Tag 40 p.o. beobachtet (Sonnack et al., 2003).

Neben Lutein-, Stroma- und Endothelzellen wiesen Hoffmann et al. (2004a) als eine weitere Zellpopulation im CL der Hündin CD-8 und CD-4 exprimierende Leukozyten sowie Makrophagen nach.

2.3 Endokrin wirksame luteotrope Regelfaktoren

Luteotrope Mechanismen unterstützen das Wachstum und/oder die Funktion des CL. Die Menge des produzierten Progesterons hängt vom Volumen des Progesteronproduzierenden Gewebes, dessen Durchblutung und seiner Kapazität zur Progesteronsynthese ab (Niswender et al., 2000). Auf molekularer Ebene limitierend ist dabei die Expression der für die steroidogenen Enzyme kodierenden mRNA und die Aktivität der Mechanismen, die für die zelluläre Aufnahme und den intrazellulären Transport von Cholesterol verantwortlich sind (Niswender et al., 2000). Zu den Hormonen, die einen positiven Einfluss auf das Wachstum und/oder die Funktion des CL haben, gehören u.a. Luteinisierendes Hormon (LH), Prolaktin (PRL), Growth Hormone/Wachstumshormon (GH), Insuline Like Growth Factor 1 (IGF-1), Oxytozin, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Prostaglandin I₂ (PGI₂) (Niswender et al., 2000).

Bei der Hündin sind die Corpora lutea im ersten Drittel des Diöstrus unabhängig von einem gonadotropen Einfluss. Weder eine Hypophysektomie, noch eine Hemmung von LH oder PRL führte in dieser Phase zu einer Luteolyse (Concannon, 1980; Concannon et al., 1987; Okkens et al., 1986). Ab dem zweiten Drittel der Lutealphase war eine Hypophysektomie mit einem Funktionsverlust der CL verbunden (Concannon, 1980), als luteotroper Faktor erwies sich dabei insbesondere PRL (Concannon et al., 1987; Okkens et al., 1990), aber auch dem LH kommt eine luteotrope Bedeutung zu (Concannon, 1980, Concannon et al., 1987).

Sowohl bei der graviden als auch der ingraviden Hündin steigt die Verfügbarkeit von LH im Verlauf der Lutealphase bei gegenläufigem Progesteronprofil signifikant an. Ein entsprechend ähnlicher Konzentrationsverlauf ergibt sich für Prolaktin (Onclin und Versteegen, 1997). Dies lässt die Aussage zu, dass weder während der Gravidität noch bei der ingraviden Hündin die Regression der Corpora lutea auf einen Mangel der luteotropen Regelfaktoren zurückzuführen ist (Hoffmann et al., 1996, Hoffmann und Schneider, 1993, Riesenbeck, 1997). Daraus lässt sich schließen, dass überwiegend auto- und/oder parakrine Steuerungsmechanismen für die luteale Regression verantwortlich sein müssen (Hoffmann et al., 1996).

2.4 Ausbildung endokrin wirksamer luteolytischer Mechanismen

Als luteolytische Vorgänge werden Mechanismen bezeichnet, die dazu führen, dass die CL ihre Fähigkeit zur Progesteronsynthese verlieren. Dabei werden zwei Vorgänge unterschieden, die funktionelle Luteolyse, die durch einen Verlust der Progesteronsynthesekapazität charakterisiert ist, und die strukturelle Luteolyse, der Veränderungen im histomorphologischen Aufbau des CL zugrunde liegen (z.B. das Auftreten von apoptotischen Zellen oder Einwanderung von Immunzellen).

Landwirtschaftliche Nutztiere

Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren (Rind, Ziege, Schaf, Schwein, Pferd) wird die Luteolyse des CL cyclicum durch Freisetzung endometrialen PGF₂α's verursacht. Auch die Luteolyse der Corpora lutea graviditatis bei Schwein, Ziege und Rind ist PGF₂α -

verursacht (McCracken et al., 1999). In beiden Fällen handelt es sich um eine endokrine Wirkung von $\text{PGF2}\alpha$.

Bei Rind, Schaf, Schwein, Primaten und Ratten wird $\text{PGF2}\alpha$ ebenfalls in den CL produziert (Milvae und Hansel, 1983; Patek und Watson, 1983; Watson und Sertich, 1990; Olofsson und Leung, 1994; Dawood et al., 1997; Stocco und Deis, 1998; Kobayashi et al., 2002; McCracken et al., 1999); auf die Bedeutung dieser lokalen $\text{PGF2}\alpha$ – Produktion wird in Kapitel 2.5.4 eingegangen.

Hund, Katze

Bei der nicht-graviden Hündin ergab sich ein identischer Progesteron- und Estradiolverlauf vor und nach Hysterektomie (Abb. 3), die Ovarfunktion verlief normal woraus Hoffmann et al. (1992) schlossen, dass ein Luteolysin uterinen Ursprungs bei dieser Spezies nicht existiert.

Auch bei der Katze zeigt sich nach einer Hysterektomie eine normale „zyklische“ Ovarfunktion (Wheeler et al., 1988), so dass von ähnlichen Gegebenheiten ausgegangen werden kann.

Allerdings konnte eine luteolytische Wirkung exogen verabreichten $\text{PGF2}\alpha$ beim Hund in zahlreichen, vielfach praxisbezogenen Untersuchungen aufgezeigt werden.

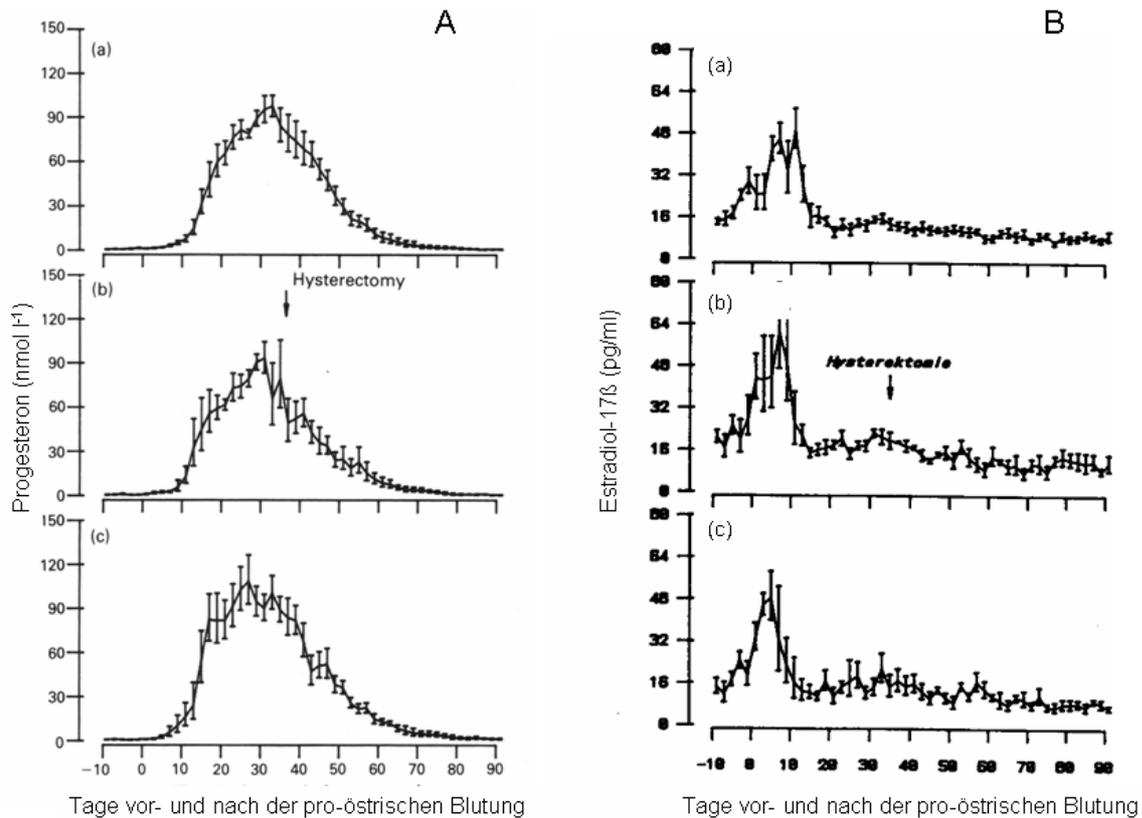


Abb. 3: Verlauf von Progesteron (A) und Estradiol-17 β (B) im peripheren Blutplasma bei der Hündin bevor (a) und in zwei nachfolgenden Zyklen nach erfolgter Hysterektomie (b, c). (nach Hoffmann et al., 1992 (A) und Höveler, 1991 (B)).

Der Frage, ob bei der trächtigen Hündin der unmittelbare präpartale Progesteronabfall eine Folgeaktion des parallel verlaufenden PGF2 α -Anstiegs ist (Abb. 4), gingen Hoffmann et al. (1996) nach, indem sie versuchten die präpartale endogene PGF2 α -Synthese durch Verabreichung des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Indomethacin (Hemmung der Cyclooxygenase) zu hemmen. Dabei zeigte sich, dass die bei den Beagle - Hündinnen bis dahin festgestellte durchschnittliche Graviditätsdauer von $61,8 \pm 2,2$ Tagen (Nohr, 1993a) bei Progesteronwerten von >2 ng/ml für zwei bis drei Tage überschritten wurde; danach wurde die Gravidität wegen der beobachteten Nebenwirkungen mit einer Sectio caesarea beendet. Die Ergebnisse sind aufgrund der geringen Tierzahl und der beobachteten Nebenwirkungen allerdings vorsichtig zu werten. Diese Beobachtungen weisen jedoch darauf hin, dass dem PGF2 α auch beim Hund eine Bedeutung als endokriner luteolytischer Faktor im präpartalen Zeitraum zukommen könnte.

Auch andere Untersuchungen weisen auf eine Ansprechbarkeit des CL der Hündin auf PGF₂α hin.

So konnten Romagnoli et al. (1991) nach Verabreichung von PGF₂α bei fehlgedeckten Hündinnen ab dem Tag 5 des Diöstrus eine Luteolyse herbeiführen und eine Nidationsverhütung erzielen, wobei allerdings höhere und/oder wiederholte Dosierungen benötigt wurden (250 µg/kg KGW zweimal täglich über einen Zeitraum von mindestens 4 Tagen) und es zu erheblichen Nebenwirkungen, wie Erbrechen, Diarrhöe, Hecheln, vorübergehende Hypothermie, kam. Hubler et al. (1991) konnten bei Anwendung von 20 µg PGF₂α/kg KGW 3-4 mal täglich, bei 5-7 Wochen trächtigen Hündinnen innerhalb von 4-11 Tagen einen Abort induzieren.

Ebenso konnten Williams et al. (1999) nach Anwendung des PGF₂α-Analogons Natrium-Cloprostenol eine vorzeitige Luteolyse auslösen. Auch bei nicht graviden Tieren konnte durch wiederholte PGF₂α- Anwendung eine Luteolyse induziert werden (Concannon und Hansel, 1977).

In allen Fällen wurden in der frühen CL-Phase höhere Dosierungen von PGF₂α benötigt als in der späteren, um eine Luteolyse herbeizuführen. Diese Beobachtungen führten zur Aussage, dass die CL der Hündin in der frühen Lutealphase resistenter gegenüber PGF₂α sind als in der späteren (Watts et al., 2001).

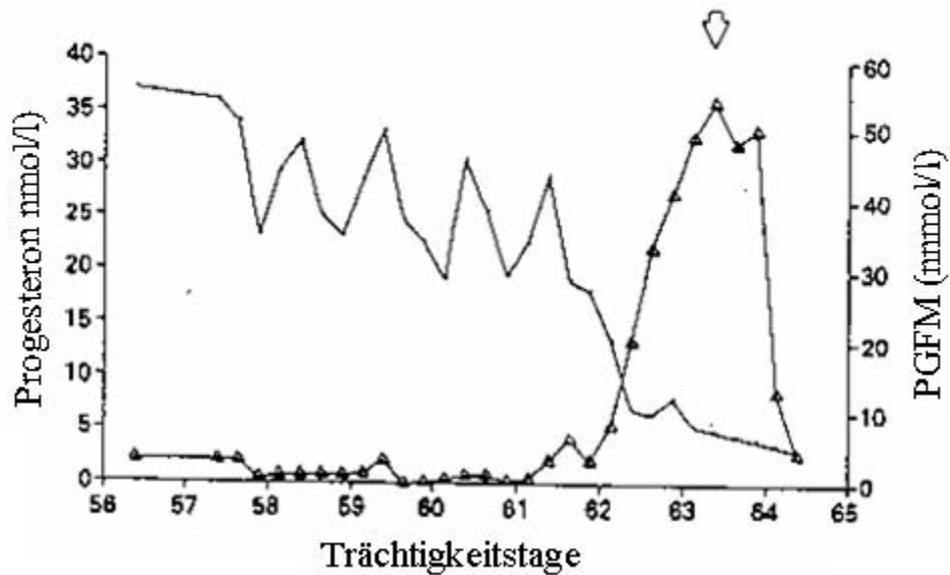


Abb. 4: Verlauf der Progesteron (●—●) und PGFM (▲—▲) Konzentration im peripheren Plasma einer Hündin vor und während der Geburt; ↓ erste äußerlich erkennbare Anzeichen des Geburtseintritts (Nohr, 1993a).

2.5 Allgemeine Aspekte der parakrinen/autokrinen Regulation der CL - Funktion

2.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - System

Die Neubildung von Gefäßen stellt in adulten Geweben – mit der Ausnahme von einigen Krankheitsbildern, wie der chronischen Entzündung oder des Tumorwachstums – ein relativ seltenes Phänomen dar (Cheung et al., 1998). Eine Ausnahme bilden hier die zyklischen Veränderungen am Ovar, bei denen die CL entstehen.

Die Entwicklung neuer Gefäße kann durch zwei Mechanismen stattfinden: durch Angiogenese und durch Vaskulogenese.

Die Vaskulogenese bezeichnet die Formation von Gefäßen *de novo*, und findet nur während der Embryogenese statt. Die Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Kapillaren, ausgehend von bestehenden Gefäßen. Hierzu gehört die Proliferation von Endothelzellen in Verbindung mit einer Remodellierung der existierenden Basalmembran und der extrazellulären Matrix (Redmer et al., 2001).

Die Formation von Kapillaren aus den prä-existierenden Gefäßen wird durch verschiedene Faktoren reguliert, von denen die meisten - wie z.B. der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) - als unspezifische Wachstumsfaktoren charakterisiert werden können. Als erster Faktor, der spezifisch die Proliferation der vaskulären Endothelzellen initiiert, wurde der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beschrieben (Stouffer et al., 2001).

VEGF ist ein potenter, die Migration der Endothelzellen stimulierender mitogener Faktor. Er ist zudem in der Lage, die vaskuläre Permeabilität zu erhalten und/oder zu erhöhen (Redmer et al., 2001).

Die VEGF-Familie besteht aus mindestens sechs Hauptisoformen (VEGF A-F), von denen infolge eines alternativen Splicings wieder mehrere Subtypen entstehen können (Stouffer et al., 2001). So wurden beispielsweise beim Mensch fünf molekulare Isoformen von VEGF-A identifiziert (Stouffer et al., 2001); drei von ihnen (VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165) befinden sich im Zytoplasma, zwei sind membrangebunden (VEGF 189, VEGF 206). VEGF übt seine Rolle vor allem durch die Bindung an Tyrosinkinase-Rezeptoren aus, die als VEGF-Rezeptor(R)-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bezeichnet werden (Stouffer et al., 2001).

Als weitere spezifische Bindungsstelle für VEGF-A Subtypen wurden die Rezeptoren NP-1 und NP-2 (neutrophil-derived platelet activator-spezifische transmembranäre Typ I und II Rezeptoren) nachgewiesen. NP-1 bindet VEGF 165, NP-2 bindet VEGF 165 und VEGF 145 (Stouffer et al., 2001).

Im CL des Schweines wurde die mRNA von VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie die Isoform VEGF 164 nachgewiesen (Boonyaprakob et al., 2003a). Die VEGF 164 mRNA war überwiegend in den aus Granulosazellen stammenden großen Luteinzellen lokalisiert, die Expression der beiden Rezeptoren wurde in den aus den Thecazellen stammenden kleinen Luteinzellen nachgewiesen. Die Expression von VEGF 164 war im Verlauf der Lutealphase zunächst konstant, ein Abfall wurde gegen deren Ende beobachtet. Die Expression des VEGFR-1 war kurz nach der Ovulation am niedrigsten und stieg bis zum Ende der CL-Phase an, die Expression des VEGFR-2 war dagegen bis zum Tag 12 - 15 p.o. - also bis zum Einsetzen der Luteolyse – hoch, wonach ein rascher Abfall erfolgte (Boonyaprakob et al., 2003a).

Im CL des Schafes wurden die Isoformen VEGF 120, -164, und -188 identifiziert (Redmer et al., 1996). Mittels Immunhistochemie wurden die Signale sowohl in den großen und kleinen Luteinzellen als auch in den Stromazellen, Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert. Ab Mitte der Lutealphase sank die Anzahl der VEGF

positiven Zellen ab, wobei die verbleibenden Signale überwiegend im perivaskulären Bereich der großen Blutgefäße und im Bindegewebe der CL-Kapsel beobachtet wurden (Redmer et al., 2001).

Beim Rind wiesen Berisha et al. (2000) die Expression von VEGF 121, -165 und -189 in den großen und kleinen Luteinzellen nach, Davis et al. (2003) konnten die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 in den Endothelzellen aufzeigen. Sowohl für VEGF als auch die beiden Rezeptoren war zu Beginn der CL-Phase, also zur Zeit der sehr starken angiogenetischen Aktivität des CL, die Expression besonders hoch (Berisha et al. 2000). Die der Expression des VEGF-VEGFR-Systems im CL im Verlauf des Diöstrus zugrunde liegende Regulationsmechanismen sind weitgehend unklar. Man vermutet, dass eine para- bzw. autokrine Regulation auf der CL-Ebene eine Rolle spielt (Tamanini und De Ambrogi, 2004).

2.5.2 *Steroide*

Zu den Hormonen ovariellen Ursprungs, die an der Regulation der CL-Funktion beteiligt sind, zählen vor allem Progesteron und die Östrogene.

Progesteron

Dass Progesteron auf auto-/parakrinem Wege luteotrop wirkt wurde bereits 1981 von Rothchild postuliert. Diese Hypothese wurde durch Befunde von Fanjul et al. (1983) und Pridjian et al. (1987) bei der Ratte unterstützt, die nach Zusatz synthetischer Gestagene (Progestin R5020, Medroxyprogesterone acetate) zu Granulosa-Zellenkulturen eine Stimulation der Progesteronproduktion beobachten konnten.

Die bisher gemachten Beobachtungen lassen darauf schliessen, dass auch beim Rind Progesteron als autokriner/parakriner Faktor luteotrope Wirkungen besitzt. So bewirkte die Behandlung von bovinen Luteinzellkulturen aus der frühen CL-Phase mit einem spezifischen Progesteron-Antagonisten (Onapristone) eine reduzierte Sekretion von Progesteron, Oxytozin, PGF 2α und PGE 2 (Skarzynski und Okuda, 1999). Bei Zellkulturen aus der mittleren CL-Phase führte diese Behandlung zur Reduktion der lutealen Oxytozinproduktion, gleichzeitig wurde die PGF 2α - Produktion stimuliert (Skarzynski und Okuda, 1999). In diesen Zellkulturen zeigte Progesteron eine inhibierende Wirkung auf die PGF 2α - Sekretion (Pate, 1988; Skarzynski und Okuda, 1999). Eine weitere luteotrope

Funktion von Progesteron beim Rind ergibt sich aus der stimulierenden Wirkung auf die LH-Rezeptor-Synthese in den Luteinzellen der frühen CL-Phase (Jones et al., 1992). Weiterhin zeigte Progesteron in bovinen Luteinzellkulturen eine anti-apoptotische Wirkung (Rueda et al., 2000). Es handelt sich hierbei um Rezeptor vermittelte Effekte, wobei die bovinen lutealen Progesteronrezeptoren auf relativ niedrigem Niveau ohne signifikante Veränderungen im Verlauf des Zyklus und der Gravidität exprimiert werden (Berisha et al., 2002).

Auch beim Schwein wirkt Progesteron luteotrop; es stimuliert die Expression der Enzyme 3 β HSD und P450scc und führt dadurch zum Anstieg der Progesteronproduktion in der Zellkultur (Rodway et al., 1999).

Östrogene

Neben Progesteron sind auch Östrogene ein Sekretionsprodukt der Luteinzellen zahlreicher Spezies. So konnte die Produktion von Estradiol-17 β in den Luteinzellen beim Schwein (Gregoraszcuk, 1983; Gregoraszcuk, 1992), Mensch (Johnson et al., 1996), Hund (Nishiyama et al., 1999) und Rind (Okuda et al., 2001) nachgewiesen werden, ebenso wie die Expression der Aromatase in den Granulosazellen der Stute (Belin et al., 2000).

Untersuchungen bei verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass die Wirkung von lutealem Estradiol-17 β unterschiedlich ist und von der Spezies, vom Zeitpunkt nach der Ovulation und von der Konzentration abhängt.

So wurde für Estradiol-17 β sowohl eine luteotrope als auch eine luteolytische Wirkung beschrieben (Endo et al., 1998; Chen et al., 1997; Hazzard und Stormshak, 1997; Gibori und Keyes, 1978; Gregoraszcuk und Oblonczyk, 1996; Lund et al., 1999).

Im Hinblick auf die luteale Estradiolproduktion kann dabei grundsätzlich von einer parakrin/autokrin vermittelten Wirkung ausgegangen werden, bei exogener Zufuhr tritt aber auch eine endokrin vermittelte Wirkung ein.

Beim Kaninchen stellt Estradiol-17 β den wichtigsten luteotropen Faktor dar. So führte z.B. beim scheinträchtigen Kaninchen ein Abfall des Estradiol-17 β Gehaltes im Blut zum Abfall der Progesteronkonzentration. Diese Wirkung ist jedoch auf eine Potenzierung des luteotropen Effekts von IGF-I und nicht auf eine direkte Stimulation der Progesteronsynthese durch Estradiol-17 β zurückzuführen (Chen et al., 1997).

Auch beim Schaf scheint Estradiol-17 β eher luteotrop zu wirken, da eine Insuffizienz präovulatorischer Granulosaluteinzellen auf einen Mangel an Estradiol-17 β zurückgeführt wurde (Lund et al., 1999).

Eine Behandlung von Schafen mit Estradiol-17 β über 20 Tage, beginnend ab Tag 4 nach der Ovulation, führte zu einer Verlängerung des Interöstrus-Intervalls durch eine Verlängerung der CL-Lebensspanne (Hazzard und Stormshak, 1997).

Ebenso stellt Estradiol-17 β bei der Ratte einen wichtigen luteotropen Faktor dar. LH und PRL scheinen in dieser Spezies eine sekundäre Rolle bei der Aufrechterhaltung der CL-Funktion zu spielen. Bei der trächtigen, hypophysektomierten Ratte hält Estradiol-17 β den Progesterongehalt im Serum von Tag 12 bis 15 aufrecht und erhöht gleichzeitig die Expression von Östrogenrezeptoren im CL (Gibori und Keyes, 1978).

In humanen Luteinzellkulturen stimulieren niedrige Dosen an Estradiol-17 β (5ng/ml) die Progesteronsynthese, hohe Konzentrationen (100ng/ml) haben eine hemmende Wirkung (Endo et al. 1998).

Untersuchungen mittels „in vitro“ Mikrodialyse-Systeme beim Rind zeigten, dass PGF2 α in der Lage ist, die Progesteronsekretion in der frühen und mittleren Lutealphase (Tag 8 - 12 p.o.) zu steigern (Miyamoto et al., 1993). Dieser Effekt wird wahrscheinlich über Estradiol vermittelt (Okuda et al., 2001).

Bei Schweinen mittels „in vivo“ Mikrodialyse durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass PGF2 α in der frühen und mittleren Lutealphase - ähnlich wie beim Rind (s.o.) - die Estradiol-17 β Produktion stimuliert; gleichzeitig wurde der die Progesteronproduktion stimulierende Effekt von Estradiol-17 β gezeigt; daraus wurde geschlossen, dass der luteotrope Effekt von PGF2 α durch Estradiol-17 β vermittelt wird (Wuttke et al., 1998b).

2.5.3 *Immunsystem*

Über das Vorkommen von Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen) im CL berichteten bereits 1968 Lobel und Levy. Zwischenzeitlich liegt eine Vielzahl dazu durchgeführter Untersuchungen vor. Auf die bisher beim Hund gemachten Beobachtungen wird in Kapitel 2.6.2 eingegangen. Für andere Spezies liegen u.a. folgende Beobachtungen vor; bei Ratte, Maus, Meerschweinchen, Schaf, Schwein und Mensch steigt die Zahl der im CL vorkommenden Immunzellen gegen Ende der CL-Phase, d.h. zum Zeitpunkt der Luteolyse, an (Hehnke et al., 1994; Niswender et al., 2000). Niswender et al. (2000)

diskutierten die Rolle der eingewanderten Immunzellen, insbesondere der Makrophagen wie folgt: 1) Phagozytose der degenerierenden Zellen, 2) zytokinvermittelte Hemmung der Steroidogenese, 3) Stimulation der PGF₂ α -Produktion im CL. Diese Thesen beruhen u.a. auf Beobachtungen von Pate (1995) und Davis und Rueda (2002), die beim Rind proinflammatorische Zytokine wie Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interferon γ (IFN γ) und Interleukin 1 β (IL-1 β) für die Luteolyse mitverantwortlich machen. TNF α , IFN γ und IL-1 β werden z.B. beim Rind sowohl durch aktivierte Makrophagen und Lymphozyten als auch durch Fibroblasten und Endothelzellen produziert (Neuvians et al., 2004). Sie sind in der Lage, die LH-stimulierte Progesteronsynthese zu hemmen (Pate, 1995), wobei gezeigt wurde, dass die gemeinsame Wirkung von TNF α und IFN γ auf die bovinen Luteinzellkulturen auf zytotoxischen Effekten beruht (Petroff et al., 2001; Taniguchi et al., 2002). Bei Schwein und Ratte sind TNF α , IFN γ und IL-1 β in der Lage, direkt die Expression der mRNA, die für P450_{scc} kodiert, zu hemmen (Übersicht bei Neuvians et al., 2004).

Untersuchungen an Schweine-CL mittels Mikrodialyse haben gezeigt, dass durch die Vorbehandlung mit TNF α der die Progesteronproduktion stimulierende Effekt von PGF₂ α aufgehoben wird, gleichzeitig wird der luteolytische Effekt von PGF₂ α verstärkt (Wuttke et al., 1998b). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass TNF α im porcinen CL eine Rolle als ein „Umschaltfaktor“ in der PGF₂ α Wirkung von einem luteotropen zum luteolytischen Faktor zukommt (Wuttke et al., 1998b). Auch in den CL beim Kaninchen und Schaf wurde TNF α nachgewiesen (Pate and Keyes, 2001).

Während der Luteolyse infiltrieren die T-Lymphozyten das CL und setzen dort IFN γ frei, das die Bereitstellung von Histokompatibilitätsantigenen der Klasse II (major histocompatibility complex II; MHC II) auf der Oberfläche von Zellen stimuliert (Fairchild und Pate, 1989). Eine erhöhte MHC II-Expression am Ende der CL-Lebensspanne wurde in den CL beim Mensch (Bukovský et al., 1995) und Schaf (Kenny et al., 1991) beobachtet.

Neben den die Progesteronproduktion hemmenden Effekten von Zytokinen wurden auch die Progesteronproduktion stimulierende Effekte beschrieben. So wurde z.B. bei „in vitro“ kultivierten humanen Granulosazellen die Expression von mRNA und Protein von IL-8 nachgewiesen, das einen luteotropen Faktor darstellt und zugleich Angio- und Vaskulogenese stimuliert (Arici et al., 1996). Ebenso wurde die luteotrope Wirkung von IL-10 und IL-4 in humanen Lutealzellkulturen nachgewiesen (Hashii et al., 1998).

2.5.4 *Prostaglandine*

2.5.4.1 Expression und Beeinflussung der CL-Funktion

Eine besondere Rolle als parakrine/autokrine Regelfaktoren der CL-Funktion kommt Prostaglandinen (PG) zu. Prostaglandine sind Produkte des Arachidonsäure-Metabolismus (s. Kap. 2.4.1.1). Sie werden in den CL von sehr vielen Spezies, wie z.B. Ratte, Kaninchen, Schwein, Schaf, Rind, Pferd und Mensch produziert (Wiltbank und Ottorobe, 2003), wobei ihnen sowohl luteotrope bzw. luteoprotektive als auch luteolytische Wirkungen zugeschrieben werden (Fitz et al., 1984; Shelton et al., 1990). PGF₂ α wird bei Schwein, Rind, Pferd, Ratte und Primaten bereits in der frühen Lutealphase im CL produziert (Patek und Watson, 1983; Kobayashi et al., 2002; Watson und Sertich, 1990; Olofsson et al., 1992; Milvae und Hansel, 1983). Es scheint sich dabei um einen Progesteron-vermittelten Prozess zu handeln, da - wie anhand von Luteinzellkulturen vom Rind gezeigt werden konnte - die Anwendung eines Antigestagens (Onapristone) in der frühen CL-Phase eine Förderung und in der späten eine Hemmung der PGF₂ α -Synthese bewirkte (Skarzynski und Okuda, 1999). Zumindest in der frühen Lutealphase scheint beim Rind zwischen PGF₂ α und Progesteron eine Art „positive loop feedback“ zu bestehen, da PGF₂ α die Progesteronproduktion stimuliert, wie „in vitro“ Untersuchungen mit Luteinzellkulturen (Okuda et al., 1998) sowie am mikrodialysierten CL (Miyamoto et al., 1993) gezeigt haben.

In vitro Untersuchungen beim Schwein haben gezeigt, dass nach einer anfänglich verstärkten lutealen Sekretion von PGE₂ und PGF₂ α diese gegen Mitte der Lutealphase (Tag 7 - 14 p.o.) abfällt; ein erneuter Anstieg von PGF₂ α erfolgt während der Luteolyse zwischen den Tagen 15 und 19 p.o., woraus auf dessen Beteiligung an den zur Luteolyse führenden Mechanismen geschlossen wurde (Patek und Watson, 1983).

Prostaglandine vermitteln ihre Wirkung über transmembranäre Rezeptoren, die an G-Proteine (G_q, G_s, G_i) gekoppelt sind. Mittels sekundärer Botenstoffen wie zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositoltriphosphat (InsP₃/Ca²⁺), werden extrazelluläre Signale in intrazelluläre umgewandelt.

Für PGE₂ wurden vier Rezeptorsubtypen kloniert (EP1-EP4), die durch vier verschiedene Gene kodiert werden (Arosh et al., 2004; Palliser et al., 2005). PGF₂ α bindet an den PGF₂ α -Rezeptor (PGFR). Beim Schaf wurden zwei als Splicevarianten definierte Isoformen dieses Rezeptors beschrieben, die als PGFR_A und PGFR_B bezeichnet werden

(Pierce et al., 1997). EP1 und PGFR sind an ein G_q -Protein gekoppelt, das über die Phospholipase C (PLC) die Synthese von Inositoltriphosphat, die Freisetzung des intrazellulären Ca^{2+} und die Synthese von Diacylglycerol steigert. Diacylglycerol gilt als Aktivator der Proteinkinase C (PKC). Der EP3-Rezeptor ist als einziger Prostaglandinrezeptor an ein G_i -Protein gekoppelt und hemmt die Hormon-induzierte Bildung von cAMP, während sowohl der EP2 als auch der EP4 an G_s -Proteine gekoppelt sind und so einen PGE_2 -abhängigen cAMP-Anstieg in der Zelle vermitteln (Arosh et al., 2004; Palliser et al., 2005).

Bislang wurde die PGFR-Sequenz bei Maus (Sugimoto et al., 1994), Ratte (Kitanaka et al., 1994; Lake et al., 1994), Schaf (Graves et al., 1995), Rind (Sakamoto et al., 1994) und Mensch (Lake et al., 1994; Abramovitz et al., 1994) kloniert und charakterisiert. Beim Rind haben Arosh et al. (2004) mittels Immunhistochemie die Expression von EP2 und PGFR in großen und kleinen Luteinzellen nachgewiesen, wobei der PGFR überwiegend in den großen Luteinzellen lokalisiert war. Die an mRNA- und Protein- gemessene höchste Expression von EP2 wurde in der frühen und mittleren CL-Phase beobachtet. Dagegen zeigt EP3 seine maximale mRNA-Expression gegen Ende der Lutealphase. Der PGFR zeigte einen graduellen Anstieg der mRNA-Expression in den sich formierenden CL mit einem Maximum im reifen CL; danach fiel die Expression des Rezeptors wieder ab.

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Expression der Prostaglandinrezeptoren im CL beim Schaf (Tsai et al., 1998; Wiepz et al., 1992). Für den EP3 gilt dabei, dass dieser spezifisch in den kleinen und der PGFR spezifisch in den großen Luteinzellen exprimiert wird (Tsai et al., 1998; Juengel et al., 1996).

Bei Untersuchung an CL vom Schwein mittels *in situ* Hybridisierung wiesen Boonyaparakob et al. (2003b) die Expression von PGFR in den großen und kleinen Luteinzellen nach. Eine semiquantitative Analyse ergab die höchste PGFR-Expression in der mittleren und späten CL-Phase, also in reifen und degenerierenden CL.

Auch Endothelzellen sind in der Lage den PGFR zu exprimieren, wie für das Rind beschrieben wurde (Mamluk et al., 1998). So kann $PGF2\alpha$ direkt auf diese Zellen einwirken und deren Degeneration verursachen. Als Folge kommt es zur Verminderung

der Durchblutung der CL, was indirekt die Apoptose verursacht (Mamluk et al., 1998; Niswender et al., 2000;) (Abb. 5).

2.5.4.2 Beeinflussung der lutealen Steroidhormonbiosynthese durch Prostaglandine

Unter der Einwirkung von luteotropen Stimuli wie LH, PGE₂ oder PGI₂ kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche die Aufnahme von Low-density Lipoproteinen (LDL) und High-density Lipoproteinen (HDL) in die Luteinzellen stimuliert. Gleichzeitig werden unter der Einwirkung von Cholesterinesterase, die Cholesterinester hydrolysiert und somit die intrazellulären Cholesterinvorräte freigesetzt. Die PKA stimuliert weiterhin den aktiven Transport von Cholesterin im Zytosol zu den Mitochondrien durch das Sterol Carrier Protein (SCP₂), insbesondere wird jedoch unter der Einwirkung von PKA der Cholesterintransport mittels Steroid Acute Regulatory Protein (StAR-Protein) von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran, d.h. zum P-450_{ssc}-Enzym-Komplex gefördert, wo die Pregnenolonsynthese erfolgt. Anschließend wird Pregnenolon in das Zytoplasma freigesetzt und durch die 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-Δ4/5-Isomerase (3βHSD) in Progesteron umgewandelt (Wiltbank et al., 1993) (s. Abb. 5).

Durch PGF₂α kann der Syntheseweg dahingehend beeinflusst werden, dass es nach Aktivierung des PGFR durch endokrin wirksames PGF₂α zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC) kommt, die der Wirkung der PKA entgegenstehen, indem der Transport von Cholesterin durch das Zytosol und durch die Mitochondrialmembran gehemmt wird. Gleichzeitig steigern PLC und PKC die Expression der Prostaglandinsynthase (PGS; Cox). Das daraus resultierende luteale PGF₂α wirkt als autokriner Faktor synergistisch zum endokrin wirksamen PGF₂α, die Progesteronsynthese wird gehemmt. Eine weitere Folge der Aufregulation der lutealen PGS/Cox liegt in einer Herunterregulierung der steroidproduzierenden Enzyme, wie beispielsweise 3βHSD (Pate und Keyes, 2001; Niswender et al, 2000; Wiltbank et al., 1993) (Abb. 5).

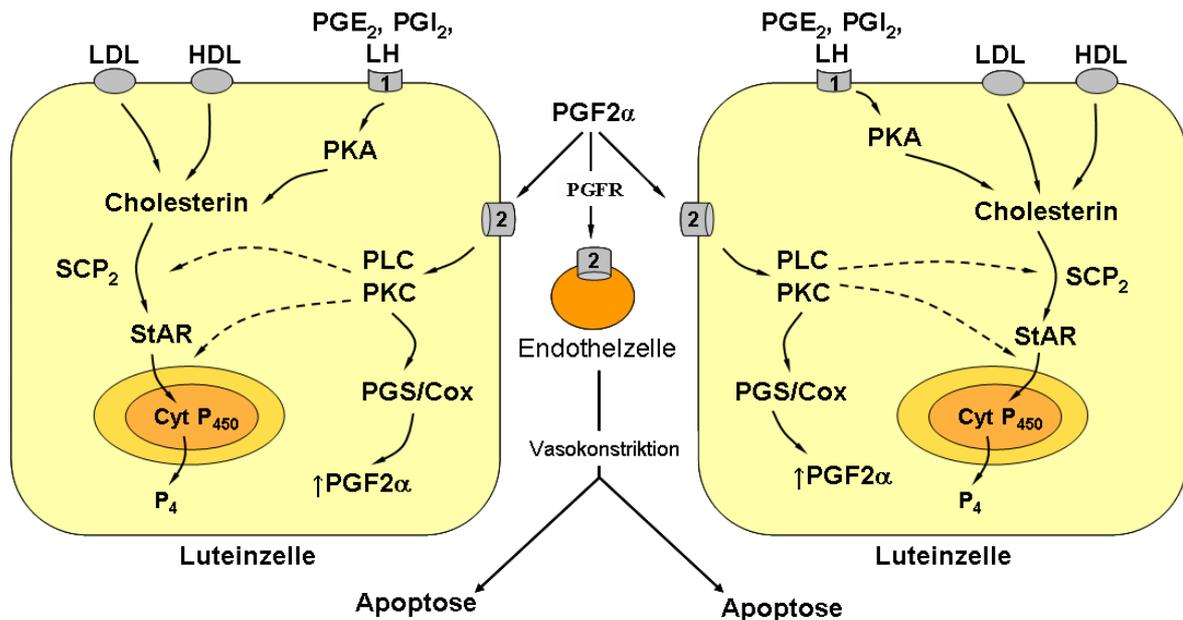


Abb. 5: Schematische Darstellung der enzymatischen Kaskade der durch die Prostaglandine induzierten lutealen Regression (nach Pate und Keyes, 2001); *Cyt P450* = cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme; *HDL* = high density lipoprotein; *LDL* = low density lipoprotein; *SCP2* = Sterol Carrier Protein 2; *StAR* = Steroid Acute Regulatory Protein; *PLC* = Phospholipase C; *PKC* = Proteinkinase C; *PKA* = Proteinkinase A; *PGS/Cox* = Prostaglandinsynthase/Cylooxygenase; 1) *PGE₂*-, *PGI₂*-, *LH*- Rezeptor; 2) *PGFR* = *PGF_{2α}* - Rezeptor; → Aktivierung der Reaktion; --> Hemmung der Reaktion;

2.6 Spezielle Aspekte zur para-/autokrinen Regulation der CL-Funktion beim Hund

2.6.1 Steroide

Der Frage, ob Steroidhormone als para-/autokrine Faktoren auch bei der Hündin eine Rolle bei der Steuerung der CL-Funktion spielen, gingen Papa (2001) und Vermeirsch et al. (2001) nach, indem sie die Expression der Estradiol- und Progesteronrezeptoren (ER, PR) im CL im Verlauf des Diöstrus untersuchten. Mittels RT-PCR konnte die Expression des PR und ER im CL zweifelfrei nachgewiesen werden (Hoffmann et al., 2004b), bei Anwendung von immunhistochemischen Verfahren ergaben

sich Färbereaktionen zu allen Untersuchungszeitpunkten, die das Vorkommen von PR und ER sowohl in den Luteinzellen als auch in den Stromazellen anzeigten. Für den PR konnte ein Bezug zum Zeitpunkt der Probeentnahme festgestellt werden; so waren die Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma negativ mit der Zahl der den PR exprimierenden Luteinzellen und Stromazellen korreliert. Für den ER ergab sich kein diesbezügliches Zusammenhang, obwohl dessen Expression positiv mit der des PR korreliert war (Hoffmann et al., 2004b). Das damit eindeutig nachgewiesene Vorkommen von PR und ER im CL der Hündin legt nahe, dass dem lutealen Progesteron und Estradiol-17 β (Nishiyama et al., 1999) auch eine autokrine/parakrine Rolle bei Steuerung der Lutealfunktion zukommt.

2.6.2 Rolle des Immunsystems in der Regulation der CL-Funktion der Hündin

Auch für den Hund konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem offensichtlich an der Regulation der CL-Funktion beteiligt ist. So zeigten Befunde von Hoffmann et al. (2004a,b), dass in der frühen und späten Lutealphase in den CL die Zahl an CD4 positiver Lymphozyten und MHC II Antigen exprimierender Zellen signifikant erhöht war. Das Vorkommen CD8 positiver Lymphozyten war ebenfalls zu Beginn der CL-Phase am höchsten, eine Abnahme ergab sich für die Tage 15 bis 30 p.o., ein erneuter Anstieg wurde am Tag 60 nachgewiesen, der wieder von einem Abfall gefolgt war.

Mittels qualitativer RT-PCR konnten Engel et al. (2005) die Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF α und TGF β 1 im CL im Verlauf des Diöstrus nachweisen. Darüber hinausgehend ergaben sich auch Hinweise auf eine Expression von IL-6 und IFN γ . Diese Befunde legen einen funktionellen Zusammenhang zu den im CL nachgewiesenen Immunzellen nahe, endgültige Schlussfolgerungen ergeben sich derzeit jedoch noch nicht.

2.6.3 VEGF-System

Auf die Bedeutung der Angiogenese und die die Angiogenese beeinflussenden Schlüsselfaktoren, wie den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), wurde bereits in Kapitel 2.5.1 eingegangen. Dazu beim Hund durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten (Tag 20, 30, 50, 60 und 120 p.o.) im CL positive

immunhistochemische Signale für den VEGF beobachtet werden konnten (Mariani et al., 2004). VEGF wurde in Endothelzellen, Perizyten, Stroma- und Luteinzellen lokalisiert, wobei sich von Tag 20 bis 60 p.o. ein Anstieg der Anzahl immunpositiver Luteinzellen zeigte. Ein ähnlicher Effekt wurde für den VEGFR-1 beobachtet, während die VEGFR-2-Expression im Laufe des Diöstrus in den Lutein- und Endothelzellen signifikant abnahm. Die Expression von VEGFR-2 war mit dem Verlauf der Progesteronkonzentration im Blutplasma positiv korreliert.

Aus dem unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden VEGF-Rezeptoren, von denen nur die Expression von VEGFR-2 statistisch signifikant mit der Progesteronproduktion verbunden war, schlossen die Autoren auf unterschiedliche Regulationsmechanismen, durch welche die VEGF-Rezeptoren als para-/autokrine Regulationsfaktoren die CL-Funktion beim Hund beeinflussen können.

2.7 Fragestellungen

2.7.1 Frage I: werden- und wenn „ja“ in welchem Umfang- $PGF2\alpha$, $PGE2$ und $PGF2\alpha$ -Rezeptor im CL der nicht graviden Hündin exprimiert?

2.7.1.1 Begründung und erfasste Parameter

Prostaglandine werden in fast allen Zellen des Körpers gebildet und üben dort als Gewebshormone eine lokale autokrine und parakrine Wirkung aus.

Prostaglandine können nicht gespeichert werden. Sie werden direkt nach der Synthese (*de novo*-Synthese) freigesetzt, um ihre Funktion ausüben zu können, bevor sie in der Lunge durch die Prostaglandindehydrogenase (PGDH) deaktiviert werden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt weniger als eine Minute (Buddecke, 1985). Für Ratte, Kaninchen, Schwein, Schaf, Rind, Pferd und Mensch konnte gezeigt werden, dass Prostaglandine an der Regulation der CL-Funktion beteiligt sind (s.o).

Inwieweit Wirkstoffe, die zu der Gruppe der Prostaglandine gehören, auch im CL der Hündin gebildet werden und dort als para-/autokrine Regulationsfaktoren an der Funktionssteuerung des caninen CL beteiligt sind, ist derzeit unbekannt. Auf eine solche Möglichkeit verweisen jedoch Hoffmann et al. (1996).

2.7.1.2 Prostaglandin-Biosynthese und Definition der in der vorliegenden Untersuchung erfassten Parameter

Die gemeinsame Synthesestufe für die Bildung von Prostaglandinen, Prostacyclinen, Thromboxanen und Leukotrienen ist die Arachidonsäure.

Nach Phospholipase A₂ vermittelter Bildung von Arachidonsäure aus membranständigen Phospholipiden ist die Cyclooxygenierung der Arachidonsäure ein weiterer wichtiger Syntheseschritt. Durch Einwirkung der Cyclooxygenase (Cox) entsteht das instabile Prostaglandin G₂ (PGG₂) bzw. das Prostaglandin H₂ (PGH₂). Diese Zwischenformen werden durch verschiedene Enzyme in unterschiedliche Endformen überführt: durch die Thromboxansynthase in Thromboxan A₂, durch die Prostacyclinsynthase in Prostacyclin, durch die Endoperoxidaseisomerase in die Prostaglandine E₂ und D₂ und durch die Aktivität von Reduktasen das PGF₂α (Abb. 6).

Das Schlüsselenzym dieser Reaktionen ist die Cyclooxygenase (Cox). Man unterscheidet heute eine konstitutive Form (Cox1) und eine induzierbare Form des Enzyms (Cox2). Die konstitutive Form (Cox1) wird in den meisten Geweben des Körpers exprimiert, während die Expression der induzierbaren Form (Cox2) generell nur bei Entzündungsreaktionen oder unter der Einwirkung von Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren und nur in bestimmten Geweben, z.B. Prostata, Gehirn, Nieren, Uterus und in Tumorgewebe, wie z.B. Kolon- und Blasenkrebs, induziert wird (Herschman, 1996). Es wurde auch über eine dritte Form (Cox3) des Enzyms berichtet; diese entspricht der Cox1, bei der das erste Intron nach dem posttranskriptionellen Splicing noch vorhanden ist (Wiltbank und Ottorobe, 2003), ihre biologische Rolle ist bis jetzt unbekannt.

Die Synthese von PGF₂α aus PGH₂ kann auf drei verschiedenen Synthesewegen erfolgen (s. Abb. 6): einmal direkt aus PGH₂ unter der Einwirkung von 9,11-Endoperoxidase-Reduktase, die auch als Prostaglandin F₂α-Synthase (PGFS) bezeichnet wird (dies gilt als Hauptweg der PGF₂α-Synthese), andernmal indirekt indem aus PGH₂ via PGE- bzw. PGD-Synthase (PGES, bzw. PGDS) zunächst PGE₂ oder PGD₂ gebildet werden, aus denen dann via 9-Ketoreduktase bzw. 11-Ketoreduktase das PGF₂α entsteht. Alle an der Synthese von PGF₂α aus PGH₂ beteiligten Enzyme gehören zu der α-Ketoreduktase-Familie und zeigen eine sehr hohe Sequenzhomologie, die 90 % überschreiten kann (Madore et al., 2003).

Beim Rind sind derzeit sechs Isoformen der PGFS synthetisiert und charakterisiert worden; einige von ihnen zeigen sowohl eine 9- als auch eine 11-Ketoreduktase Aktivität und sind daher in der Lage PGE_2 und PGD_2 in $\text{PGF}_{2\alpha}$ umzusetzen (Madore et al., 2003).

Eine Besonderheit beim Rind und Kaninchen stellt die 20α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase dar, ein Enzym, das Progesteron in 20α -Hydroxy-Progesteron überführt und damit für dessen biologische Deaktivierung mitverantwortlich ist, gleichzeitig aber auch eine PGFS-Aktivität aufweist. Es wurde von Madore et al. (2003) als die zu den α -Ketoreduktasen gehörende PGFS beschrieben, die für die endometriale Synthese des luteolytischen $\text{PGF}_{2\alpha}$ beim Rind verantwortlich ist.

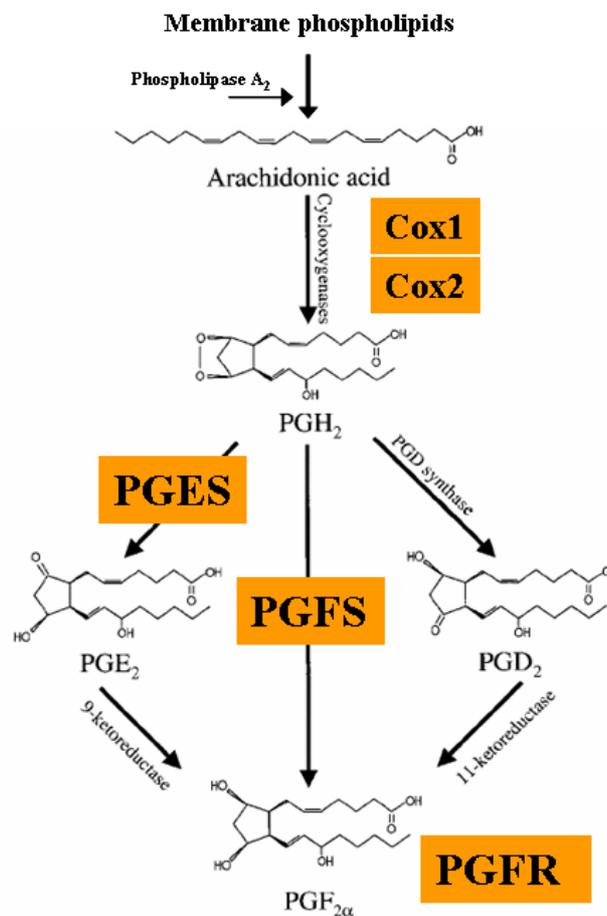


Abb. 6: $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthesewege (nach Madore et al, 2003);

■ in den eigenen Untersuchungen erfasste Parameter

Abgeleitet aus dem bisherigen Kenntnisstand sollten daher in vorliegenden Untersuchungen durch die Erfassung der Expression der für die Prostaglandinsynthese verantwortlichen Enzyme: Cox1, Cox2, PGFS, PGES, sowie des PGFR erste Informationen über eine mögliche Bedeutung des Prostaglandinsystems für die Kontrolle der CL-Funktion der Hündin im Verlauf des Diöstrus erhalten werden.

2.7.2 Frage II: Bedeutung der Expression der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β HSD) als ein möglicher Rate-limiting-Step für die Progesteronsynthese im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus

Die 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase- Δ 4/5-Isomerase (3 β HSD) katalysiert die Umwandlung der 3-Hydroxy- Δ^5 -Steroiden Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron in die 3-Keto- Δ^4 -Steroide Progesteron und Androstendion (Abb. 8). Abgesehen von steroidproduzierenden Geweben, wurde die 3 β HSD auch in einigen nicht-steroidproduzierenden Geweben gefunden, wie z.B. der Schweißdrüse der Ratte und des Menschen (Muir et al., 1970; Simpson et al., 1983).

Einige der 3 β HSD- Isoformen zeigen eine zusätzliche Dehydrogenase Aktivität, und zwar die der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Reduktase (17 β HSD). Sie sind dadurch in der Lage, Testosteron in Androstendion umzuwandeln, wodurch Testosteron deaktiviert wird. Diese besondere Aktivität der 3 β HSD wurde für den Typ I (adrenal/gonadal) und VI (utero/embryonal) der Maus beschrieben (Mason et al., 2004). Für den Typ I und IV der Ratte konnte die 17 β HSD Aktivität für 5 α -Dihydrotestosteron als Substrat gezeigt werden. Dagegen wies keine der beiden humanen 3 β HSD Isoformen [Typ I (plazentar) und Typ II (adrenal/gonadal)] eine 17 β HSD Aktivität auf (Mason et al., 2004).

Mehrere Isoformen des Enzyms wurden unter anderem bei Maus, Ratte und Mensch beschrieben (Mason et al., 2004). Sie zeigen unterschiedliche kinetische und katalytische Eigenschaften in Bezug auf das Gewebe und das Alter der Tiere (Mason et al., 2004). Bei der Maus wurden beispielsweise 6 Isoformen der 3 β HSD (Typ I-VI) beschrieben. Davon wird bei adulten Mäusen die 3 β HSD Typ I nur in den Gonaden und Nebennieren exprimiert, während 3 β HSD Typ II und III in Leber und Nieren vorkommen (Bain et al., 1991; Abbaszade et al., 1995). Die Expression der 3 β HSD Typ V wurde nur in

der Leber von adulten männlichen Tieren nachgewiesen (Abbaszade et al., 1995; Park et al., 1996).

Die 3β HSD Isoformen werden von verschiedenen Genen kodiert und entstehen nicht als Produkte eines alternativen Splicings (Abbaszade et al., 1997; Bain et al., 1991).

Bei der graviden und nicht-graviden Hündin stellt das CL die einzige Quelle des Progesterons dar (s. Kap. 2.1). Abgesehen vom nahezu identischen Verlauf zeigten Steinetz et al. (1989), dass gravide Tiere im Mittel eine höhere Konzentration an Progesteron im Blutplasma im Vergleich zu ingraviden aufwiesen.

Die Expression der 3β HSD wurde im caninen CL von graviden Tieren an den Tagen 40 und 50 der Gravidität, mittels Immunhistochemie (IHC) gezeigt (Nishiyama et al., 1999). Die Signale waren in den Luteinzellen lokalisiert, wobei sich stärkere positive Reaktionen überwiegend in den Randfeldern und weniger in den mittleren Feldern der CL gezeigt haben.

Die canine 3β HSD-Sequenz wurde bislang nicht charakterisiert. Zur Beantwortung der gestellten Frage war es daher Ziel der vorliegenden Arbeit, die canine 3β HSD-cDNA zu isolieren, zu klonieren und zu charakterisieren, mit dem Ziel weiterführende spezifische Untersuchungen über den Verlauf der Expression während des Diöstrus auf Protein- und mRNA-Ebene durchzuführen.

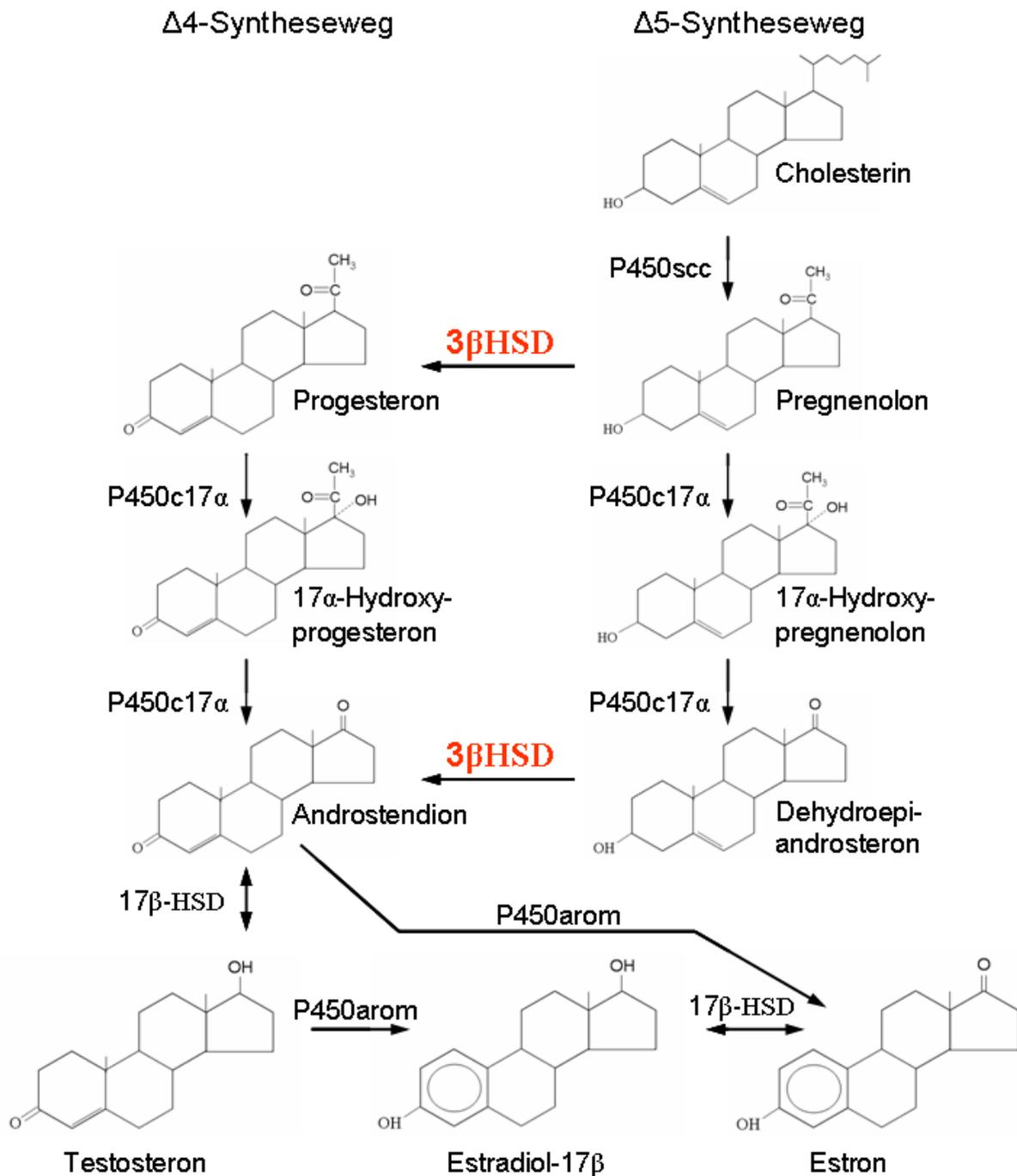


Abb. 8: Rolle der 3 β HSD in der Steroidhormon-Biosynthese; P450scc = Cytochrom P450 side-chain-cleavage enzym; P450c17 α = Cytochrom P450c17 α (17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase); 3 β HSD = 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase- $\Delta^4/5$ -Isomerase; 17 β HSD = 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase; P450arom = P450-Aromatase.

3 MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE DER KLONIERUNGEN

3.1 Versuchsdesign

Bei 31 Hündinnen unterschiedlicher Rassen wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Ovulation (Tag 5, 15, 25, 35, 45 und 65) die Ovarien mittels Ovariohysterektomie (OHE) entnommen ¹. Zu jeder Gruppe gehörten jeweils 5 Hündinnen, mit Ausnahme von Tag 25, an dem 6 Tiere ovariohysterektomiert wurden. Die Corpora lutea wurden vom Bindegewebe befreit, separiert und auf die Expression von Cox1, Cox2, PGES, PGFS, PGFR und 3 β HSD untersucht.

3.2 Probengewinnung

Als Ovulationstag (Tag 1) wurde der Tag definiert, an dem der Plasmaprogesteronwert 5 ng/ml erreicht oder überschritten hatte (siehe dazu Concannon et al., 1989).

Zur Bestimmung des Ovulationszeitpunktes wurden ab dem Beginn der Läufigkeit regelmäßig im Abstand von 1-2 Tagen Blutproben aus der Vena cephalica antebrachii in ein heparinisiertes Blutröhrchen gewonnen. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei ca. 1600 g wurde das Plasma aufgenommen, in ein Polypropylenröhrchen überführt und bis zur Progesteronbestimmung bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung von Progesteron im Plasma erfolgte nach dem von Hoffmann et al. (1973) beschriebenen radioimmunologischen Verfahren.

Für die Methoden der Immunhistochemie (IHC), der in situ Hybridisierung (ISH) und der in situ RT-PCR wurden die CL nach der Entnahme in 10 % neutral gepuffertem Formalin für 24 Stunden fixiert. Danach wurden die Gewebeproben zum Auswaschen des Fixans in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7.2) bis zu einer Woche aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde der Puffer mehrfach gewechselt. Anschließend wurden die Gewebeproben über jeweils 24 Stunden in 30, 50 und 70%-igen Alkohol dehydriert, danach erfolgte die Einbettung in Paraffin.

¹ Versuchsgenehmigung Nr.: II 25-3-19c20/15c GI 18/14 und VI 63-19c20/15c GI 18/14

Für die RNA-Konservierung wurden die CL zu Beginn in Tissue Tec[®] O.C.T. (Vogel, Giessen) in einem Methylbutanol-Bad über flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Dieses Verfahren wurde im Verlauf der Untersuchungen durch die Verwendung von RNAlater[™] (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden), einem wässrigen Reagenz, das zelluläre RNA in Gewebe- und Zellproben stabilisiert (das Masse:Volumen-Verhältnis betrug 1 : 6) ersetzt; die CL wurden in RNAlater[™] bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

3.3 Qualitative RT-PCR

3.3.1 RNA-Isolierung aus dem CL

Von dem in O.C.T. eingebettetem Gewebe wurden ca. 20 Kryostatschnitte von 20 µm Dicke angefertigt. Sie wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, das 1 ml Trizol[®]-Reagenz (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) enthielt, überführt und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig geschüttelt.

Das mit RNAlater[®] behandelte Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, danach mit einer Aluminiumfolie umwickelt und durch Schläge mit einem sauberen Hammer vorzerkleinert. Anschließend wurden die resultierenden Gewebesplitter aus der Aluminiumfolie herausgenommen, in einen vorgekühlten Mörser in ein Eisbad platziert und mit einem sterilen, vorgekühltem Pistill in flüssigem Stickstoff weiter zerkleinert. Das daraus entstandene Gewebepulver (ca. 100 mg) wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem sich 1 ml Trizol[®] befand, und mittels eines Ultra-Turrax[®] T-8 (IKA-Werke GmbH, Staufen) homogenisiert.

Die nun folgende Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers des Trizol[®]-Reagens (GibcoBRL, Life Technologies).

Zu den in Trizol[®] aufgelösten bzw. homogenisierten Proben wurden 300 µl eisgekühlten (-20 °C) Chloroforms (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugegeben. Nach kräftigem Schütteln und einer fünf minütigen Inkubation auf Eis wurden die Phasen durch Zentrifugation (12400 g, 15 min, 4 °C) getrennt. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase

wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA durch Zugabe von Isopropanol (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zu gleichen Volumenanteilen, wozu die Proben entweder über 30 min bei -20 °C oder über Nacht bei -80°C stehen gelassen wurden. Die Proben wurden dann bei 14810 g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem zweimaligen Waschen in eisgekühltem 70 %igem Ethanol (Roth GmbH & Co) wurde das Pellet etwa 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, wonach es in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert wurde.

Die frischgewonnene, mit DEPC-Wasser resuspendierte RNA wurde zusätzlich mit 1 U/µl RNase-Inhibitor (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) zur Unterdrückung der RNase-spezifischen Enzymaktivität versetzt.

Die Gesamt-RNA-Konzentration (ng/µl) wurde mittels eines UV-Spektrofotometers (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Hamburg) bestimmt. Dazu wurde eine Verdünnung der RNA-Präparation von 1 : 20 mit DEPC-Wasser hergestellt. Die Messungen erfolgten in Kunststoff-Einmalküvetten (Eppendorf Uvette® 220-1600 nm, Westbury, USA). Die Extinktion wurde bei 260 nm gemessen. Als Leerwert wurde DEPC-Wasser verwendet.

Anhand der gemessenen Konzentration wurde eine Arbeitsverdünnung von 0,2 µg Gesamt-RNA / µl hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die unverdünnte Stammlösung der RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.2 DNase-Behandlung

Vor jeder RT-PCR wurde eine Behandlung der gewonnenen RNA mit DNase durchgeführt, um eine Amplifikation von eventuell noch in der Probe vorhandener genomischer DNA und somit ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden.

Die Ansätze für die DNase-Behandlung erfolgten unter Kühlung auf Eis in 0,25 ml Plastikreaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) (Zusammensetzung s. Tabelle 1). Das verwendete MnCl₂ wurde von Sigma-Aldrich™ Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen; der 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) stammte aus dem RT-PCR Core Kit von Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weistadt; die DNase I, RNase-frei, von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; der RNase-Inhibitor von MBI Fermentas.

Zum DNase-Mix wurden 6,65 μl RNA-Lösung (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben, um ein Endvolumen von 9,90 μl zu erhalten. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

Tabelle 1: Zusammensetzung des DNase-Mixes für die DNase-Behandlung

Komponenten	Einfacher Ansatz (μl)	Stammlösung
MnCl ₂	1 μl	10 mM
PCR-Puffer	1 μl	10 x
DNase I RNase frei	1 μl	10 U/ μl
RNase-Inhibitor	0,25 μl	40 U/ μl
Gesamtvolumen	3,25 μl	

Die DNase-Behandlung wurde in einem T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen) bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

- Phase a) 10 min 37 °C
- Phase b) 5 min. 75 °C
- Phase c) abkühlen auf 4 °C

Da die Stabilität der RNA nach der DNase-Behandlung nur für sehr kurze Zeit gewährleistet ist, wurde die Reverse Transkription (RT) direkt im Anschluss daran durchgeführt.

3.3.3 Reverse Transkription (RT)

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des RT-PCR Core Kits (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weistadt) in Anlehnung an das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll durchgeführt. Als Startprimer wurden unspezifisch bindende Primer (Random Hexamers) eingesetzt.

Pro Ansatz wurde 1,5 μl DNase behandelte RNA-Lösung, entsprechend 0,2 μg der Gesamt-RNA, den 8,5 μl des RT-Mastermixes zugegeben (Zusammensetzung s. Tabelle 2); das Pipettieren erfolgte auf Eis.

Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-Mastermixes für die RT

Komponenten	Einfacher Ansatz (μ l)	Stammlösung
MgCl ₂	2	25 mM
PCR-Puffer	1	10 x
dNTP-Mix ¹⁾	4	10 mM
Random Hexamers	0,5	50 μ M
RNase-Inhibitor	0,5	20 U/ μ l
Reverse Transkriptase	0,5	50 U/ μ l
Gesamtvolumen	8,5	

¹⁾ Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix

Die Probe wurde danach in den T1 Thermocycler 48 verbracht und nach folgendem Programm behandelt:

8 min bei 21 °C,
 15 min bei 42 °C,
 5 min bei 99 °C und
 5 min bei 5 °C.

Nach einer weiteren Temperaturabsenkung auf 4 °C können die Proben so bis zu ihrer Entnahme im Thermocycler bei 4 °C aufbewahrt werden.

Die während der RT synthetisierte cDNA ist stabil und kann bei -20° C bis zur weiteren Untersuchung gelagert werden.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die qualitative PCR wurden die 10 μ l der cDNA-Lösung mit 40 μ l Primer-Mix vereinigt. Der Primer-Mix besteht aus dem PCR-Prämix (Pufferlösung) (s. Tabelle 3), dem genspezifischer Primer und die thermostabile DNA-Polymerase (GOLD Ampli Taq) zugegeben wurden (Zusammensetzung s. Tabelle 4).

Die verwendeten Primer-Paare wurden mit Hilfe der Software Oligo Analyser 1.0.2/Oligo Explorer 1.1.0. (Freeware aus dem Internet; ©Teemu Kuulasma, University of Kuopio, 70211 Kuopio, Finnland) erstellt und bei der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, in Auftrag gegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Prämix

Komponenten	Einfacher Ansatz (μl)	Stammlösung
MgCl ₂	2	25 mM
PCR-Puffer	4	10 x
DEPC-Wasser	32,75	
Gesamtvolumen	38,75	

Tabelle 4: Zusammensetzung des Primer-Mixes

Komponenten	Einfacher Ansatz (μl)	Stammlösung
PCR-Prämix	38,75	---
Primer-Vorverd.-Mix*	1	10 pmol/ μl
GOLD AmpliTaq**	0,25	5 U/ μl
Gesamtvolumen	40	

* Sense- und Antisense-Primer (jeweils 20 pmol/ μl in DEPC-Wasser) wurden vorab im Verhältnis 1:1 gemischt. Im Primer-Verdünnungs-Mix liegen die beiden Primer somit in einer Konzentration von 10 pmol/ μl vor.

** Um eine Hot-Start PCR zu gewährleisten, wurde die GOLD AmpliTaq® DNA-Polymerase verwendet.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung/Aktivierung der GOLD AmpliTaq	95 °C	10 min	
Beginn der Zyklen			
Denaturierung	94 °C	1 min	35 Wiederholungen
Annealing = T _A	Primerpaarabhängig	2 min	
Verlängerung	72 °C	1,30 min	
Ende der Zyklen			
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Bis zur Entnahme	4 °C		

Bei jeder PCR wurde eine Positivkontrolle mit dem Housekeeping Gene - GAPDH (1,3-Diphosphoglycerat) durchgeführt, um die Integrität der mRNA zu überprüfen.

Als Negativkontrolle wurde DEPC-Wasser anstelle der RNA für die DNase-Behandlung eingesetzt und dieses bis zur Amplifikation wie eine reguläre Probe behandelt. Somit konnten ggf. RNA- und DNA-Kontaminationen von Substrat und Lösungen erkannt und ausgeschlossen werden.

Die hundespezifischen Primersequenzen der für die Amplifikation der GAPDH, Cyclooxygenase-1 (Cox1) und Cyclooxygenase-2 (Cox2) kodierenden Fragmente sind, zusammen mit den Accession Nummern der Genbank, in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Verwendete Primer in der qualitativen PCR

Primer	Accession-Nr. (Genbank)	Basensequenzen	Länge des Amplifikats
GAPDH-for GAPDH-rev	AB038240	5'- GCC AAG AGG GTC ATC ATC TC -3' 5'- GGG GCC GTC CAC GGT CTT CT -3'	229 bp
Cox1-for Cox1-rev	AF535139	5'-TGG ATG GAG TGA TGC TTC -3' 5'-CTG CTT TGG GGG TAT CTC-3'	329 bp
Cox2-for Cox2-rev	AY044905	5'-ACA GGA GAG AAG GAA ATG GC-3' 5'-GGA TTG AGG CAG TGT TGA TG-3'	250 bp

for = forward; rev = reverse; bp = basepaar

Die in der RT-PCR verwendeten Annealing Temperaturen (T_A) waren:

GAPDH 57 °C,

Cox1 53 °C und

Cox2 57 °C.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden 0,82 g Agarose (GibcoBRL, Life Technologies) in 91 ml 1 x TBE Puffer aufgekocht, es resultierte ein 2%iges Agarosegel. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 – 80 °C wurden 2 µl Ethidiumbromid (1 % Roth GmbH & Co.) zugesetzt, gemischt und das flüssige Gel in eine horizontale Gelelektrophoresekammer (Keutz, Labortechnik GmbH, Reiskirchen) gegossen und bis zum Erstarren stehen gelassen. Zur Bildung der Geltaschen war dabei ein 20-zähliger Kamm eingesetzt worden. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingelegt und diese mit 1 x TBE Puffer bis zu einem Stand von ca. 0,5 cm oberhalb des Gels aufgefüllt.

Nach Zugabe von 1,5 µl Ladepuffer (6x Loading Dye Solution; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zu 15 µl des PCR-Produktes wurde das Gemisch in die Geltaschen pipettiert. Ebenso wurde 1 µl des DNA-Größenstandards [100 bp DNA Ladder (GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon Rot)] nach Zugabe von 1,5 µl Ladepuffer und 7 µl DEPC-Wasser in eine Geltasche eingebracht. Die ca. 35 minütige Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 125 V und einer Stromstärke von 300 mA (Powersupply-Gerät; LKB Bromma, Golden, USA). Die Detektion der elektrophoretisch getrennten Proben erfolgte mittels UV-Licht im UV-Transluminator Biostep (Biostep GmbH, Jansdorf) bei 312 nm aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids, das mit der DNA interkaliert.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anschließend durch eine Sequenzierung, die von der Firma SRD-Scientific Research and Development GmbH (Oberursel) durchgeführt wurde, bestätigt.

3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Klonierung eines PCR-Produktes in einen Vektor muss das Produkt in den Vektor ligiert werden. Dafür muss es in gereinigter Form vorliegen. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und das Gewicht bestimmt. Die weitere Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen GmbH).

3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonierung mit einem schon geschnittenen pGEM®-T Vektor (pGEM®-T Vector System I; Promega GmbH,

Mannheim) durchgeführt. Die Schnittstelle sitzt inmitten des lacZ'-Gens, das für einen Teil (α -Fragment) der β -Galactosidase kodiert. Ein Substrat dieses Enzyms ist X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside), das hydrolytisch zum Indoxyl gespalten wird. Das gebildete wasserlösliche, gelbe 5-Brom-4-chlor-Indoxyl wird dann vom Sauerstoff der Luft zum wasserunlöslichen, tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Wird das DNA-Fragment in den Vektor eingebaut (ligiert), wird die Gensequenz der β -Galactosidase unterbrochen und das Enzym wird nicht mehr exprimiert. Daraus folgt, dass das X-Gal nicht mehr gespalten wird und somit auch kein blauer Farbstoff entsteht. Die nach der Transformation entstandenen Kolonien erscheinen dann nicht blau, wie die mit leerem Vektor, sondern weiß (Blau-Weisse-Selektion; Kolonien, die das Fragment eingebaut haben werden weiß, Kolonien ohne Fragment werden blau). Diese Reaktion kann gezielt durch IPTG (Isopropylthiogalactosid), einen Induktor der bakteriellen RNA-Polymerase der zur Transkription des lacZ'-Gens führt (Induktor des lac - Promotors), induziert werden. Ausserdem enthält der Vektor ein Antibiotikaresistenzgen (Ampicillin) das bewirkt, dass nur ein mit diesem Vektor transformiertes Bakterium auf einem mit Ampicillin versetzten Medium wachsen kann.

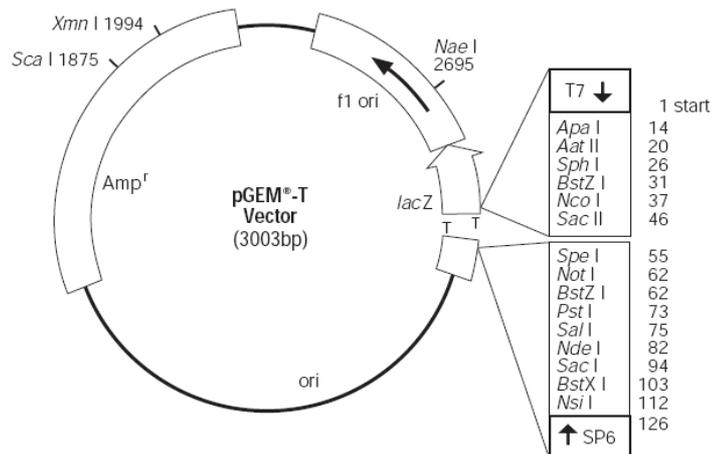


Abb. 9: Schema des pGEM®-T Vektors für die Ligation; *Amp^r* = Ampicillin-Resistenzgen; *f1 ori* = Replikationsstartpunkt; *lac Z* = α -Fragment des β -Galaktosidase Gens (aminoterminaler kodierende Sequenz der β -Galaktosidase), beinhaltet multiple Klonierungsstelle mit flankierenden Sp6- und T7-Promotoren

Ausführung

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen GmbH) (s. Kap. 3.4) aufgereinigt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur mittels T₄-Ligase in den pGEM[®]-T Vektor ligiert (Zusammensetzung des Ligationsansatzes s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Komponenten zur Ligation der PCR-Produkte in den pGEM-T Vektor
(Ligationsansatz)

Komponenten	Einfacher Ansatz (μl)
2x Rapid Ligation Buffer, T ₄ DNA Ligase	4
pGEM [®] -T Vektor	1
Insert (PCR Produkt)	4
T ₄ DNA Ligase	1

Danach erfolgte die Transformation des Vektors in Tetracyclin-resistente, kompetente E. coli (XL-1 Blue Bakterien) (Stratagene Europe, Holland), indem dem Ligationsansatz zuerst 100 μ l einer Suspension kompetenter Zellen zugegeben und danach für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Es folgte eine 2-minütige Inkubation im 42 °C warmen Wasserbad zur Induktion des so genannten „heat shock’s“, anschließend wurden die Ansätze für weitere 2 min auf Eis gestellt. Der „heat shock“ dient der Erhöhung der Transformationseffizienz, d.h. der erhöhten Aufnahme des ligierten Plasmids in die Bakterien. Nach Durchführung der Transformation erfolgte die Phase der Vorvermehrung. Dazu wurden dem Transkriptionsansatz 900 μ l 37°C warmes LB-(Growth)-Medium (Stratagene Europe, Holland), das 30 μ g Tetracyclin /ml enthält, zugegeben und die Proben bei 37°C über 60 min inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l dieser Probe pro Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die dazu verwendeten LB-Medium-Agarplatten [mit 30 μ g Tetracyclin /ml und 100 μ g Ampicilin/ml (Stratagene Europe, Holland)] wurden für die Blau-Weiß-Selektion so präpariert, indem je Platte zunächst 40 μ l X-Gal (s.o.) (20 mg/ml) und dann 40 μ l IPTG (s.o.) (200 mg/ml) mit einem speziellen Spatel ausgestrichen und die Platten danach bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

Nach der Selektion positiver Klone wurden ausgewählten Kolonien in flüssigem LB-Growth-Medium (3 ml LB-Medium versetzt mit 500 μ l 1%iger-Ampicilinlösung) über Nacht vermehrt und die Plasmide mit dem QIAprep[®] Miniprep-Kit (Qiagen GmbH)

extrahiert. Die so gewonnenen Plasmide (Plasmid-DNA) wurden anschließend mit den Restriktionsendonukleasen Nco I und Not I geschnitten (verdaut). Dafür wurde der Restriktionsansatz (s. Tabelle 8) vorbereitet und zu der in das Eppendorf-Gefäß vorgelegten gelösten Plasmid-DNA (5 µl) zugegeben. Die Proben wurden danach für 1-2 Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert, wonach die beiden Enzyme durch eine Inkubation bei 65 °C über 20 min hitzeinaktiviert wurden. Die Restriktionsprodukte wurden anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel hinsichtlich der Insertgröße analysiert.

Parallel dazu waren zur weiteren Überprüfung der korrekten Ligation und Transformation Plasmide zur Sequenzierung in ein kommerzielles Labor (SRD-Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) eingeschickt worden.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Ansatzes für den Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen Not I / Nco I

Komponenten	Einfacher Ansatz (in µl)
DEPC-Wasser	10
NEBuffer 3 ¹⁾ (für Not I Restriktase)	1
NEBuffer 4 ¹⁾ (für Nco I Restriktase)	1
Not I (10 U/µl) ¹⁾	1
Nco I (10 U/µl) ¹⁾	1
BSA ^{1)*}	1

¹⁾ New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.

* Bovines Serum Albumin

3.6 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Die Real Time PCR, auch “quantitative PCR” genannt, stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar. Sie wird eingesetzt, um das Expressionsniveau der RNA in einer Probe zu bestimmen.

Analog zu der konventionellen RT-PCR muss die mRNA vor der eigentlichen PCR in ein geeignetes Template (cDNA) mittels Reverser Transkriptase (RT) umgeschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die DNase-Behandlung und die RT nach den in Kap. 3.3.2 und 3.3.3 beschriebenen Protokollen.

Die relative quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der Expression von Cox1, Cox2, PGFR, PGES und 3 β HSD (Zielgene/“Targetgenes“) erfolgte mittels des TaqMan Sonden Verfahrens.

3.6.1 TaqMan PCR-Prinzip

Zusätzlich zu dem für die Amplifikation benötigten Primerpaares, wird der Reaktion ein kurzes Oligonukleotid zugesetzt, das als Gensonde spezifisch an die PCR-Matrize bindet. Dieses als TaqMan-Sonde bezeichnete Oligonukleotid ist am 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff „6-FAM“ markiert, am 3' Ende befindet sich eine Fluoreszenz löschende Verbindung (Quencher), TAMRA.

Im Falle einer vorhandenen Ziel-DNA im PCR-Ansatz verlängert - ausgehend von spezifisch gebundenen Primern - die Taq-Polymerase die komplementäre Sequenz und stößt dabei auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, die aufgrund der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut wird. Die dadurch eintretende Trennung von Fluoreszenzfarbstoff (F) und Quencher (Q) führt zu einem Fluoreszenzsignal, welches direkt mit der PCR-Produktzunahme korreliert (Abb.10). Da die Taq-Polymerase ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang entfalten kann, werden die nicht hybridisierten Sondenmoleküle nicht abgebaut und es zeigt sich kein Fluoreszenzsignal.

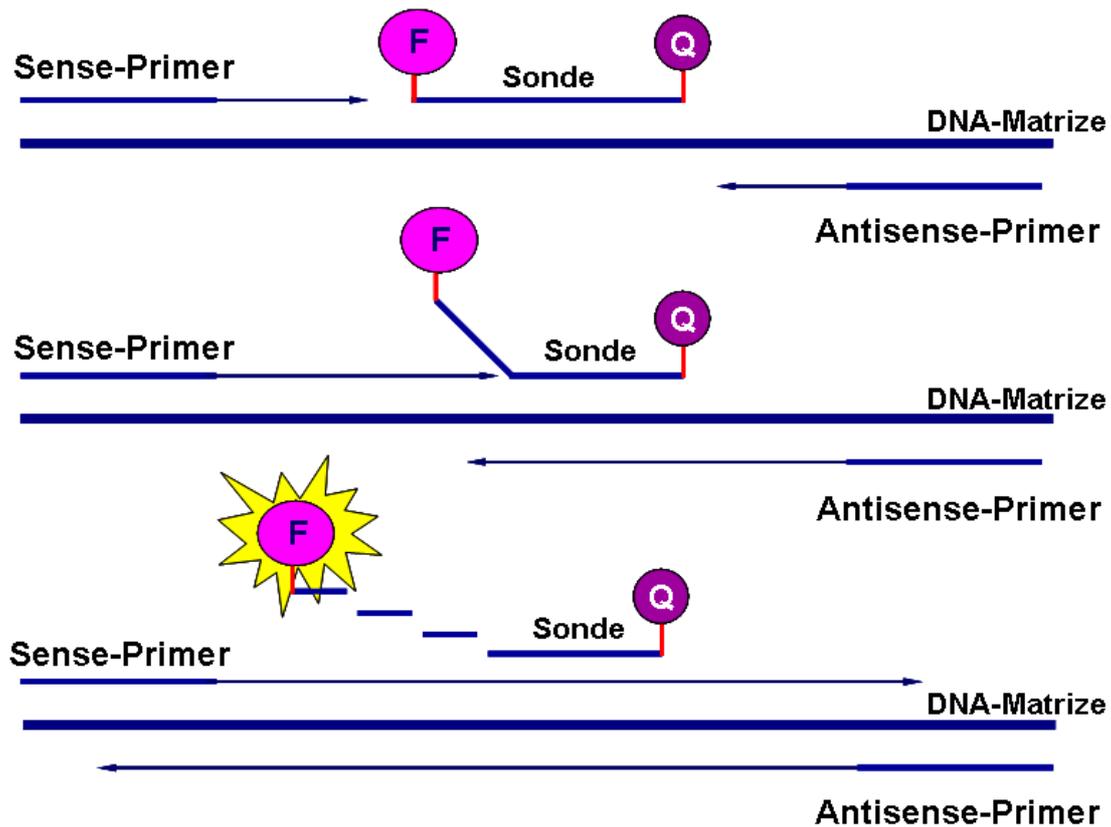


Abb. 10: TaqMan-Prinzip: Erst getrennt vom Quencher-Molekül (Q) wird die Reporter-Fluoreszenz (F) messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an (Eurogentec, Seraing, Belgien).

3.6.2 Durchführung

Bei der Durchführung der Real Time PCR wurde der TaqMan[®] qPCR MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgien) eingesetzt.

Für jede Probe wurden 50 ng der Gesamt-RNA der DNase-Behandlung unterzogen; diese und die RT erfolgten nach den in Kap. 3.3.2 und 3.3.3 beschriebenen Protokollen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Real Time PCR ist in Tabelle 9 dargestellt. Zu 20 µl Reaktionsansatz wurde 5 µl cDNA-Lösung aus dem RT-Ansatz zugegeben. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Tabelle 9: Real Time RT-PCR- Reaktionsansatz

Komponenten	Einfacher Ansatz (in μl)	Stammlösung
qPCR Master Mix	12,5	2 x
Sense-Primer	1,5	5 μM
Antisense-Primer	1,5	5 μM
TaqMan-Sonde	1	5 μM
DEPC-Wasser	3,5	
Gesamtvolumen	20	

In Tabelle 10 sind die Basensequenzen der verwendeten Primer und TaqMan-Sonden dargestellt. Sie wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA) ausgewählt. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Die TaqMan-Sonden wurden von dem Hersteller des TaqMan[®] qPCR MasterMixes (Eurogentec, Seraing, Belgien) synthetisiert.

Die Real Time PCR Reaktionen wurden in dem automatischen Fluorometer ABI PRISM[™] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung von 96-well optical plates (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Amplifikation wurde bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	40 Wiederholungen
Denaturierung	95 °C	15 sek	
Annealing = T _A und Verlängerung	60 °C	1 min	

Tabelle 10: Die in der Real Time PCR verwendeten Primer und TaqMan-Sonden Sequenzen

Primer	Accession-Nr. (Genbank)	Basensequenzen	Länge des Amplifikates
GAPDH-for GAPDH-rev	AB028142	5'- GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A -3' 5'- GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG -3'	75 bp
GAPDH-TaqMan Sonde	AB028142	5'- TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC CTT -3'	
Cox1-for Cox1-rev	AF535139	5'- ACC CGT GTT GTT ACT ACC CAT GT -3' 5'- AGT CAC ACT GGT AGC GGT CAA G -3'	75 bp
Cox1-TaqMan Sonde	AF535139	5'- CGA AGC GGA CAC AGA TCC CTT GGT -3'	
Cox2-for Cox2-rev	AY044905	5'- GGA GCA TAA CAG AGT GTG TGA TGT G -3' 5'- AAG TAT TAG CCT GCT CGT CTG GAA T -3'	88 bp
Cox2-TaqMan Sonde	AY044905	5'- CGC TCA TCA TCC CAT TCT GGG TGC T -3'	
PGFR-for PGFR-rev	s. Kap. 3.8.3	5'- ACC AGT CGA ACA T CC TTT GCA -3' 5'- GGC CAT CAC ACT GCC TAG AAA -3'	86 bp
PGFR-TaqMan Sonde	s. Kap. 3.8.3	5'- CAT GGT GTT CTC CGG TCT GTG CCC -3'	
PGES-for PGES-rev	s. Kap. 3.8.2	5'- CTG TCA TCA CCG GCC AAG T -3' 5'- CCT GT CAC TCC GGC AAT A -3'	99 bp
PGES-TaqMan Sonde	s. Kap. 3.8.2	5'- ACG CCC TGA GAC ACG GAG GCC T -3'	
3 β HSD-for 3 β HSD-rev	AY739720	5'- GGG TAC TCA GCT CCT GTT GGA A -3' 5'- GCC ACC TCT ATG GTG CTG GTA T -3'	78 bp
3 β HSD-TaqMan Sonde	AY739720	5'-TGC CCA GGC TAG TGT GCC GAT CTT -3'	

3.6.3 Auswertung

Die mittels Real Time PCR ermittelte Quantifizierung der Expression eines Gens lässt sich in eine absolute und eine relative Quantifizierung unterscheiden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge, also die Kopienzahl eines Gens, ermittelt. Hierbei wird zur Erstellung einer Regressionsgeraden ein genauer Standard benötigt (z.B. eine definierte Menge von Plasmid-DNA des entsprechenden Gens). Bei der relativen Quantifizierung wird der Anstieg bzw. Abfall des Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen ermittelt. Das House-keeping Gene, das zur Normierung der Daten verwendet wird, sollte daher nicht reguliert sein, d. h. es sollte ein konstantes Expressionsniveau in verschiedenen Geweben, Stadien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen besitzen. Voraussetzung zur Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass die Ziel- und Referenzgen-PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit kam die relative Quantifizierung unter Verwendung des House-keeping Genes GAPDH als Referenzgen nach den Angaben des Herstellers von ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) zum Einsatz.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Dabei gilt, dass zu Beginn der PCR-Reaktion nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen wird, da die Fluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Der C_T -Wert definiert also jenen Zeitpunkt, ab dem die Amplifikation und damit die Bildung von Doppelstrang-cDNA exponentiell ist und in dieser Phase die PCR-Reaktion von keinen limitierenden Faktoren, wie Primer-, Nukleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität eingeschränkt wird.

Der C_T -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich in die Reaktion eingebrachten cDNA-Kopienzahl des entsprechenden Gens. Je mehr cDNA-Template initial vorhanden ist, umso geringer ist die erforderliche Anzahl an Zyklen, bis das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrund detektierbar ist.

Die Bestimmung der relativen Expression setzt sich aus drei Formeln zusammen:

Mit der Formel (1) berechnet man den Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen. Hierbei wird auf das House-keeping Gene GAPDH normalisiert.

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ GAPDH}} \quad (1)$$

Bevor die relative Expression bestimmt werden kann, muss zunächst $\Delta\Delta C_T$ bestimmt werden. Hiefür wird ein Kalibrator ausgewählt. Als Kalibrator wird die Probe bezeichnet, bei der die Expression am niedrigsten war (also die Probe mit dem höchsten ΔC_T Wert). Der ΔC_T -Wert des Kalibrators wird von den ΔC_T -Werten aller Proben abgezogen (Formel 2).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}} \quad (2)$$

Mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$, wie in Formel (3) dargestellt, kann die relative Gen-Expression (RGE) bestimmt werden.

$$RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_T)} \quad (3)$$

Die RGE gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an.

3.6.4 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistical Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

Zur statistischen Berechnung der Cox1-, PGFR- und PGES-mRNA-Expression wurde ein globaler Vergleich aller Zeitpunkte (alle Beobachtungstermine) mit Hilfe einer 1-faktoriellen Varianz-Analyse (parametrische ANOVA) durchgeführt. An die Varianzanalyse schloss sich ein paarweiser Mittelvergleich mit Hilfe des Tukey-Kramer's Tests an.

Da für die Cox2- und 3 β HSD-Expression die Messwerte eine statistisch signifikante Abweichung von der Normalverteilung aufwiesen, wurde der globale Vergleich aller Zeitpunkte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests (nicht-parametrische ANOVA) durchgeführt. Der paarweise statistische Vergleich aller Beobachtungstermine wurde anschließend mit Hilfe des Dunn's- Tests durchgeführt.

Bei rechtsschiefer Verteilung der Messwerte für die Cox1, Cox2 und 3 β HSD wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten (X_g) und Streufaktoren (SF), dargestellt in der Form $X_g \times SF^{\pm 1}$, vorgenommen.

3.7 Molekulares Klonieren der caninen 3 β HSD Sequenz

Die canine 3 β HSD-Sequenz wurde bislang nicht charakterisiert. Um die Expression des Gens auf mRNA-Ebene im Verlauf des Diöstrus zu verfolgen, war es Ziel der Arbeit, die canine 3 β HSD-cDNA zu isolieren, zu klonieren und zu charakterisieren. Dies geschah mittels RT-PCR und der so genannten 5' - 3' - RACE PCR.

3.7.1 RACE PCR - Prinzip

RACE steht für **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds und stellt eine molekularbiologische Methode dar, mit der es auf Grund eines bekannten kurzen Fragments einer Gensequenz möglich ist, die fehlenden 3' - und 5' - cDNA- Fragmente der Sequenz zu ermitteln.

Dazu ist es notwendig, in getrennten Schritten eine 5'-cDNA, bzw. 3' -cDNA Synthese durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit, wurde die 3' - 5'-RACE PCR mit dem SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech) in der Anlehnung an die Herstellerangaben durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, während der Reversen Transkription (RT) die gesamte cDNA-Sequenz eines Gens zu generieren. Dies geschieht mittels der PowerScript Reverse Transcriptase™, die in der Reaktion zusammen mit dem so genanntem SMART II A™ - Oligonukleotid eingesetzt wird (Abb. 11). Die PowerScript Reverse

Transcriptase™ von BD Biosciences Clontech stellt eine Variante der Maloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLVRT) dar, die sowohl eine RT- Aktivität als auch eine Aktivität der terminalen Transferase aufweist.

Als Startpunkt der 5'-cDNA-Synthese wird ein Oligo-dT-Primer verwendet (Abb. 11a). Nach dem Erreichen des 5'-Endes der mRNA, entfaltet die PowerScript Reverse Transcriptase™ die Aktivität einer terminalen Transferase und fügt einzelne Nukleotide (vor allem dC) zu dem 3'-Ende der neusynthetisierten cDNA (Abb. 11b) hinzu. So entsteht ein oligo-dC-Tail auf der cDNA, an dem als nächstes eine komplementäre dGGG-Sequenz des SMART II A™ Oligonukleotids (Ankerprimer) anlagert (Abb. 11c; Tabelle 11). Danach schaltet die Reverse Transkriptase von ihrer ersten Matrize (mRNA) zum Ankerprimer um („switching mechanism“). Die cDNA-Synthese wird weiterhin fortgesetzt, bis die Reaktionskette das Ende des Ankerprimers erreicht hat.

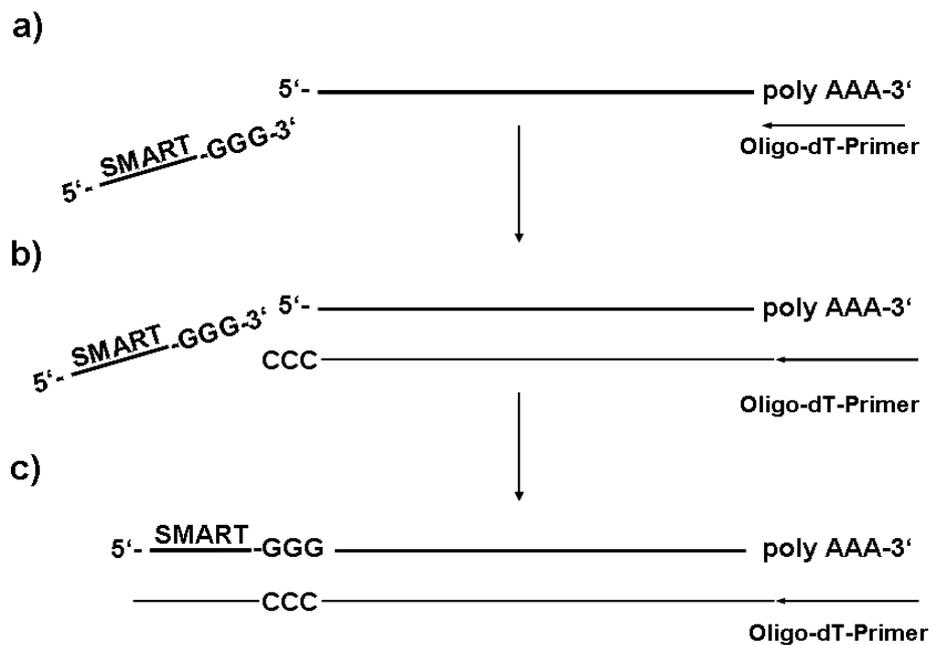


Abb. 11: Schema der 5'-cDNA- Synthese (Abkürzungen s. Text).

Für die 3' cDNA-Synthese wird ebenfalls ein spezieller Ankerprimer (Oligo-dT-Primer-SMART) verwendet, der als 3'-cDNA Primer A bezeichnet wird; d.h. außer einer Oligo-dT-Sequenz, die an den poly-dA-Tail der mRNA- Sequenz bindet, beinhaltet der Primer die SMART-Sequenz (Oligo-dT-Primer-SMART; Abb. 12;

Tabelle 11). Somit wird die SMART-Sequenz an beiden Enden der cDNA eingebaut und die eigentliche RACE PCR kann in beiden Richtungen (3'- und 5') mit einem Universalen Primer Mix (UPM) stattfinden.

Ein wichtiger Bestandteil des verwendeten Clontech-Kits ist der BD Advantage 2 Polymerase Mix. Er besteht aus einem Gemisch von zwei DNA-Polymerasen, einer Taq-Polymerase und einer Proofreading-Polymerase.

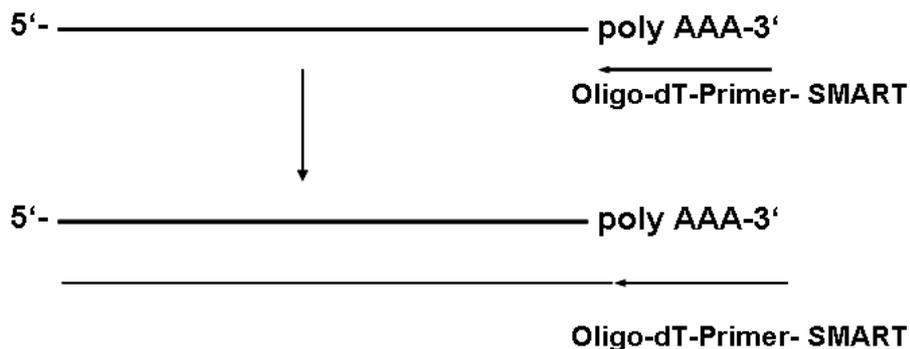


Abb. 12: Schema der 3'-cDNA- Synthese (Abkürzungen s. Text).

3.7.2 Klonierung der 3 β HSD

Die initiale RT-PCR wurde wie beschrieben (s. Kap. 3.3) mit 0,2 μ g Gesamt-RNA durchgeführt. Die Primer wurden anhand eines Vergleichs (Alignment) der bekannten 3 β HSD-Sequenzen aufgrund ihrer hohen Homologie ausgewählt (Primer 1-2; $T_A = 54$ °C). Das sich aus dieser RT-PCR ergebende Amplikon (erste hundespezifische 3 β HSD-Sequenzfragment) wurde sequenziert und diente zur Ableitung der Primer für die folgende RACE PCR.

Alle zur Klonierung der 3 β HSD verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Auflistung der bei der RT-PCR und RACE PCR verwendeten Primer und ihre Bindungsstellen an der caninen 3 β HSD-Sequenz.

PCR-Methode	Primer	Primer Nr.	Primer-Sequenz	Bindungsstelle
Initial RT-PCR	forward	1	5'-CAA GGA CAG TTC TAC TAC AT-3'	874-893
	reverse	2	5'-ATT GGA CTG AGC AGG AAG-3'	1049-1032
3' RACE PCR	GSP1	3	5'-CAT CAA AGC TAT GAT GAC CTC AAT-3'	910-933
5' RACE PCR	GSP2	4	5'- AGG CAA GCC AGT ATT CCA GAG AT-3'	1012-990
RT-PCR of full size ORF	forward	5	5'-TTG GGA CCC AGA TTT GAC C-3'	108-126
	reverse	6	5'-TTG CCA TCC TCA GAT CAG TG- 3'	1262-1243
Universal Primer Mix	UPM	7	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCAA CGC AGA GT-3'	
		8	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	
SMART II A Oligonukleotid™			5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'	
3'-cDNA Primer A ¹⁾			5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA C-3'	

¹⁾ Oligo – dT – Primer - SMART

Für die folgende 3'- 5'- RACE PCR wurden zunächst 0,6 µg Gesamt-RNA in 3 µl (s. Kap. 3.3.1) mit der PowerScript Reverse Transkriptase (BD Biosciences Clontech), versetzt und wie in Kap. 3.7.1 beschrieben getrennt die 3'- und 5'-cDNA synthetisiert. (Zusammensetzung des cDNA-Mixes s. Tabelle 12). Die Reaktion verlief über 90 min bei 42 °C und anschließend zur Inaktivierung über 7 min bei 72 °C.

Tabelle 12: Zusammensetzung des cDNA-Mixes

Komponenten	3'-cDNA-Synthese Einfacher Ansatz in µl	5'-cDNA-Synthese Einfacher Ansatz in µl
Oligo-dT-Primer (12 µM)	-	1
SMART II A Oligonukleotid™ (12 µM)	-	1
3'-CDS Primer A (12 µM)	1	-
DEPC-Wasser	1	-
5x First-Strand Buffer	2	2
DTT ¹⁾ (2 mM)	1	1
50x dNTP Mix	1	1
PowerScript Reverse Transcript.	1	1

¹⁾ Dithiothreitol

Auch die folgende 3'- 5'-RACE PCR mit dem SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech) erfolgte in Anlehnung an die Herstellerangaben.

Die genspezifischen Primer (gene-specific primers; GSP; Primer 3-4) wurden zusammen mit dem Universal-Primer-Mix (UPM; Primer 7-8) aus dem Clontech-Kit in zwei getrennten Reaktionen (für 3'- RACE mit GSP1 und für 5'- RACE mit GSP2) verwendet (Zusammensetzung des RACE PCR-Mixes s. Tabelle 13).

Die Reaktionen wurden im T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra) unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 14). Die RACE PCR ergab zwei überlappende Produkte von Länge 710 bp (3'- RACE) und 1012 bp (5'- RACE), die für die gesuchte vollständige cDNA-Sequenz der 3 β HSD kodieren (Abb. 13a). Abb. 13b zeigt die Produkte der RACE PCR nach der Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel (s. Kap. 3.3.4).

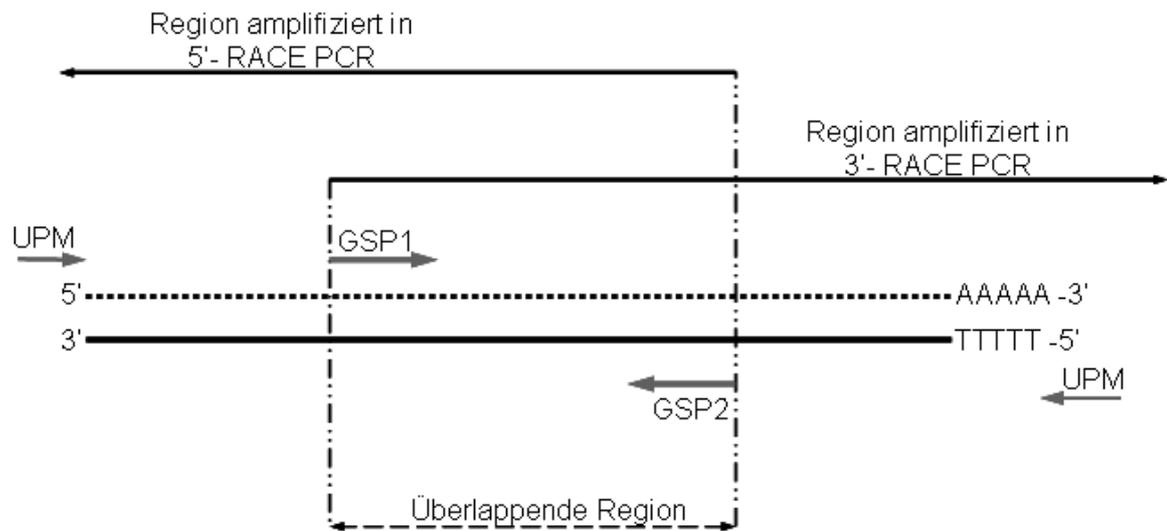
Tabelle 13: Zusammensetzung des RACE PCR-Mixes

Komponenten	3' RACE PCR Einfacher Ansatz in μl	5' RACE PCR Einfacher Ansatz in μl
DEPC-Wasser	34,5	34,5
10x Advantage 2 PCR Buffer	5	5
50x dNTP Mix	1	1
50 x Advantage 2 Polymerase Mix	1	1
3'-RACE cDNA	2,5	-
5'-RACE cDNA	-	2,5
GSP 1 (10 pmol/ μ l)	1	-
GSP 2 (10 pmol/ μ l)	-	1

Tabelle 14: Temperatur- und Zeitprofil der RACE PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94 °C	1 min	
Beginn der Zyklen			
Denaturierung	94 °C	1 min	35 Wiederholungen
Annealing = T _A	65 °C	2 min	
Verlängerung	72 °C	3 min	
Ende der Zyklen			
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Bis zur Entnahme	4 °C		

a)



b)

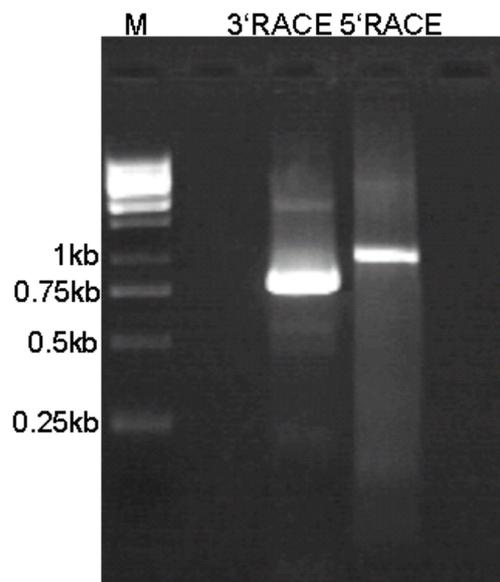


Abb. 13: Amplifikation der caninen 3β HSD mittels 3' - 5'- RACE PCR. Der Zusammenhang zwischen den genspezifischen Primern (GSP1, GSP2) und der cDNA-Sequenz ist dargestellt (a); Die RACE PCR- Produkte wurden auf einem 1,5%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten, Agarosegel visualisiert (b).

Schließlich wurde eine RT-PCR zur Amplifikation des gesamten ORF der 3β HSD mit den Primern 5-6 durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren wie in Kap. 3.3.4. Die Primer-Anlagerungs-Temperatur betrug 57°C .

Abb. 14 zeigt die ermittelte Sequenz sowie die Bindungsstellen der verwendeten Primer und den unterstellten Open Reading Frame (ORF).

```

1   gaaggagaccagaacctcagctctttcagctagctcttgacaatctaacagggtcacctgtaataaattgctctccagttttctggttcctggagagacttcttg 110
111  ggaccagatttgaccatggctggatggagctgccttgtgacaggtgcaggagggtttctgggtcagcggatgttcacttgttggcagaggagaaggagctgcaggaga 220
      M A G W S C L V T G A G C F L G Q R I V H L L A E E K E L Q E
221  tccgggcactggacaagaagctttcagaccagaactgctggaggaattttctaaagctccagagcaagaccaagctgaccatggtggaaggagacattctggatgagcagctgc 330
      I R A L D K A F R P E L L E E F S K L Q S K T K L T M V E C D I L D E Q C
331  ctgaagagagcctgccaggccacctcagttgtcattcacaccgctctgtcattgacgtcatgaatgtcattcaccgagagaccatcatgaatgtcaatctgaaggggtac 440
      L K R A C Q G T S V V I H T A S V I D V M N V I H R E T I M N V N L K G T
441  tcagctcctggtggaagcctgtgccaggtcagtggtccgatcttcatctataaccagcaccatagaggtggctgggccaactcctacaggagacatcatccagaatgcc 550
      Q L L L E A C A Q A S V P I F I Y T S T I E V A C P N S Y R D I I Q N A
551  acgaagaagagcatcttgaatcaacatggtctgctccctaccatcacagcaaaaagcttcagagaaggctgtgctagctgctaatgggtgggctcttaaaaaatggtggc 660
      H E E E H L E S T W S A P Y P Y S K K L A E K A V L A A N G W A L K N G C
661  accttgcactactgtgctttaagggccatgtatatctatggggaaggaagcatatctcttataactatatacaaaagctctgaggaacaatggatcctgacacatca 770
      T L H T C A L R P M Y I Y G E G S I F L Y N Y I Y K A L R N N G I L T H H
771  cagcaagttctccatagtcaacccctctatgttggcaatgtggcctgggctcacattctggcctgagggccctacaggaccccaaggaagggcccaaggtgtccaaggac 880
      S K F S I V N P V Y V G N V A W A H I L A L R A L Q D P K K A P S V Q G
881  agttctattatcttccagatgacactcctcatcaagctatgatgacctcaattacaatttgagcaaggaatggggtctctcccttgattccagaatgagccttcccata 990
      Q F Y Y I S D D T P H Q S Y D D L N Y N L S K E W G F S L D S R M S L P I
991  tctctggaatactggcttgccttctctgctggaatagtgagcttctctgctcagtcagattataaatatacaacccccctcaaccgccacatggtgactttgtcaaatag 1100
      S L E Y W L A F L L E I V S F L L S P I Y K Y Q P P F N R H M V T L S N S
1101 catatttaccctctcttataaagaagctcagcgagatctggggtataagccactcttcagctgggaggaagccaagcagaagaccacggagtgattggttcgctggtga 1210
      I F T F S Y K K A Q R D L G Y K P L F S W E E A K Q K T T E W I G S L V
1211 aacagcacaaggagaccctaaaaacaagactcactgatctgaggatggcaaggatgtagacctagatggtgttgggagaagtctatcaagctcatccctctggtttca 1320
      K Q H K E T L K T K T H *
1321 tacagaagaacaagggcacaagcccaggtcctactgtgttctctttccaagatggccaccttctatcttctctactaccaggaacattctcagccctggccca 1430
1431 ctggaagttttctgctctccccacactccatagqacatacaaggaqatttqctgtagctgctggtacgaaaagctgcaqctgctggtcctgagctattcgggctctttct 1540
1541 totagaagttttctctatgactccatttctctctctctcactgcaaacctatttctatcttttacaattcttattcccgcatacagctcaaggaagaaactaataaatctt 1650
1651 ttaatgctgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1690

```

Abb. 14: Nukleotid- und Aminosäuren-Sequenz der caninen β HSD. Die Bindungsstellen der verwendeten Primer wurden mit Pfeilen dargestellt. Der unterstellte Leserahmen (open reading frame; ORF) wurde unterhalb der Sequenz gezeigt. Genbank Eintragsnummer: AY739720.

Die oben beschriebenen PCR-Produkte wurden aus dem Gel extrahiert, in den pGEM[®]-T Vektor kloniert und anschließend sequenziert (s. Kap. 3.4; 3.5).

Die klonierte hundespezifische β HSD-Sequenz wurde in die Genbank eingetragen. Eintragsnummer: AY739720: *Canis familiaris* 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA, complete cDNA.

Der unterstellte Leserahmen (ORF) wurde mit Hilfe ChromasPro Version 1.2 oligo software (Technelysium Pty. Ltd, Tewantin, Australien) abgeleitet. Der Sequenzhomologie-Vergleich mit bekannten 3 β HSD-Sequenzen wurde mit dem gleichen Program durchgeführt.

3.8 Klonieren der caninen PGFS, PGES und PGFR Sequenzen

Die hundespezifischen Sequenzen der PGFS, PGES und PGFR waren bisher nicht bekannt. Um die Expression der Gene im Verlauf des Diöstrus zu untersuchen, mussten die Sequenzen zunächst ermittelt werden.

Hierfür erfolgte ein Vergleich (Alignment) der bekannten Sequenzen mit der hundespezifischen genomischen Sequenz. Der Vergleich wurde *online* mittels BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die klonierten Sequenzen wurden mit den homologen Sequenzen von anderen Säugetieren mittels der ChromasPro Version 1.2 oligo Software (Technelysium Pty. Ltd) verglichen.

3.8.1 RACE PCR und Klonierung der Prostaglandin F₂ α Synthase (PGFS)

Nach einem Vergleich mit einer bekannten PGFS-Sequenz vom Pferd (Genbank Eintragsnummer AY304536), konnten aus dem caninen Chromosom 2 zwei Sequenz-Fragmente mit einer Homologie von ca. 90% abgeleitet werden (Fragment 1, Fragment 2; s. Abb. 15). Damit ergab sich die Möglichkeit, Primer für die RT-PCR auszuwählen (Primer 1-2; s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Auflistung der bei der RT-PCR und RACE PCR verwendeten Primer mit ihren Bindungsstellen an der caninen PGFS-Sequenz

PCR-Methode	Primer	Primer Nr.	Primer-Sequenz	Bindungsstelle	Produktlänge	T _A (°C)
Initial RT-PCR	forward	1	5'- GTG TGT CCA ACT TTA ACC G -3'	638-656	77 bp	55.5
	reverse	2	5'- GTT GCA GAC AGG CTT GTA C -3'	714-698		
RT-PCR	forward	3	5'- GAT CTC TGT GCC ACA TGG GAG -3'	574-595	453 bp	60
	reverse	4	5'- TGT CCT CTG GTG TCA ACT GGA -3'	1024-1004		
3' RACE PCR 5' RACE PCR	GSP1 GSP2	3 5	5'- GAT CTC TGT GCC ACA TGG GAG -3' 5'- TGG GTC CTT CAG GAG AAC TGG -3'	574-595 864-844	291 bp	65
RT-PCR	forward reverse	3 6	5'- GAT CTC TGT GCC ACA TGG GAG -3' 5'- CCA GGA GTT TGC TCT GGT TGA -3'	574-595 757-737	184 bp	60

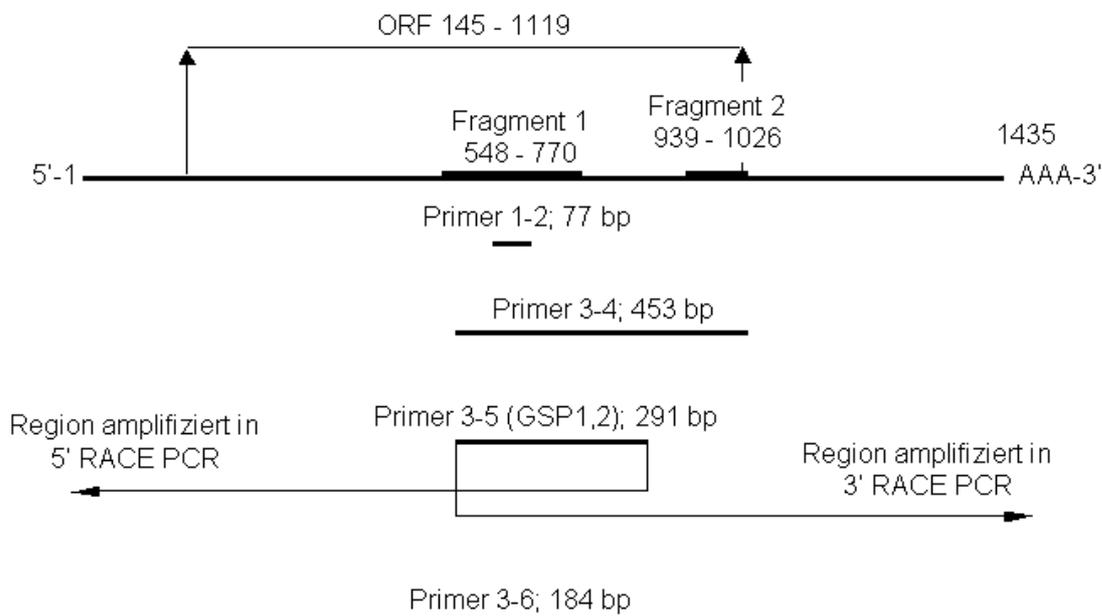


Abb. 15: Klonierungsstrategie der caninen PGFS.

Da nach Verwendung von aus CL gewonnenen mRNA kein spezifisches PCR-Produkt erhalten wurde und die Frage nach der Spezifität der ausgewählten Primern bestand, wurde nach einer geeigneten positiven Kontrolle gesucht. Eine solche Kontrolle wurde in mRNA gewonnen aus dem Uterus/Plazenta-Komplex präpartaler Hündinnen gesehen, da bei der Hündin die Einleitung der Wehentätigkeit an den präpartalen Anstieg von Prostaglandin F_{2α} gekoppelt ist (Nohr, 1993a). Als Uterus/Plazenta-Komplex ist hier der zusammenhängende fetale und maternale Teil bezeichnet. Die RT-PCR führte zu einer PCR- Bande von Länge 77 bp. Die durchgeführte Sequenzierung bestätigte die Spezifität des PCR- Produktes. Damit erwies sich der Uterus/Plazenta-Komplex als geeignetes Kontrollgewebe.

Um ein längeres PCR-Produkt zur Auswahl der Primer für die RACE PCR zu erhalten, das die Lücke zwischen den beiden Fragmenten 1 und 2 überbrückt, wurde eine weitere RT-PCR mit den Primern 3 und 4 durchgeführt und ein 453 bp- langes Produkt amplifiziert (Tabelle 15; Abb. 15).

Im nächsten Schritt wurde eine 3'- 5'- RACE PCR mit den Primern 3 (als GSP1) und 5 (als GSP2) (s. Kap. 3.7.1;) durchgeführt. Die daraus entstandenen überlappenden PCR-Produkte mit einer Länge von ca. 900 bp (für 3'-RACE) und ca. 850 bp (für 5'- RACE) kodieren die gesamte cDNA der caninen PGFS. Ein kürzeres Produkt unterhalb der ersten Bande wurde in der 3'-RACE PCR beobachtet (Abb. 16).

Weitere Überprüfungen der erhaltenen Sequenz mit den Primern 3 und 6 folgten (Abb. 15).

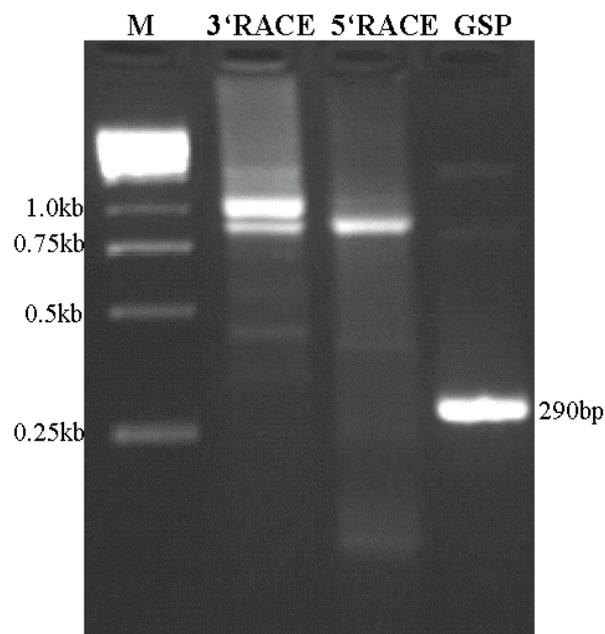


Abb. 16: Amplifikation der caninen PGFS im Uterus/Plazenta-Komplex mittels 3' - 5'- RACE PCR. Die RACE PCR - Produkte wurden auf einem 1,5%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten, Agarosegel visualisiert; GSP = Amplifizierung mit den GSP1 und - 2 Primern.

Alle PCR-Produkte wurden anschließend nach dem im Kap. 3.5 beschriebenen Protokoll, in den pGEM-T Vektor kloniert und Sequenziert. Danach ergab sich für das kürzere Produkt unterhalb der ersten Bande in der 3'- RACE PCR eine 100%ige Homologie mit der entsprechenden Sequenz der PGFS; das Produkt wurde daher als ein Artefakt eingestuft.

Die klonierte hundespezifische PGFS-Sequenz (Abb. 17) wurde in die Genbank mit der Eintragsnummer: AY875970: *Canis familiaris* prostaglandin F synthase (PGFS) mRNA, complete cds, eingetragen.

```

1  GTGGCTCTCCGGAGTGACCCGAGGGGCACGTTGCATCCTCGGCAACTCATCTGATTTCCGGTCTAACAAAGATCTTCTCACCACAAAGATTGTGCCTTAGAGTTTCTTAT 110
111  GTATTATAATTAGAAGCCAGAAGACTGCAAAAGAGATGAATCTAATGAAACTTAGATCTGTAAAGCTGAACGATGGACTCAGCATGCCTCCACTGGGATTGGCACCTCTG 220
      M N L M K L R S V K L N D G L S M P P L G F G T S
221  CTCCTAGCAAGCTTCTTAAGACTGAAGTGAAGAGGCCCTCAAGAGAGCAATCGATGTAGGCTACCCGCAATTTGACTCAGCCTATATGTATCTCAATGAAGAAGAGATT 330
      A P S K V P K T E V E E A V K R A I D V G Y R H F D S A Y M Y L N E E E I
331  GGGAGGGCCATCCAGAGGAAGATTGCTGATGGCACTGTGAAGAGAGAGGACATATCTACACTTCGAAGGTGTGGTAACCTTCCTCCGTCACGAATTTGGTTCAAACCAA 440
      G R A I Q R K I A D G T V K R E D I F Y T S K V W V T F L R P E L V Q T N
441  TCTAGAAATGTCACTGAAGAAGCTTGGGTTTAGCTATGTGGATCTTTATCTCATTCAATTTCCCACTACCTTTGAAGCCTGGGGAGGAATTGTTCCCAAAGGACAAAGATG 550
      L E M S L K K L G F S Y V D L Y L I H F P V P L K P G E E L F P K D K D
551  GAAAAATCATTTTTCAGAGTGGATCTCTGTGCCACATGGAGGCcCATCGAgAaGTcTcAAAAGATTcAGGGCTTCCCAAGTCTATTGGTGTGcCCAACTTTAAcCGCAGG 660
      G K I I F D R V D L C A T W E A H E K C K D S G L A K S I G V S N F N R R
661  CAGCTGGAGAGGATCCTGAGCAAGCCAAAGCCTTAAGTACAAGCCTGTCTGCAACCAGGTGGAGTGTCTCACCTTTACTTCAACCAGAGCAAACTCCTGGAGTTCTGCAACT 770
      Q L E R I L S K P R L K Y K P V C N Q V E C H L Y F N Q S K L L E F C K S
771  CAAGGACATCATCTGACTGCATACCGTGCCTTGGGGTCCGACTTCGGGAAGGAATGGGTGAACCAGGACGCCCCcAGTTCTCCTGAAGGACCCcAGTTCTCAATGCTGTGG 880
      K D I I L T A Y G A L G S D F G K E W V N Q D A P V L L K D P V L N A V
881  CCGCCAGGCACGGCCGAACCTCCGGCCAGGTGGCCCTGCGCTTCCAGTGCAGCGGGGGTGGTGGCCCTTGGCCAAGAGCTTCAACGAGAAGAGAATCCGGGGAACACTTC 990
      A A R H G C R T P A Q V A L R F Q L Q R G V V A L A K S F N E K R I R E N F
991  CAGGTGTTTgATTCCAGTTGACACCAGgAGGACATGGAGACTCTGAgCAGCCTCAACAAAAACATTCGCTACTTTTTCAGATACTTTATTTGCTACTCATCCGGATTATCC 1100
      Q V F D F Q L T P E D H E T L S S L N K N I R Y F S D T L F A T H P D Y P
1101  ATTTAATCAGCAGGATTAATTGATTTCTTTGACTCTGGTTGATGATCAcCGAACAGCTCAAGGATGAGAAAGGATCTGACTTAGCCCATGTTACTTAGCCTGACACGTTG 1210
      F N D E D *
1211  AAATGTAGCCTGACTCCCCCGAATcTGGAACTAAATGTcTcTAAACCCAGTcTTTCCCCCTCAAAGTCAATGACAATACATTTCAAACAACTAACCTATCAATGCCTTG 1320
1321  GCTTTTTAGTCTGTTTTGCTTTTTCTCTGTCAGGTTGAAATGCTGTCCCTGTGAAGTATCACAGGGATATAAATCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1430
1431  AAAAA 1435

```

Abb. 17: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz der caninen PGFS. Die Bindungsstellen der verwendeten Primer wurden mit Pfeilen dargestellt. Der unterstellte Leserahmen (open reading frame; ORF) wurde unterhalb der Sequenz dargestellt. Genbank Eintragsnummer: AY875970

3.8.2 Klonierung der Prostaglandin E Synthase (PGES)

In einem Vergleich der bovinen PGES-Sequenz (Genbank Accession Nummer: AY032727.1) mit der hundespezifischen genomischen Sequenz, wurden auf dem Chromosom 9 zwei Sequenz-Fragmente identifiziert (Abb. 18). Diese Fragmente umspannen eine Sequenz von 462 Nukleotiden die dem ganzen ORF der bekannten PGES-Homologen mit 86 % - 92 % entsprachen. Dies waren beim Pferd die Sequenz mit der Genbank Nummer AY057096.1, beim Rind die Sequenz Nr. AY032727.1 und bei der Ratte die Sequenz Nr. BC088101. Die identifizierten Fragmente umspannen ein fehlendes Fragment der Sequenz von ca. 80 bp, das ermittelt werden sollte.

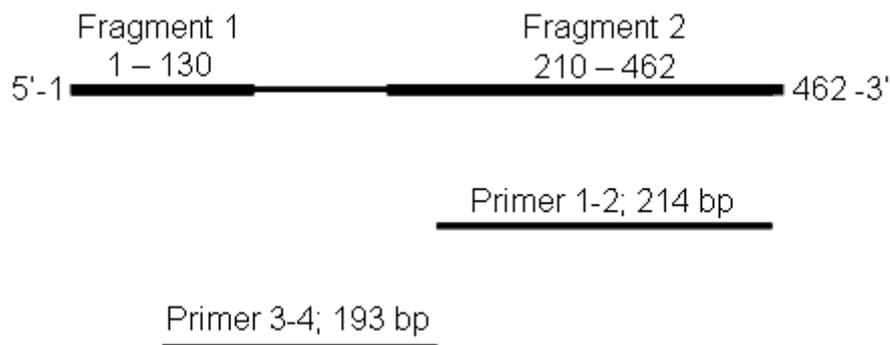


Abb. 18: Klonierungsstrategie der caninen PGES.

Die initiale PCR wurde mit den Primern 1 und 2 durchgeführt. So wurde die Expression von Fragment 2 und damit der PGES im CL bestätigt (Abb 19; Tabelle 16).

Mit den Primern 3 und 4 wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, das das fehlende Sequenz-Fragment umfasste. Alle PCR-Produkte wurden anschließend nach dem im Kap. 3.5 beschriebenen Protokoll, in den pGEM-T Vektor kloniert und Sequenziert. Danach konnte das fehlende Fragment der Sequenz benannt werden.

Tabelle 16: Die verwendeten PGES-spezifischen Primer mit ihren Bindungsstellen an der cDNA-Sequenz

PCR-Methode	Primer	Primer Nr.	Primer-Sequenz	Bindungsstelle	Produktlänge	T _A (°C)
RT-PCR	forward	1	5'- ACC ATC TAC CCC TTC CTG T -3''	235-253	214 bp	56
	reverse	2	5'- CTG CTT CCC AGA CGA TCT -3'	448-431		
RT-PCR	forward	3	5'- AGC ACA CTG CTG GTC ATC A -3'	61-79	193 bp	56.5
	reverse	4	5'- ACA GGA AGG GGT AGA TGG T -3'	253-235		

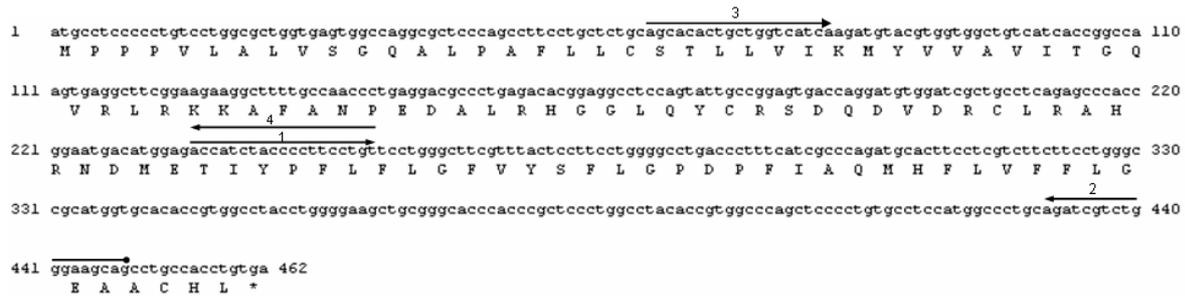


Abb. 19: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz der caninen PGES. Die Bindungsstellen der verwendeten Promer wurden mit Pfeilen dargestellt. Der unterstellte Leserahmen (ORF) wurde unterhalb der Sequenz dargestellt ².

3.8.3 Klonierung des Prostaglandin F2 α Rezeptors (PGFR)

Nach dem Alignment der bekannten felines Sequenz (Genbank Accession Nummer: AF272340) mit der hundespezifischen genomischen Sequenz zeigte sich ein Genabschnitt mit einer sehr hohen Homologie, die bis zu 94 % betrug. Daraus wurde der gesamte hundespezifische ORF des PGFR abgeleitet. Die Sequenz wurde auf dem Chromosom 6 lokalisiert.

Anschließend wurden Primer 1-2 für die RT-PCR ausgewählt. Des weiteren, wurden Primer 3-4 ausgewählt, die in der RT-PCR zur Amplifikation des gesamten ORF (Leserahmen) des PGFR eingesetzt wurden. Alle PCR-Produkte wurden nach dem im Kap. 3.5 beschriebenen Protokoll, in den pGEM-T Vektor kloniert und sequenziert.

Die Sequenz wurde in der Genbank mit der Eintagsnummer: DQ138060: Canis familiaris prostaglandin F2-alpha receptor (PGFR), mRNA eingetragen (Tabelle 17; Abb. 20).

Tabelle 17: Die verwendeten PGFR-spezifischen Primer mit ihren Bindungsstellen in Relation zur cDNA-Sequenz

PCR-Methode	Primer	Primer Nr.	Primer-Sequenz	Bindungsstelle	Produktlänge	T _A (°C)
RT-PCR	forward	1	5'- ACC ATC TAC CCC TTC CTG T -3'	359-378	235 bp	55
	reverse	2	5'- CTG CTT CCC AGA CGA TCT -3'	593-574		
RT-PCR	forward	3	5'-ATG TCT ATG AAC AGT TCC AAA C -3'	1-22	1101 bp	62
	reverse	4	5'-TTA CTG TCC TAT TAA ACC AGG TG -3'	1101-1079		

² Zwischenzeitlich wurde die gesamte hundespezifische cDNA-Sequenz der PGES mittels RACE PCR amplifiziert, kloniert und in die Genbank mit der Eintragsnummer: EF063141 eingetragen

```

1  atgtctatgaacagttccaaacagccagctgtctcctgcagctgggctcctttcaaatacaactggccagacggaaaaccggcttccggtatcttttccagtaactcttcat 110
   M S M M S S K Q P V S P A A G L L S N T T C Q T E N R L S V F F S V I F M
111 gacagtggaatcttgcacaacagccttgccattgctattctcatgaaggcttatcagagatttagacagaagtccaagggcatcgtttctgctttggccagtgccctgg 220
   T V G I L S N S L A I A I L M K A Y Q R F R Q K S K A S F L L L A S A L
221 taatcacagacttctttggccacctcatcaatggagctatagcagctctttgtgtacgcttccgataaagactggatccgctttgaccagtcgaacatcctttgcagtatc 330
   V I T D F F G H L I N C A I A V F V Y A S D K D W I R F D Q S N I L C S I
331 ttgggtatctgcagctgttctccggctctgtgccacttttctaggcagctgtgatggccattgagcgcctgtatcggagtcaccaaaccaatatttctctacgaaaat 440
   F G I C M V F S C L C P L F L G S V M A I E R C I G V T K P I F H S T K I
441 tacatccaaacatgtgaaaatgatggtgagtgagtgctgtttgcccattttcatagctttgctaccatccttgggcatcgaacctataaaaattcaagcatcgagga 550
   T S K H V K M H L S G V C L F A I F I A L L P I L G H R N Y K I Q A S R
551 cctgggtgtttctcaaaaacagaacacatcaagactgggaagataggttttaccttctgctcttttctttctggggctcttagcccttggcgtttcattcttggcaat 660
   T W C I K D W E D R F E A L L F S F L C L L A L G V S F L C N
661 gccatcacaggaatcacacttttaagagtcaaatttaaaagtcagcagcacagacaaggcaggtctcatcattttgaaatggtcatccagctcctggctataatgtgtgt 770
   A I T G I T L L R V K F K S Q Q H R Q G R S H H F E M V I Q L L A I M C V
771 ctctgcatttgcaggctccatttctggtgacaatggccaacattggaataaatggagatcattctctggagacctgtaaaaacaatcttttctctccgaatggcaa 880
   S C I C W S P F L V T M A N I G I N G D H S L E T C K T I L F A L R M A
881 cgtggaatcaaatcttagatccttgggtgtacattctgctgcggaaggcctccttaagaatctctacaaaactggcagacgctgctgtggagtgcatgtcatcagcttg 990
   T W N Q I L D P W V Y I L L R K A V L K N L Y K L A R R C C G V H V I S L
991 catgggtgggagcttagctccatataaaattctcaaaaggtgctgctattctgagctccagttacagagaaaataaatcagcaagcactggttaataaggacagta 1100
   H C W E L S S I K N S L K V A A I S E S P V T E K I N Q Q A P G L I G Q *
1101 a 1101

```

Abb. 20: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz des caninen PGFR-ORF. Die Bindungsstellen der verwendeten Primer wurden mit Pfeilen dargestellt.
Genbank Eintragsnummer: DQ138060

3.9 In situ Hybridisierung zur Lokalisation der 3 β HSD- und PGFR- Expression

Die in situ Hybridisierung erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) am Gewebeschnitt. Die Methode wurde zur Untersuchung der Lokalisation der 3 β HSD- und PGFR-Expression auf mRNA-Ebene verwendet.

Zur Sondenherstellung für die RNA/RNA in situ Hybridisierung wurden die Amplifikate der PCR als Matrize verwendet (s. Tabelle 18 für die Primersequenzen).

Die Vorbereitung der PCR-Produkte für die Transkription (Herstellung von cRNA mit DNA als Matrize) erfolgte nach den in Kap. 3.4 und 3.5 beschriebenen Protokollen.

Tabelle 18: Primersequenzen für die PCR-Amplifikate (als Matrize für RNA-Sonden)

Primer	Accession-Nr. (Genebank)	Basensequenz	Länge des Amplifikates
3 β HSD-for 3 β HSD-rev	AY739720	5'- CAA GGA CAG TTC TAC TAC AT -3' 5'- ATT GGA CTG AGC AGG AAG-3'	175 bp
PGFR-for PGFR-rev	DQ138060	5'- ACC ATC TAC CCC TTC CTG T -3' 5'- CTG CTT CCC AGA CGA TCT -3'	235 bp

3.9.1 Herstellung einer cRNA - Sonde

Plasmidlinearisierung

Dier PCR-Produkte wurden in den pGET-T Vektor (Plasmid) nach dem in Kap. 3.5 Protokoll kloniert. Nach Vermehrung und Gewinnung der Plasmide wurden diese Linearisiert. Hierzu wurde die Restriktionsendonuklease Nco I für die Transkription mit der Sp6-RNA-Polymerase, und das Not I Restriktionsenzym für die Transkription mit der T7-RNA-Polymerase verwendet. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte wie in Kap. 3.5 (Doppelverdau) beschrieben mit dem Unterschied, dass pro 5 μ l Plasmid ein getrennter Ansatz für Not I und Nco I hergestellt wurde (Tabelle 19).

Tabelle 19: Zusammensetzung des Ansatzes für die Plasmidlinearisierung mit den Restriktionsendonukleasen Not I / NcoI

Komponenten	Not I Ansatz (in μ l)	Nco I Ansatz (in μ l)
DEPC-Wasser	10	12
NEBuffer 3 (für Not I Restriktase)	2	---
NEBuffer 4 (für Nco I Restriktase)	---	2
Not I (10 U/ μ l)	1	---
Nco I (10 U/ μ l)	---	1
BSA	2	---

In vitro Transkription

Für die Herstellung einer Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde (Transkription) wurde der DIG-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Hierfür wurde folgende Reaktion angesetzt (Tabelle 20). Die Transkriptionsansätze wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zum Abbrechen der enzymatischen Reaktionen und Fällung

der RNA wurden den Ansätzen jeweils 0,5 µl EDTA (0,5 M), 1,2 µl Lithiumchlorid (8 M) und 70,7 µl absoluter Ethanol zugegeben und bei -80°C eine Stunde inkubiert.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Transkriptionsreaktion

Komponenten*	Transkription Not I Verdauung (µl)	Transkription Nco I Verdauung (µl)
DEPC-Wasser	8	8
5x Transkriptionspuffer	4	4
10x DIG-RNA-LabelingMix	2	2
100 mM DTT	2	2
Linearisierungsprodukt	2	2
T7-RNA-Polymerase	2	---
Sp6-RNA-Polymerase	---	2

* Die folgenden Komponenten: 5x Transkriptionspuffer, T7-RNA-Polymerase, Sp6-RNA-Polymerase, stammen von der Firma Promega, Mannheim.

Nach der Inkubation folgte die Zentrifugation der Proben (17400 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen; das Pellet wurde mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend ein weiteres Mal zentrifugiert (17400 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37 °C über 15 min getrocknet. Zum Pellet (DIG-markierten cRNA-Sonden) wurden danach 50 µl DEPC-Wasser zugegeben und die Probe zur Resuspension der Sonden für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Lagerung der Sonde bis zum weiteren Gebrauch erfolgte bei -20 °C.

3.9.2 Überprüfung der cRNA-Sonden mittels Dot Blot

Die Überprüfung der Effizienz der cRNA-Markierung und die semiquantitative Beurteilung der Konzentration der eingesetzten Sonden erfolgte für jede Sonde durch getrennte Dot Blots. Hierfür wurde das Reaktionsprodukt aus der in vitro-Transkription (s. Kap. 3.9.1) an eine Nylonmembran (Nylon Membranes, positively charged; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durch dreißigminütiges Backen bei 120 °C fixiert. Nach Inkubation mit dem an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Digoxigenin-Antikörper erfolgte analog der in situ Hybridisierung die kolorimetrische Detektion.

Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der hergestellten DIG-markierten cRNA in autoklaviertem Wasser in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 hergestellt.

Jeweils 1 µl der Lösungen aus den Verdünnungsreihen wurde in regelmäßigen Abständen auf die Nylonmembran vor dem Backen aufgetragen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 30 min in Tris-Puffer (Tris-Hydrochlorid-Natriumchlorid, pH 7,5) mit einem Zusatz von 2 % Schafserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) und 0,3 % Triton X-100 (Serva, Heidelberg) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem AP-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörper (sheep anti-DIG Fab fragments; Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:1000 in Tris-Puffer (pH 7,5) mit einem Zusatz von 1%igem Schafserum und 0,3 % Triton X-100 für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran zweimal für 10 min im Tris-Puffer, pH 7,5 und einmal für 10 min in Tris-Puffer, pH 9,6 (Tris-Puffer mit Magnesiumchlorid), gewaschen. Die Farbreaktion wurde mittels der NBT/BCIP-Substratlösung (nitroblue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolylo phosphate, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) in Tris-Puffer (pH 9,6) ausgelöst. Die semiquantitative Auswertung der Farbreaktion erfolgte anhand eines Standards; hierfür wurde eine Verdünnungsreihe des DIG-RNA-Standards (100 ng/µl) aus dem DIG-RNA-Labeling Mix in den Konzentrationen 10; 5; 2,5; 1,25 und 0,625 ng/µl hergestellt und in dem Dot Blot parallel zu den untersuchten Proben angesetzt.

Bei den Dots hoher Konzentration war eine Farbreaktion schon nach wenigen Minuten zu beobachten, bei den höheren Verdünnungsstufen wurde eine ausreichende Farbintensität erst nach mehreren Minuten erreicht. Die Farbreaktion wurde durch fünf minütiges Waschen unter fließendem Leitungswasser beendet. Für die ersten Testversuche wurde die höchste Sonden-Verdünnung, die nach einminütiger Substrat-Inkubation ein deutliches Signal erzeugte, verwendet. Vergleiche mit dem parallel inkubierten DIG-RNA-Standard ergaben, dass dies einer DIG-cRNA-Konzentration zwischen 1,25 bis 5 ng/µl entsprach.

3.9.3 Vorbereitung der Gewebeschnitte für die in situ Hybridisierung

Zur in situ Hybridisierung wurde paraffineingebettetes Probenmaterial verwendet. Die Gewebeschnitte (ca. 5 - 6 µm) wurden auf SuperFrost-Plus Objektträger (Menzel Glaeser, Braunschweig) gezogen und bei 37 °C getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst 5 min bei 60 °C im Brutschrank belassen und danach zweimal über 5 min in Xylol verbracht. Danach folgte die Rehydrierung der Schnitte mit einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 5 min in absolutem Ethanol, dann durch kurzes Eintauchen

in 96%igem Ethanol und 5 min in 70%igem Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte in DEPC-Wasser gewaschen. Zur Denaturierung basischer Proteine (Vermeidung unspezifischer Reaktionen) wurden die Schnitte 20 min in 0,2 M HCl bei Raumtemperatur inkubiert, danach folgte eine Waschung über 15 min in 2 x SSC (Standard Saline Citrate) im Wasserbad bei 70 °C. Die Gewebeporosität wurde danach durch den proteolytischen Verdau mit einer Proteinase K (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen) erhöht. Hierfür wurden die Schnitte zuerst kurz mit PBS-MgCl₂ gespült und anschließend mit der Proteinase K-Lösung (70 µg/ml) überschichtet und für 25 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Proteinaseverdau wurde durch ein fünf minütiges Spülen in PBS-MgCl₂ mit einem 0,2 % Glycinzusatz (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH) abgestoppt. Zur weiteren Reduktion der unspezifischen Hintergrundreaktionen wurden die Proben über 15 Sekunden in 4 °C kalter 20%iger Essigsäure verbracht. Nach kurzer Spülung in PBS-MgCl₂ wurden die Schnitte für 10 min in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung nachfixiert und durch kurzes Eintauchen mit PBS-MgCl₂ gewaschen.

3.9.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

Für die Prähybridisierung wurden die Schnitte für 60 min in DEPC-Wasser mit 20 % Glycerin inkubiert und anschließend kurz mit 2 x SSC gespült. Während der Prähybridisierung wurden die Sonden-Ansätze für die Sense- und Antisense-Proben und der Hybridisierungspuffer wie folgt vorbereitet (s. Tabelle 21 - 22), (alle Chemikalien stammen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen).

Tabelle 21: Zusammensetzung des Sondenansatzes

Komponenten	Sondenansatz für Sens- und Antisens-Proben (µl)
Salmon-Sperm DNA (10mg/ml)	2
Hefe-tRNA (9-11 mg/ml)	4
DIG-markierte RNA-Sonde	8

Tabelle 22: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers

Komponenten	Hybridisierungspuffer (μ l)
20 x SSC	20
Denhardt's Reagenz (50 %)	2
Deionisiertes Formamid (50 %)	100
Dextransulfat (50 %)	40
DEPC-Wasser	24

Zur Denaturierung und Streckung der Zielsequenzen (mRNA) im Gewebe sowie der Sonden wurden die Sondenansätze in Reaktionsgefäßen im Wasserbad und die Objektträger auf einer Heizplatte über 12 min bei 70 °C belassen. Anschließend wurden die Objektträger und Sonden-Ansätze auf Eis gelegt.

Der Sondenansatz wurde mit dem Hybridisierungspuffer gemischt, wovon jeweils ca. 65 μ l des Gemisches auf die Schnitte aufgetragen wurde. Die Objektträger wurden in einer feuchten Hybridisierungskammer platziert, die mit Formamid getränkten Tüchern ausgelegt war, und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.9.5 Stringentes Waschen und immunhistologischer Nachweis der Sondenbindung

Nach Ablauf der Hybridisierungsdauer wurden die Schnitte dem so genannten stringenten Waschen unterzogen. Dafür wurden die Schnitte der Reihenfolge nach 4 x 10 min in 4 x SSC bei 37 °C, 15 min in 2 x SSC bei 60 °C, 15 min in 0,2 x SSC bei 42 °C, 5 min in 0,1 x SSC bei Raumtemperatur und anschließend 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur zur Entfernung unspezifisch gebundener DIG-cRNA gewaschen.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation in Tris-Puffer (pH 7,5) mit 3% Schafserum über eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde auf die Schnitte der AP-konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper (sheep anti-DIG Fab fragments; Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:5000 in Tris-Puffer (pH 7,5) mit einem Zusatz von 3 % Schafserum aufgetragen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Die Proben wurden zweimal für 10 min in Tris-Puffer (pH 7,5) und zweimal für 5 min in Tris-Puffer (pH 9,6) gewaschen. Die endogene Phosphatase wurde mittels 4 μ g Levamisol/ml (Sigma Aldrich-Chemie, GmbH, Steinheim) im letzten Waschschrift geblockt.

Die Signale wurden mit NBT/BCIP sichtbar gemacht. Je nach Intensität der Signale wurde die Farbreaktion nach 1 - 3 Stunden durch jeweils 5 minütiges Waschen mit einer Levamisol-Lösung (4 µg/ml) und fließendem Leitungswasser beendet. Anschließend erfolgte die Eindeckung der Gewebeschnitte mit Glyceringelatine.

3.10 One-step in situ RT-PCR zur Lokalisation der Cox2-Expression

Die in situ one-step RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode, welche die Empfindlichkeit einer Polymerasekettenreaktion mit dem Vorteil der in situ Hybridisierung verbindet.

Der Nachweis der Lokalisation der Cox2-Expression im CL der Hündin im Paraffin-eingebetteten Gewebe erfolgte mit der in situ RT-PCR in Anlehnung an das von Song et al. (2004) beschriebene Protokoll.

Die ca. 5 µm dicken Schnitte wurden auf SuperFrost-Plus Objektträger (Menzel Glaeser) gezogen. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 15 min in Xylol inkubiert, anschließend für 2 x 5 min mit 100%igem Isopropanol gewaschen und danach 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Permeabilität des Gewebes für den RT-PCR-Mix zu verbessern, wurden die Schnitte mit einer Proteinase K-Lösung (Sigma Aldrich-Chemie, GmbH) (3 µg/ml in PBS) bei Raumtemperatur über 15 min verdaut. Danach wurden die Schnitte 3 Mal mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gespült. Um eine Amplifikation der genomischen DNA zu vermeiden, wurden die Schnitte mit DNase behandelt. Hierfür wurden sie mit 20 µl DNase-Mix überschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Tabelle 23).

Tabelle 23: Zusammensetzung des DNase-Mixes

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
MnCl ₂	1 µl	10 mM
10 x PCR-Puffer	1 µl	10 x
DNase I RNase frei	2 µl	10 U/µl
RNase-Inhibitor	1 µl	40 U/ µl
DEPC-Wasser	15 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

Am nächsten Tag wurden die Proben zweimal kurz mit DEPC-Wasser gewaschen, 5 min in 100%igem Isopropanol inkubiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach erfolgte die eigentliche in situ RT-PCR, bei der die DIG-markierten UTPs in die Amplifikate inkorporiert wurden. Dazu wurde jede Probe mit 50 µl RT-PCR-Mix überschichtet. Um das Austrocknen der Proben während der Reaktion zu vermeiden, wurde auf das Reaktionsgemisch Mineralöl (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH) gegeben. Der RT-PCR-Mix wurde mit dem EZ rTth RNA PCR Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weistadt) angesetzt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zusammensetzung des RT-PCR-Mixes

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
Mn(OAc) ₂	6	25 mM
5 x EZ-Puffer	10	5 x
dGTP, dTTP, dATP, dCTP	1	10 mM
DIG-dUTP	1	10 mM
RNase-Inhibitor	1	20 U/µl
Primer-Mix*	6	10 pmol/ µl
rTth-DNA-Polymerase**	2	2,5 U/µl
DEPC-Wasser	23	
Gesamtvolumen	50	

* Für den in situ RT-PCR-Nachweis der Cox2-Expression wurden die in Kap. 3.3.2 beschriebenen Primer verwendet.

** Eine Besonderheit der reversen *Thermus thermophilus* DNA-Polymerase (rTth-DNA-Polymerase) ist ihre enzymatische, temperaturabhängige Doppelaktivität: bei 62 °C verhält sich das Enzym wie eine reverse Transkriptase, bei 68 °C entwickelt sie die Polymeraseaktivität.

Die Proben wurden danach in dem PTC-200 DNA Engine thermal cycler (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) platziert und nach dem in Tabelle 25 angegebenen Programm behandelt.

Tabelle 25: Temperatur- und Zeitprofil der one-step in situ RT-PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Reverse Transkription	62 °C	45 min	
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Beginn der Zyklen			
Denaturierung	94 °C	1,30 min	30 Wiederholungen
Annealing = T _A	57 °C	1,30 min	
Verlängerung	68 °C	2 min	
Ende der Zyklen			
Finale Verlängerung	68 °C	10 min	
Bis zu Entnahme	4 °C		

Nach Ablauf der one-step RT-PCR wurden die Schnitte zuerst kurz mit 0,1 x SSC-Puffer bei 60 °C gespült und danach für 15 min mit der gleichen Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min mit Tris-Puffer (pH 7,5) bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem AP-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörper (sheep anti-DIG Fab fragments; Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:5000 in Tris-Puffer (pH 7,5) mit einem Zusatz von 0,1%igem Schafserum, 60 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Tris-Puffer (pH 7,5) und zweimal für 5 min in Tris-Puffer (pH 9,6) gewaschen, wobei zur Blockade der endogenen Phosphatase zum letzten Waschschrift 4 µg Levamisol/ml Sigma Aldrich-Chemie, GmbH) zugegeben wurden.

Zum Schluss wurden die Schnitte mit NBT/BCIP inkubiert. Die Farbreaktion wurde je nach Intensität des Signals nach 5 - 20 min durch fünf minütiges Waschen unter fließendem Leitungswasser beendet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Glyceringelatine eingedeckt.

Es wurden für jeden Versuch Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Probe ohne DNase-Behandlung. Für die Amplifikation der genomischen DNA konnten bei der Positivkontrolle neben den zytoplasmatischen Signalen auch starke nukleäre Signale beobachtet werden. Als Negativkontrollen dienten Proben, bei denen keine Primerzugabe erfolgte.

3.11 Immunhistochemischer Nachweis der Cox2- und 3 β HSD-Expression

Um einen eventuellen Bezug zwischen der Expression der zu untersuchenden Parameter auf mRNA- und Protein-Ebene festzustellen, wurde die Expression der Proteine immunhistologisch in Anlehnung an ein Protokoll von Hoffmann und Büttner (1998) an paraffineingebetteten Proben durchgeführt. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Antikörpern, die auch beim Hund erfolgreich eingesetzt werden konnten, mussten die Versuche auf die Expression der Cox2 und 3 β HSD beschränkt werden.

Zur Verfügung standen folgende Antikörper:

- monoclonal mouse anti rat Cox2 (IgG1, clone 33 BD Pharmingen)
- polyclonal rabbit anti human Typ I (placental) 3 β HSD (wurde von Prof. JI. Mason, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, zur Verfügung gestellt).

Zum Entparaffinieren wurden die ca. 5-6 μ m dicken, auf SuperFrost-Plus Objektträger (Menzel Glaeser, Braunschweig) gezogenen Schnitte, 2 x 10 min in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte jeweils zweimal 2 min in 100 %-, 95 %- und 70%-igem Ethanol rehydriert. Es folgte eine fünf minütige Spülung in fließendem Leitungswasser.

Infolge der Konservierung des Gewebes durch Formol waren die Epitope vernetzt worden. Zu deren Demaskierung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 5 min in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) inkubiert und anschließend für 3 x 5 min in der Mikrowelle bei 560 Watt in vorgeheiztem Citratpuffer gekocht. Flüssigkeit, die während des Kochens verdampfte, wurde mit destilliertem Wasser ersetzt. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 min abgekühlt und im Anschluss für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 30-minütige Inkubation mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol unterdrückt. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min mit IHC-Puffer/0,3 % Triton X- 100 (pH 7,2 - 7,4; 0,8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 2,68 mM KCl, 137 mM NaCl) gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 20 min mit 10%igem inaktivierten Pferdeserum in IHC-Puffer für den immunhistologischen Nachweis von Cox2 und mit 10%igem Ziegen Serum in IHC-Puffer für den immunhistologischen Nachweis von 3 β HSD überschichtet.

Nach Absaugen der Blockierungslösung wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper überschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Dafür wurde der monoklonale anti-Cox2 Primärantikörper (s.o.) 1:100 und der polyklonale anti-3βHSD Primärantikörper (s.o.) 1:3000 mit IHC-Puffer, verdünnt.

Negativkontrolle bei der Darstellung von Cox2 waren Schnitte, die mit einem irrelevanten (Nonsense) monoklonalen Antikörper Mab IgG1 (Dianova, Hamburg), der ebenso wie der Cox2-Antikörper 1:100 verdünnt war, inkubiert wurden.

Als Negativkontrolle bei der Darstellung von 3βHSD dienten Schnitte, bei denen das spezifische Antiserum durch ein gleichermaßen verdünntes Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens ersetzt worden war.

Nach der Inkubation mit dem Primär-AK wurden die Objektträger 2 x 10 min in IHC-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Sekundärantikörper über 30 min bei Raumtemperatur überschichtet. Für den Nachweis der Cox2 wurde ein biotinylierter Pferd-anti-Maus IgG Antikörper (1:200 mit IHC-Puffer; BA2000, Vector Laboratories. Inc., Burlingame, USA) verwendet. Der Nachweis der 3βHSD erfolgte mit einem biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper aus dem Vectastain® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories. Inc., Burlingame, USA), der zuvor 1:200 mit IHC-Puffer verdünnt worden war.

Danach wurden die Präparate 10 min in IHC-Puffer gespült und anschließend über 30 min bei Raumtemperatur mit einem Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex aus dem Vectastain®- Kit nach Herstellerangaben inkubiert.

Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation wurden die Schnitte 10 min mit IHC-Puffer gewaschen und zur Sichtbarmachung des an den Sekundärantikörper gebundenen Avidin-Biotin-Komplexes mit dem NovaRed-Substrat (NovaRed substrate kit, Vector Laboratories. Inc., Burlingame, USA) inkubiert. Nach 5 (3βHSD) bzw. 10 (Cox2) Minuten wurde die Farbreaktion durch 10-minütiges Waschen in fließendem Leitungswasser abgestoppt. Die Schnitte wurden danach für 2 Sekunden mit einer Hämatoxilin-Lösung gegengefärbt und weitere 10 min mit Leitungswasser gespült. Schließlich erfolgte eine Dehydrierung der Präparate durch eine ansteigende Ethanolreihe (jeweils zweiminütige Inkubationen mit 70 %, 80 %, 95 % und 100 % Ethanol); zwei 10-minütige Inkubationen in Xylol folgten. Die Eindeckung der Schnitte erfolgte mittels Histokitt (Assistent, Osterode).

3.11.1 Qualitative und Quantitative Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch bei 200- und 400-facher Vergrößerung. Die Negativkontrollen dienten zur Differenzierung von unspezifischen bzw. falsch positiven Färbereaktionen.

Während die Auswertung der Expression der 3 β HSD nur qualitativ erfolgte, erfolgte dies für Cox2 sowohl qualitativ als auch quantitativ.

Hierfür wurde ein Paraffinblock, d.h. ein CL pro Hund, herangezogen. Von diesem Block wurden jeweils 3 Schnitte ausgewertet. Ausgezählt wurden 3 Gesichtsfelder pro Schnitt. Pro Gesichtsfeld wurden 200 Luteinzellen bewertet. Die Zellen wurden in positive und negative Zellen unterteilt. Somit wurden pro Block 1800 Luteinzellen gezählt und als positiv bzw. negativ eingestuft.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

Es wurde ein globaler Vergleich aller Zeitpunkte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests (nicht-parametrische ANOVA) durchgeführt.

3.12 Puffer und Lösungen

0,5 M EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

EDTA	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). Dann mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen.

1 M MgCl₂ Lösung

MgCl ₂	81,4 g
DEPC-Wasser	ad 400 ml

10 mM Citratpuffer für die Mikrowellenbehandlung der Gewebeschnitte (pH 6,0)

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure

C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	21,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat

C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ x 2H ₂ O	29,41 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Gebrauchslösung

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua dest.	450 ml

20%-ige Essigsäure

Eisessig	40 ml
DEPC-Wasser	160 ml

Lagerung bei 4 °C.

20 x SCC Puffer pH 7,0 (Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer; standard saline citrate)

C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ x 2H ₂ O	88,23 g
NaCl	175,29 g
DEPC-Wasser	ad 1000 ml

50%-ige Dextransulfat-Lösung

Dextransulfat 5 g
 DEPC-Wasser 10 ml
 Lagerung bei -20 °C.

DEPC-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.

Ethanol (Alkohol)-ReiheEthanol (96 %):

Ethanol reinst (100 %) 96 ml
 Aqua dest. 4 ml

Ethanol (70 %):

Ethanol reinst (100 %) 70 ml
 Aqua dest. 30 ml

Formaldehyd 4%ig, gepuffert, pH 7,0 für die Gewebefixierung (Formol nach Lillie)

Formol (ca. 40%ige wässrige Formaldehyd-Lösung) 500 ml
 NaH₂PO₄ x H₂O 20 g
 Na₂HPO₄ 32.50 g
 Aqua dest. ad 5000 ml

Glycerin 20 %

Glycerin 10 ml
 DEPC-Wasser ad 50 ml

H₂O₂-Lösung 0,3%ig

H₂O₂ 30%ig 2 ml
 Aqua dest. ad 200 ml

IHC-Puffer/0,3 % Triton X- 100; pH 7,2 - 7,4

Na₂HPO₄ 1,2 g
 KH₂PO₄ 0,2 g
 KCl 0,2 g

NaCl 8,0 g
Aqua dest. ad 1000 ml

pH 7,2 - 7,4 einstellen und anschließend 3ml Triton X- 100 zugeben.

Levamisol-Lösung zur Hemmung der endogenen AP-Aktivität (4 µg/ml)

Levamisol 4 µg
DEPC-Wasser 1 ml

Lagerung bei - 20°C.

Paraformaldehyd-Lösung (4 %) pH 7,0 zur Nachfixierung in der in situ

Hybridisierung

Paraformaldehyd 20 g
1 x PBS-MgCl₂-Puffer 500 ml

2 N NaOH-Lösung zugeben, bis pH 7,0 erreicht ist.

PBSM/0,2 % Glycin

Glycin 100 mg
PBSM-Puffer 50 ml

PBS-MgCl₂ (PBSM) Puffer

PBS-Tablette 1
Aqua dest. 200 ml
1 M MgCl₂ Lösung 1 ml

Phosphatpuffer für die Aufbewahrung von Gewebeproben nach Formalin-Fixierung

Lösung 1:

NaH₂PO₄ x H₂O 13,8 g
Aqua dest. ad 1000 ml

Lösung 2:

Na₂HPO₄ x 2H₂O 17,8 g
Aqua dest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Lösung 1: 14,15 ml

Lösung 2: 35,85 ml

Proteinase K-Lösung für die in situ one step RT-PCR (3 µg/ml)

Proteinase K 3 mg

PBSM-Puffer 100 µl

Proteinase K-Lösung für die in situ Hybridisierung (70 µg/ml)

Proteinase K 70 mg

PBSM-Puffer 100 µl

TBE (10 x)

Tris 108 g

Borsäure 55 g

0,5 M EDTA (pH 8,0) 40 ml

Aqua dest. ad 1000 ml

TBE (1 x)

TBE (10 x)-Puffer 100 ml

Aqua dest. ad 1000 ml

Tris-Puffer (Tris-Hydrochlorid-Natriumchlorid), pH 7,5

Tris-HCl 12,70 g

TRIZMA Base 2,36 g

NaCl 8,76 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

Tris-Puffer pH 9,6 (Tris-Hydrochlorid-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid)

Tris-HCl 1,52 g

TRIZMA Base 10,94 g

NaCl 5,84 g

MgCl₂ 4,76 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

3.13 Reagenzien

- 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- 6 x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Agarose, ultra Pure, electrophoresis grade (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Ampicilin Tabletten (Stratagene Europe, Holland)
- BA2000; Pferd-anti-Maus IgG biotinylierter Antikörper (Vector Laboratories. Inc., Burlingame, USA)
- Borsäure, Pufferan® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Chloroform, Rotisolv® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Deionisiertes Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Denhard's Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC; Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- DIG-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- DNase I, RNase-frei, 10 U/µl (Roche Molekular Biochemicals, Mannheim)
- E. coli (XL-1 Blue) (Stratagene Europe, Holland)
- EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- EDTA Na₂ (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Essigsäure (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Ethanol (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Ethidiumbromid 1 %, (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)
- Formamide (Fluka, Neu-Ulm)
- Glycerin Rotipuran®: 99,5 % Wasserfrei (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- GOLD PCR Core Kit® (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
- Hämatoxilin (Merck KGaA, Darmstadt)
- HCl, Salzsäure, rauchend, 37%ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- Hefe-tRNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Histokitt (Assistent, Osterode)
- IPTG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

- Isopropanol/2-Propanol, Rotipuran® (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- K₂HPO₄ (Kaliumphosphat monobasisch; Fluka, Neu-Ulm)
- KCl (Kaliumchlorid; Merck, Darmstadt)
- KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat; Merck, Darmstadt)
- LB-Medium (Bio 101 Inc. CA, USA)
- LB-Medium-Agar (Bio 101 Inc. CA, USA)
- Lithiumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Manganese chloride, 1 M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
- MgCl₂ (Magnesium Chlorid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Mineral-Öl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Monoclonal mouse anti rat Cox2 (IgG1, clone 33 BD Pharmingen)
- Monoklonaler Antikörper Mab IgG1 (Cox2 Negativkontrolle) (Dianova, Hamburg)
- Na₂HPO₄ (Di-Natriumhydrogenphosphat reinst; Merck, Darmstadt)
- Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Di-Natriumhydrogenphosphat; Merck, Darmstadt)
- NaCl (Natriumchlorid; Merck, Darmstadt)
- NaOH (Natriumhydroxid; Merck KGaA, Darmstadt)
- NBT/BCIT: nitroblue tetrazolium/ 5-bromo-4chloro-3-indolylo phosphate, toluidine salt (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
- Nco I und Not I Restriktionsendonukleasen mit mit deren Puffern NEB-Buffer 3 und 4 (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.)
- NovaRed substrate kit (Vector Laboratories. Inc., Burlingame, USA)
- Paraformaldehyd (Fluka, Neu-Ulm)
- Peroxidase Kit: Vector® (Nova-RED) (Linearis Biologische Produkte GmbH, Wertheim)
- Pferdeserum
- pGEM®-T Vektor (pGEM®-T Vector System I; Promega GmbH, Mannheim)
- Phosphate Buffered Saline Tablets (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Polyclonal rabbit anti human Typ I (placental) 3βHSD Antikörper (Prof. JI. Mason, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland)
- Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

- QIAprep[®] Miniprep-Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- RNAlater (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden)
- RNase Inhibitor, 40 U/ μ l (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- rTth RNA PCR Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weistadt)
- Salmon-Sperm DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Schafserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Sheep anti-DIG Fab fragments (Boehringer, Mannheim)
- SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech)
- T7-RNA-Polymerase, Sp6-RNA-Polymerase, 5x Transkriptionspuffer (Promega, Mannheim)
- TaqMan[®] qPCR MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- Tetracyclin (Stratagene Europe, Holland)
- Tissue-Tek[®] (O.C.T.) Einbettungsmedium (Vogel, Gießen)
- Tris hydroxymethylaminomethane (Trizma[®] Base) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Tris, Pufferan[®] (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Tris: Tris hydroxymethyl aminomethan (Fluka, Neu-Ulm)
- Triton X- 100 (Serva, Heidelberg)
- Trizol[®] Reagent (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Vectastain[®] PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories. Inc., Burlingame, USA)
- WasserstoffPGFReroxid, 30 %ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- X-Gal (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Xylol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Zitronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

3.14 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- 96-well optical plates (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Abzug (Hohenloher Spezialmöbelwerk, Schaffitzel GmbH + Co. KG, Öhringen)
- Bildbearbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- BLAST® - Software (Basic Local Alignment Search Tool)
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Bunsenbrenner (MAGV, Rabenau-Londorf)
- ChromasPro Version 1.2 oligo Software (Technelysium Pty. Ltd, Australien)
- Einbettungsautomat: (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg)
- Eindeckmedium: Histokitt (Assistent, Osterode)
- Einmalmesser für Mikrotom: Leica DB 80L, Leica Microsystems (Nußloch GmbH, Nußloch)
- Elektrophoresekammer (Hofer® Mighty Small SE 260 System, Amersham Pharmacia, Biotech)
- Elektrophoresekammer-Agarosegel: (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Eppendorf Biophotometer: (Eppendorf AG, Hamburg)
- Eppendorf Reference® variabel 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“ 100 x 150 mm, Gießkammer und Kamm (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)
- Fluorometer ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Handschuhe UniGloves® (Troisdorf)
- Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50 (Moulinex, Solingen)
- Heizplatte (Herry Gestigkeit, GmbH, Düsseldorf)
- Heraeus Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Heraeus LaminAir HA2448 GS (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Heraeus Minifuge RF (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Heraeus Sepatech Biofuge 28RS: (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- HL- Tiefkühlschrank (-80°C, Gewebeaufbewahrung)
- Kryotom 2800 Frigocut-E (Reichert-Jung, Nussloch)

- Kühlschrank (4°C) (Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen)
- Laborwasseraufbereitungsanlagen: Aqua demineralisata Seral-Anlage mit angeschlossener Millipore-Reinigungsanlage: Milli Q, Water Purification System Firma Millipore, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn)
- Magnetrührer: MR 2002 (Heidolph Instruments GmbH&CoKG, Kelheim)
- Messerhalter: Halterset 24 cm lang, 2 Andrückplatten (Leica Vertrieb GmbH, Bensheim)
- Microtom (Reichert Jung AG, Heidelberg)
- Nylon Membran – positively charged (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
- Objektträger Menzel-Gläser: SuperFrost®, 24 x 40 mm, 24 x 50 mm und 24x 60 mm (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig)
- Oligo Analyser 1.0.2/ Oligo Explorer 1.1.0. - Software (freeware aus dem Internet) (©Teemu Kuulasma, University of Kuopio, 70211 Kuopio, Finland)
- Papertücher: (Kimwipes, Ladd Industries, Williston)
- PapPen (G. Kisker - Biotech, Steinfurt)
- Paraffinausgießstation: Histoembedder EG 1160 (Leica Instruments GmbH, Nußloch)
- PCR-Tubes, 0,5 ml, ultradünn, RNase-/DNase-/Pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Petrischalen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- pH-Meter (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte Rabenau-Londorf)
- Powersupply (PCR): 2301 Macrodrive 1 Powersupply (LKB Bromma, Golden, USA)
- Primer Express Software (TaqMan PCR; Version 2,0; Applied Biosystems, Foster City, CA)
- PTC-200 DNA Engine thermal cycler (in situ RT-PCR; Biozym Diagnostik, Hess. 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)
- Schnellkochtopf für LM-Medium-Agar (Fissler GmbH, Hoppstädten-Weiersbach)
- Schüttler: Heidolph Polymax 1040 (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Statistical Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA)
- T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen)

- Tuttnauer Systec Autoklav 3850 ELC (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg)
- Ultra-Turrax®: T-8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5g (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- UV-Spektrometer (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Hamburg) mit Eppendorf Uvette® 220 - 1600 nm (Westbury, USA)
- UV-Transluminator Biostep (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Vakuumpumpe: KNF Neuber, Typ: No 035.1.2 AN. 18, Nr: 472678; VDE 0530, Nr: 83424, Motortyp: MW 63/4, IP 44, Volt:220, 1,8 A, 0,12kW, 50 Hz, 1400 U/min (Freiburg)
- Vortexer Heidolph REAX control (MAGV, Rabenau-Londorf)
- Waage „Mettler AE160“, F. Nr. 38600 (Fa. Mettler-Toledo, Giessen)
- Waage „Mettler PJ300“, F. Nr. 33650 (Fa. Mettler-Toledo, Giessen)
- Wärmeschrank: Memmert, Typ: 3 26, F-Nr: 340 073, 220 Volt, 380 Watt, 50/60 Hz, Din 12880-Kl. 0, Nenntemp.: 70 °C, Schutzart Din 40050-IP20 (Schwabach)
- Wasserbad: Typ WB-24; V220; W 550; Fabrik-Nr.; 8810, max. 90 °C (Medax Nagel KG Kiel)

4 ERGEBNISSE

4.1 Expression der 3 β HSD im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus

Die Darstellung der Expression der 3 β HSD im caninen CL im Verlauf des Diöstrus erfolgte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene.

4.1.1 cDNA-Sequenz der caninen 3 β HSD

Wie in Kap. 3.7.2 dargelegt, konnte die cDNA-Sequenz der caninen 3 β HSD mittels 5'-3'-RACE PCR kloniert werden. Sie besteht aus einer 5'-untranslatierten Region (5'-Untranslated Region; 5'-UTR) von 126 bp, einem offenen Leserahmen (Open Reading Frame; ORF), der 1122 Nukleotide umfasst und einem 3'-UTR-Fragment von 441 Nukleotiden. Der unterstellte ORF kodiert für ein aus 374 Aminosäuren zusammengesetztes Protein.

Die Sequenz der caninen 3 β HSD ist organisiert in 4 Exone. Der Startkodon ist auf dem Exon 2 lokalisiert, und der ORF erstreckt sich bis zum Exon 4 (Abb. 21).

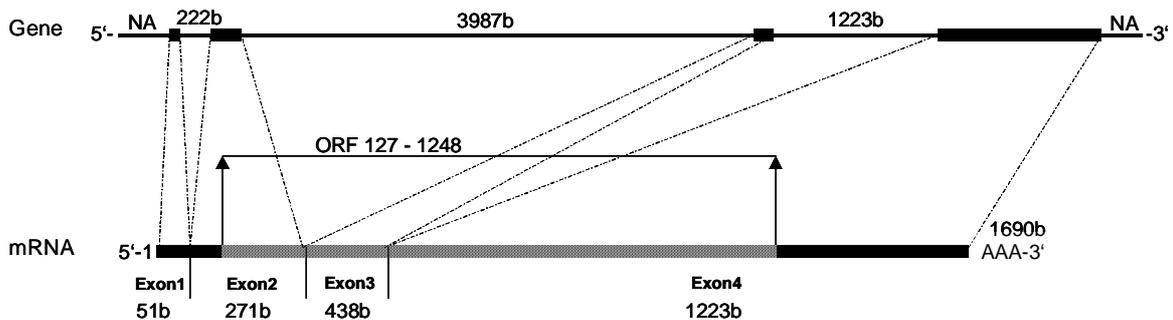


Abb. 21: Genomische Anordnung des caninen 3 β HSD Gens. Die Größe von Exonen und Intronen sowie deren Lokalisation wurden aus der hundespezifischen genomischen Sequenz (Chromosom 17), Genbank Eintragsnummer: NW_876264.1, abgeleitet; die kodierenden Exone sind als schraffierte Fläche, die nicht-kodierenden Exone als dicke Linie und die Introne als dünne Linie gekennzeichnet: NA = nicht verfügbar (Kowalewski et al., 2006a).

Mit Hilfe der BLAST-Software wurde ein Vergleich mit der seit dem Jahr 2004 online verfügbaren gesamten caninen genomischen Sequenz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/index.html>) durchgeführt. Dabei konnte die klonierte Sequenz auf dem Chromosom 17 lokalisiert und in 4 Fragmente (Exone) unterteilt werden, die eine 100%ige Homologie zwischen der klonierten und der genomischen Sequenz aufwiesen. Die bekannten vier Exon-Homologe entsprachen derjenigen anderer Säugetiere (Abbaszade et al., 1997; Bain et al., 1991).

Ein Hinweis auf das Vorliegen möglicher Isoformen konnte nicht festgestellt werden.

4.1.2 Qualitative RT-PCR

Mittels qualitativer RT-PCR konnte die Expression der 3β HSD zu allen Untersuchungszeitpunkten im CL der Hündin nachgewiesen werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung ergaben sich deutliche Banden mit der erwarteten Länge von 103 bp (Abb. 22).

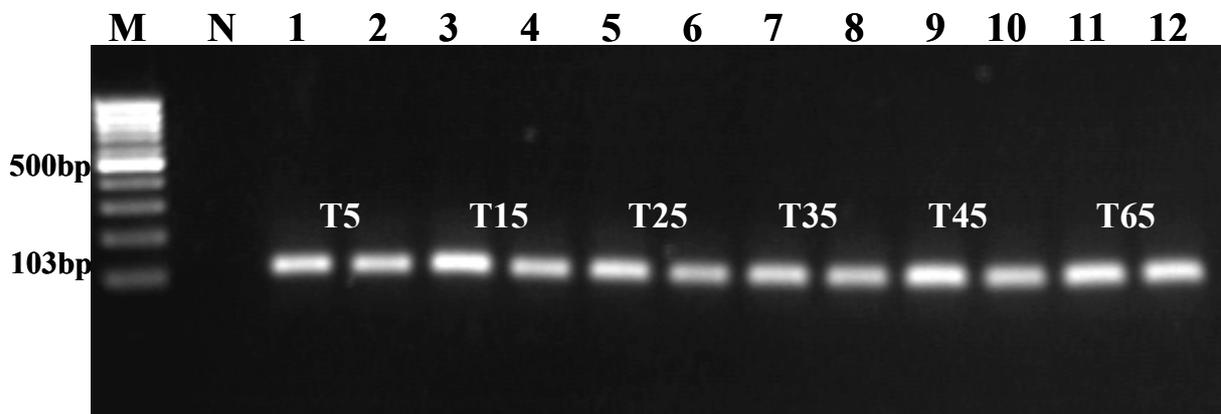


Abb. 22: Qualitative RT-PCR: Expression der mRNA der 3β HSD an den Tagen 5 - 65 nach der Ovulation: 1 - 12 = Proben, canines Lutealgewebe; N = negative Kontrolle; M = 100 bp DNA-Marker; T5 - T65 = Tage nach der Ovulation.

4.1.3 Real Time (TaqMan) PCR

Nach Anwendung der semiquantitativen Real Time PCR zeigte sich ein signifikanter Zeiteffekt ($p < 0,01$); die höchste Expression der 3β HSD wurde in der frühen Lutealphase an den Tagen 5 und 15 p.o. beobachtet, danach ergab sich ein Abfall bis zum Tag 65. Bei Anwendung des Dunn's- Tests ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Tag 15 und 65 ($p \leq 0,05$) (Abb. 23).

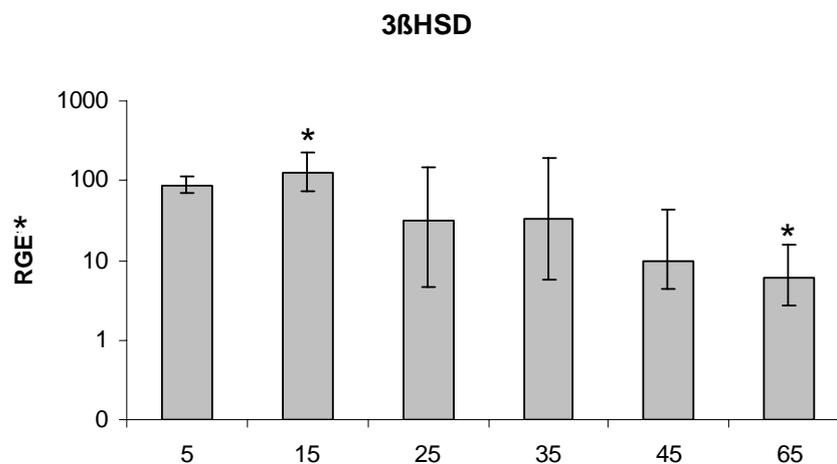


Abb. 23: Real Time (TaqMan) PCR: Expression der mRNA der 3β HSD an den Tagen 5 - 65 nach der Ovulation: RGE* relative gene expression ($X_{\text{gxF}} \pm 1$); die mit einem Stern gekennzeichneten Säulen unterscheiden sich signifikant mit $p \leq 0,05$.

4.2 Lokalisation der Expression der 3β HSD im CL der Hündin während des Diöstrus

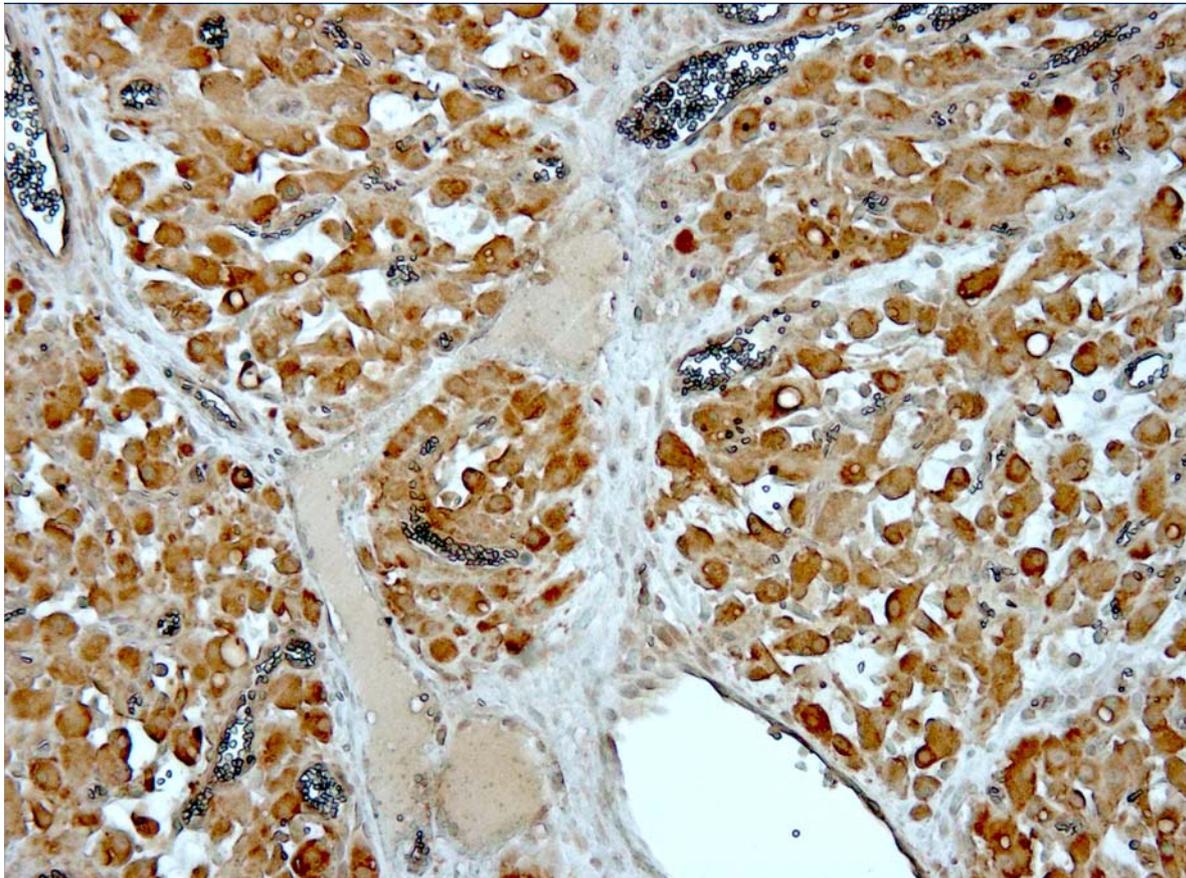
4.2.1 Immunhistochemie

Unter Verwendung eines im Kaninchen generierten polyklonalen Antikörpers, der gegen den humanen, plazentären Typ I der 3β HSD gerichtet war (s. Kap. 3.11), konnte, die Expression des Enzyms auf Protein-Ebene im caninen CL dargestellt werden.

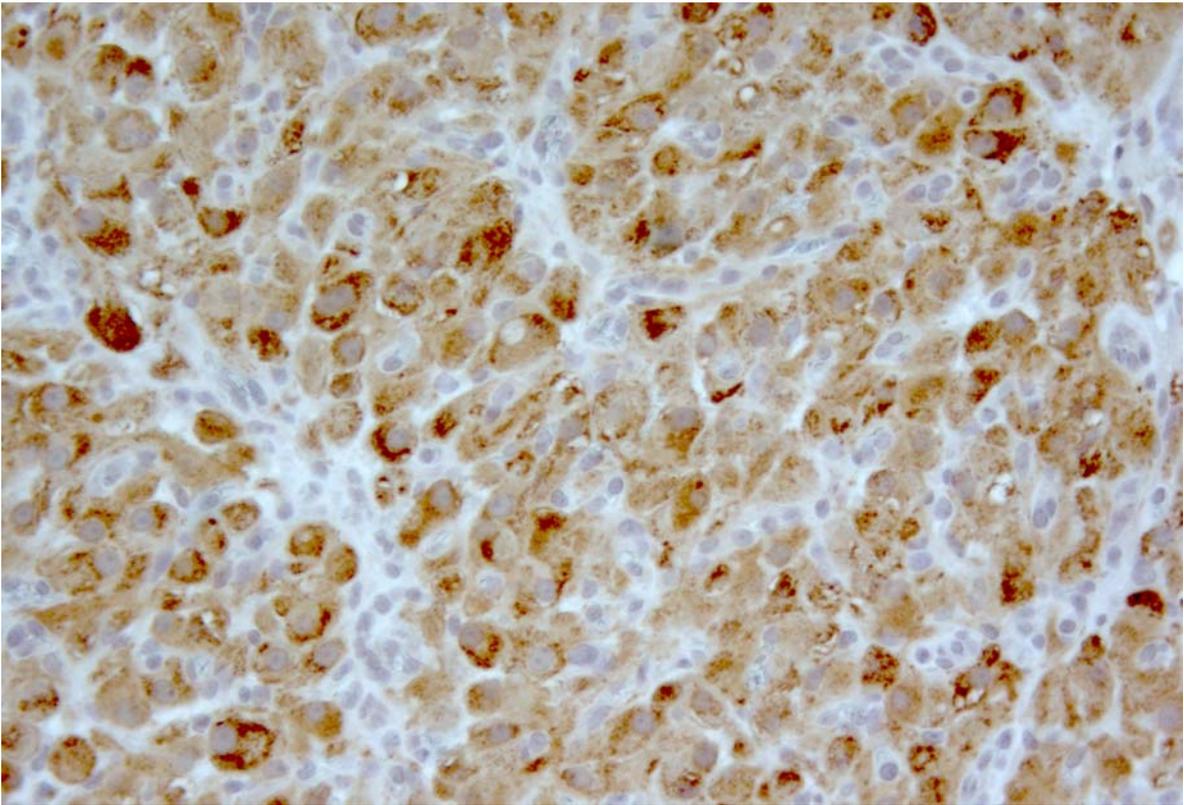
Bei visueller Abschätzung der Signalstärke ergaben sich, ähnlich wie bei der Real Time PCR die stärksten Signale (Zahl der positiven Zellen und Färbetänsität) am Tag 5 und 15 p.o.. Diese waren im Zytoplasma der Luteinzellen lokalisiert, wobei positive Reaktionen gleichmäßig über das CL verteilt waren und zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden konnten. Ab dem Tag 25 wurden die Signale schwächer, wobei jedoch auch bei einzelnen Tieren aus den späteren Beobachtungszeitpunkten (z.B. Tag 35, 45) stärkere Signale beobachtet wurden.

In den Negativkontrollen, in denen das spezifische Antiserum durch das Serum eines nichtimmunisierten Kaninchens ersetzt wurde, wurde bei allen Proben lediglich ein leichtes Hintergrundsignal in allen Zelltypen beobachtet (Abb. 24).

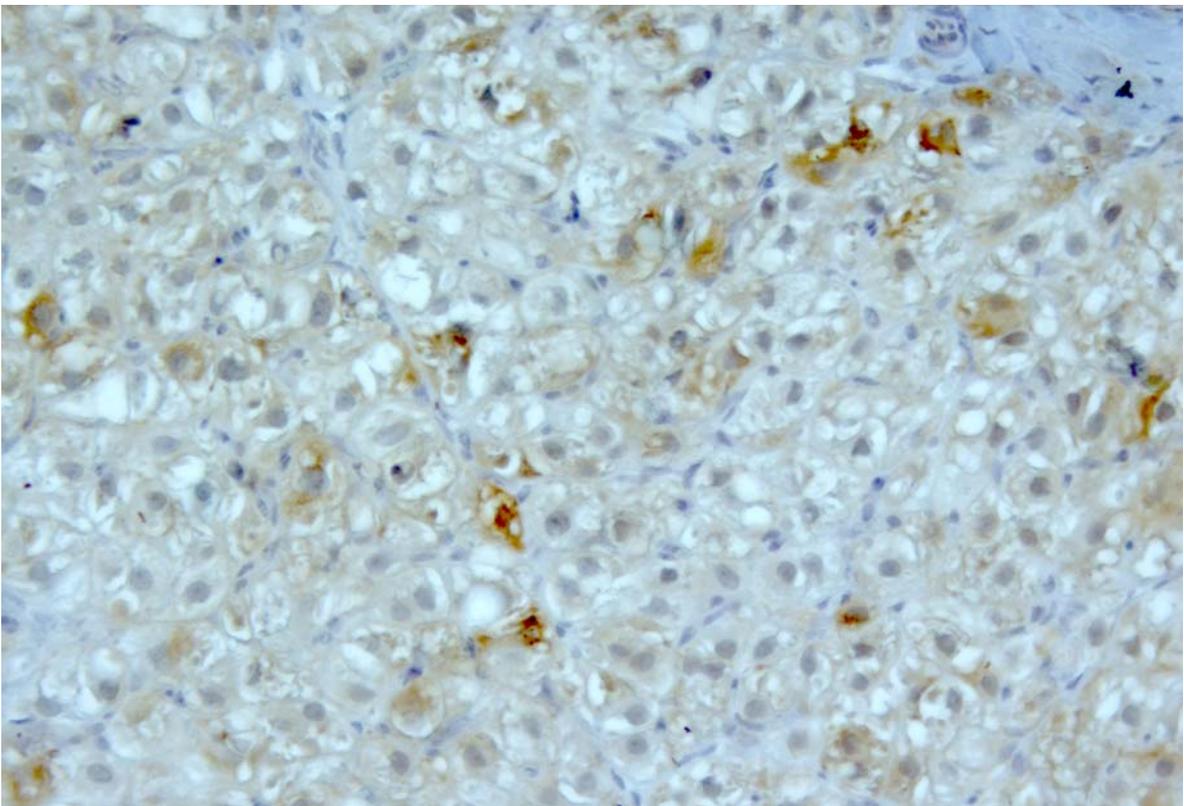
A) Tag 5 p.o. (200-fache Vergrößerung)



B) Tag 25 p.o. (200-fache Vergrößerung)



C) Tag 65 p.o. (200-fache Vergrößerung)



D) Negativkontrolle (200-fache Vergrößerung)

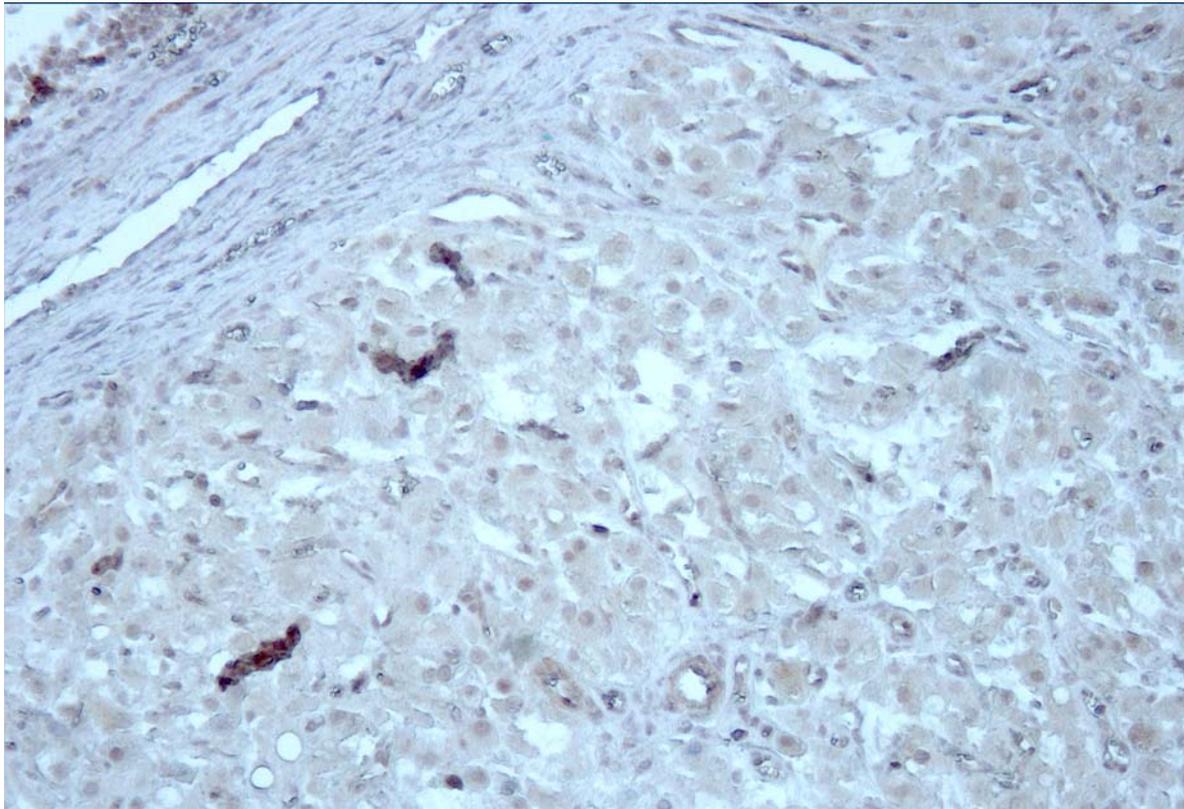


Abb. 24: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation des Proteins der 3 β HSD in caninen CL: A) Tag 5 p.o.; B) Tag 25 p.o.; C) Tag 65 p.o.; D) Negativkontrolle.

4.2.2 *In situ* Hybridisierung (ISH)

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen wurden mittels ISH auf mRNA-Ebene bestätigt.

Die perinukleär gelegenen Signale fanden sich ausschließlich in den Luteinzellen (Abb. 25).

Die Negativkontrollen, in denen die Sonde durch eine Sense-Dig-RNA ersetzt wurde, waren nahezu ungefärbt (Abb. 26), so dass die Signale als spezifisch eingestuft werden konnten.

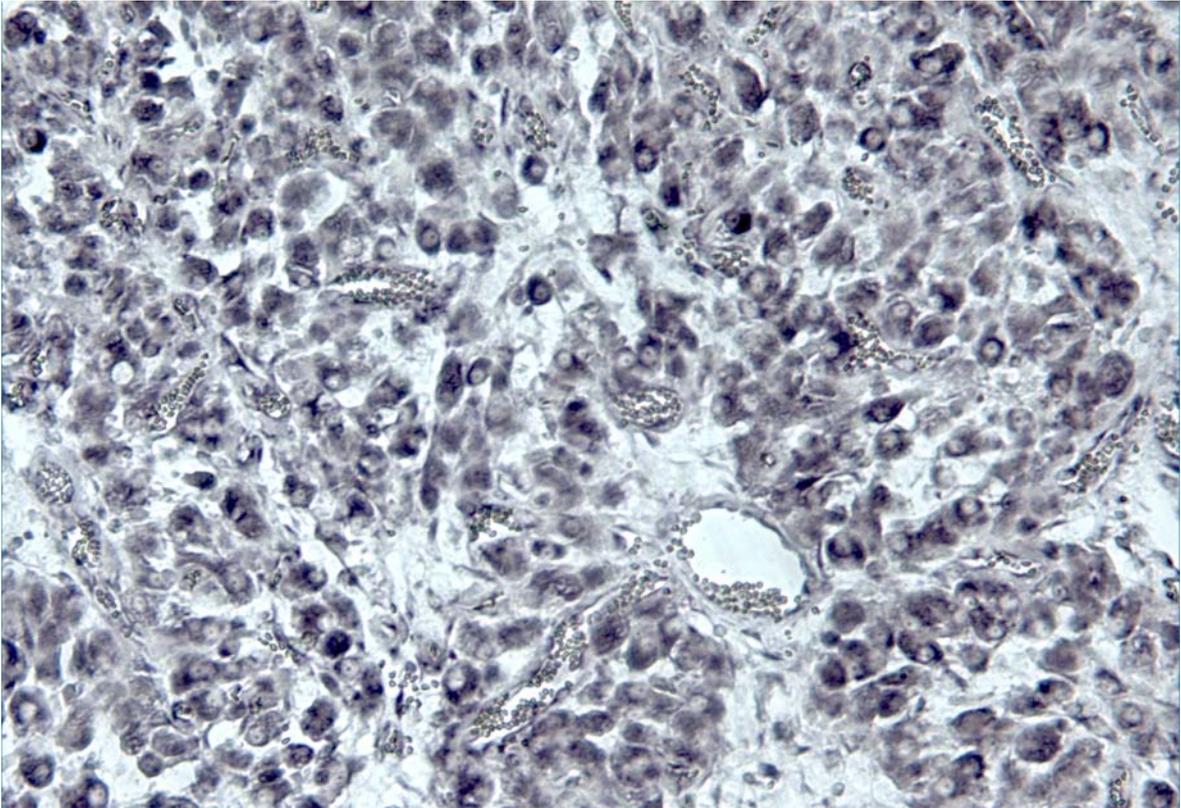


Abb. 25: In situ Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β HSD-spezifischer mRNA im CL der Hündin am Tag 5 p.o.. Spezifische Signale finden sich perinukläer im Zytoplasma der Luteinzellen, die Zellkerne bleiben ungefärbt (Vergrößerung: 200 x).

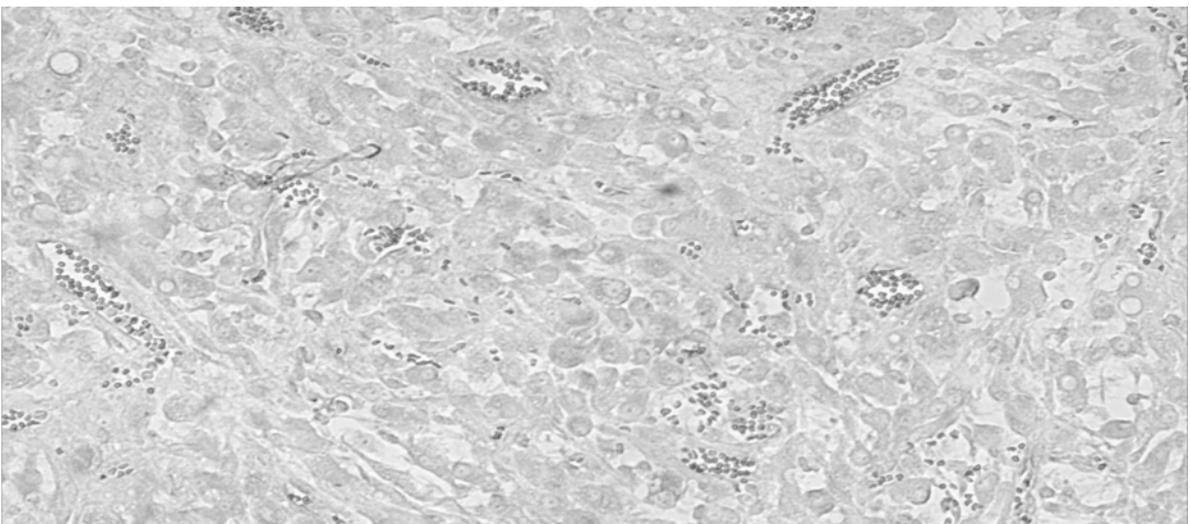


Abb. 26: Negativkontrolle der in situ Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β HSD-spezifischer mRNA (CL, Tag 5 p.o.) (Vergrößerung: 200 x).

4.3 Expression der Cox1 und Cox2 im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus

Die Untersuchungen zum Verlauf der Expression der Cox1 und Cox2 erfolgten auf mRNA- Ebene mittels qualitativer und semiquantitativer Real Time RT-PCR.

4.3.1 Qualitative RT-PCR

Die Expression der mRNA von Cox1 und Cox2 konnte mittels RT-PCR zu allen Untersuchungszeitpunkten im Diöstrus nachgewiesen werden. Die Abb. 27 und 28 zeigen dies an Biespiel der Tage 5 und 35 p.o.

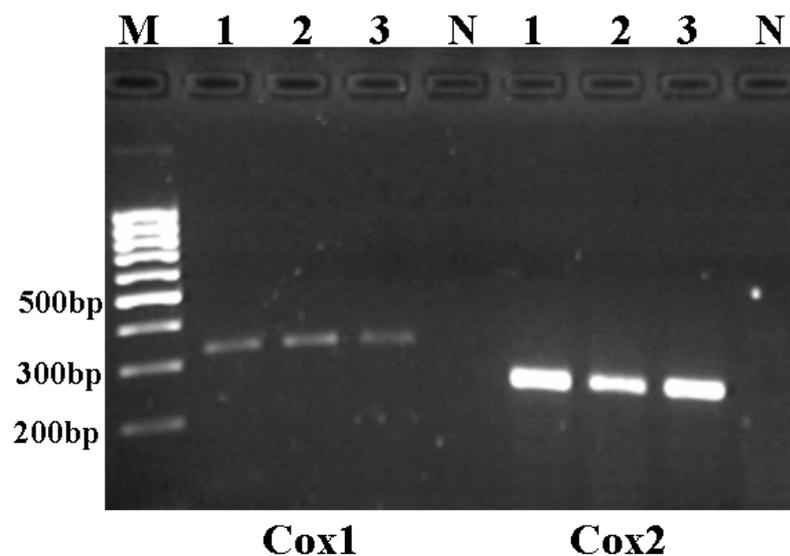


Abb. 27: RT-PCR zur Amplifikation der Cox1 und Cox2 im CL der Hündin am Tag 5 p.o.; 1 - 3 = Proben; N = Negativkontrolle; M = 100 bp DNA-Marker.

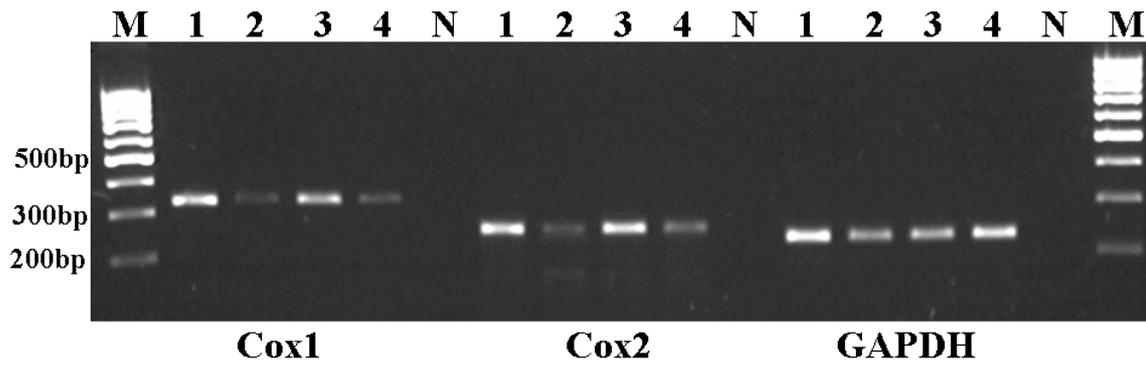


Abb. 28: RT-PCR zur Amplifikation der Cox1, Cox2 und GAPDH (als Kontrolle) im CL der Hündin, am Tag 35 p.o.: 1 - 4 = Proben; N = Negativkontrolle; M = 100 bp DNA Marker.

4.3.2 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Für Cox1 ergab sich ein noch signifikanter Zeiteffekt mit $p = 0,02$, wobei die niedrigste Expression am Tag 5 p.o. nachgewiesen wurde. Der Anstieg der Expression bis zum Tag 25 war signifikant ($p \leq 0,05$). Ab Tag 15 bis 65 p.o. wurden keine weiteren Änderungen im Expressionsniveau der Cox1 beobachtet (Abb. 29).

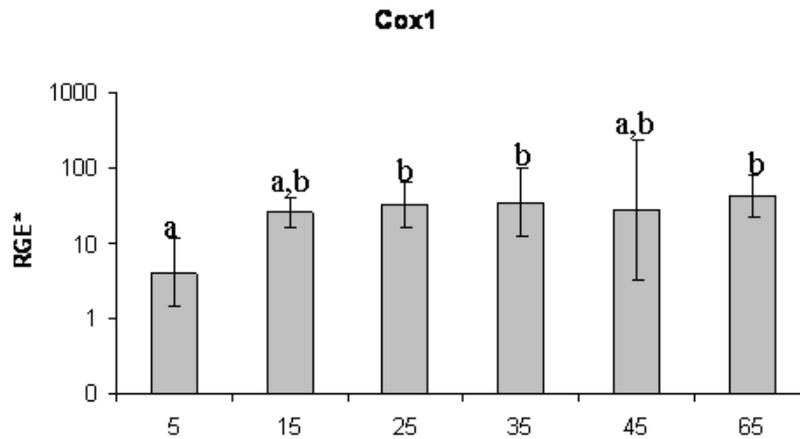


Abb. 29: Expression der Cox1 mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR: *RGE** relative gene expression ($X_{gxSF\pm 1}$); Säulen mit verschiedenen Markierungen(a,b) unterscheiden sich mit $p \leq 0,05$; 5 - 65 = Tage p.o.

Für die Expression der Cox2 war der Zeiteffekt mit $p = 0,0012$ hoch-signifikant, die höchste Expression wurde am Tag 5 p.o. beobachtet, danach zeigte sich ein sukzessiver Abfall der Expression bis Tag 25, wonach keine Veränderung mehr festgestellt werden konnte (Abb. 30).

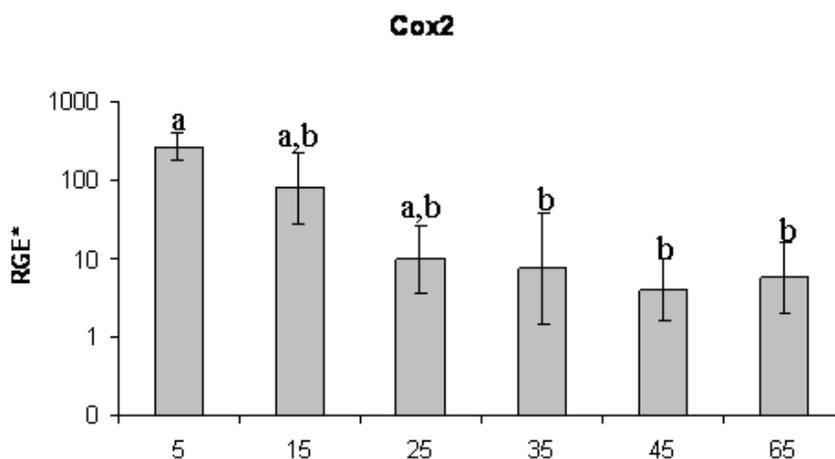


Abb. 30: Expression der Cox2 mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR: *RGE** relative gene expression ($X_{gxSF\pm 1}$); Säulen mit verschiedenen Markierungen^(a,b) unterscheiden sich mit $p \leq 0,5$; 5 - 65 = Tage p.o.

4.4 Lokalisation der Expression der Cox2 im CL der Hündin während des Diöstrus

Die Lokalisation der Cox2-Expression wurde auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und auf mRNA-Ebene mittels in situ one-step RT-PCR untersucht.

4.4.1 Immunhistochemie

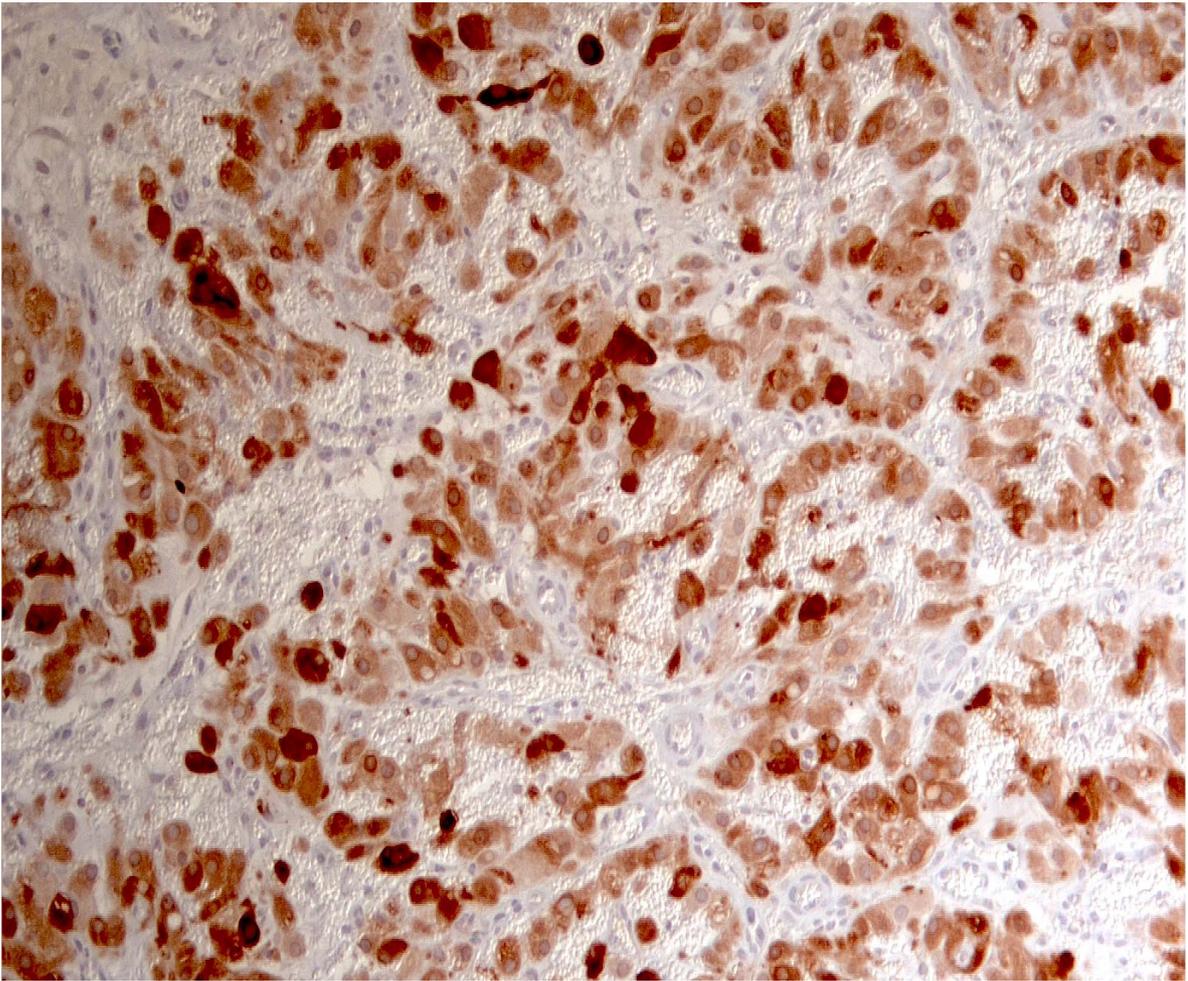
Zur Immunlokalisation der Cox2 stand ein muriner, monoklonaler Primärantikörper (s. Kap. 3.11) zur Verfügung.

Die positiven Signale waren in den Luteinzellen erkennbar. Die Signale waren ausschließlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert, wobei ein Hintergrundsignal nicht beobachtet werden konnte. Der prozentuale Anteil der Cox2 exprimierenden Luteinzellen sank signifikant ($p < 0,05$) von $85,04 \% \pm 12,19$ am Tag 5 auf $63,37 \% \pm 18,96$ am Tag 15 p.o. ab (Tabelle 26), wobei die Signale am Tag 15 p.o. wesentlich schwächer waren. An den Tagen 25 - 65 p.o. konnten keine Signale mehr beobachtet werden (Abb. 31).

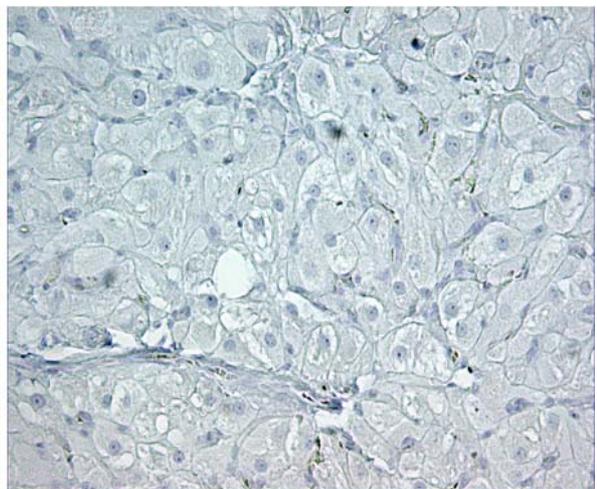
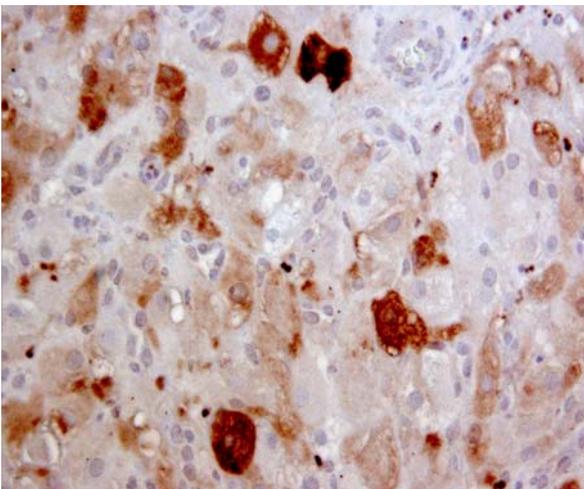
Tabelle 26: Ergebnisse der Auszählung der Gesichtsfelder: Darstellung von Cox2 im CL der Hündin

Gezählte Zellen pro 3 Schnitte (jeweils 3 Gesichtsfelder)				% positiv	
	positiv	negativ	zusammen	pro Tier	pro Tag
Tag 5					85,04 ± 12,19
Tier 1	1598	202	1800	88,78	
Tier 2	1674	126	1800	93	
Tier 3	1695	105	1800	94,17	
Tier 4	1156	644	1800	64,22	
Tier 5	1531	269	1800	85,06	
Tag 15					63,37 ± 18,96
Tier 1	1285	515	1800	71,39	
Tier 2	1410	390	1800	78,33	
Tier 3	544	1256	1800	30,22	
Tier 4	1231	569	1800	68,39	
Tier 5	1233	567	1800	68,5	

A) Tag 5 p.o. (200-fache Vergrößerung)



B) Tag 15 p.o. (200-fache Vergrößerung) C) Tag 25 p.o. (200-fache Vergrößerung)



D) Tag 65 p.o. (200-fache Vergrößerung)

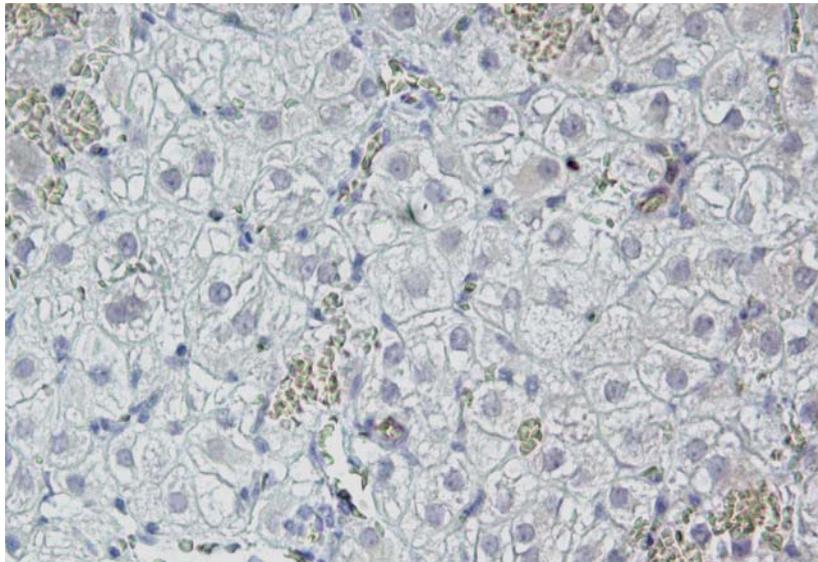


Abb. 31: Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation der Cox2-Expression im caninen CL: *A) Tag 5 p.o.; B) Tag 15 p.o.; C) Tag 25 p.o.; D) Tag 65 p.o.*

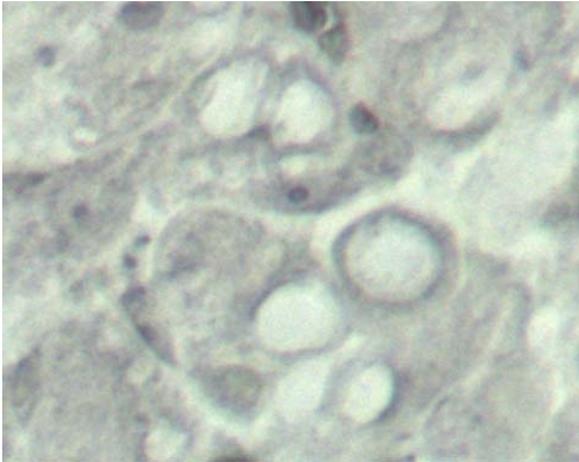
4.4.2 In situ one step RT-PCR

Bei der *in situ one step RT-PCR* zeigten sich, analog zur IHC, positiv reagierende Cox2- Amplifikate praktisch nur im Zytoplasma der Luteinzellen.

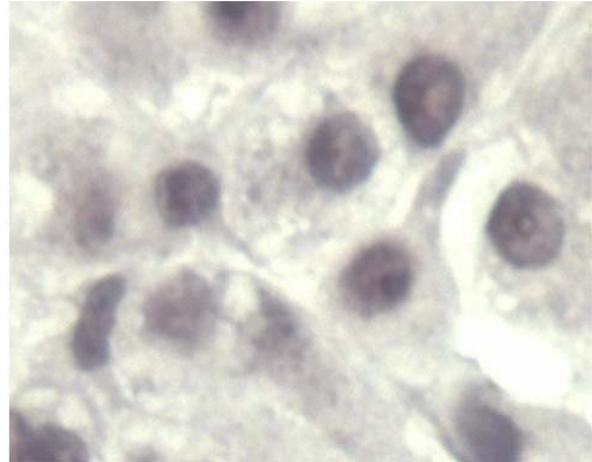
Die Expression der Signale war auf die Tage 5 und 15 p.o. beschränkt und bestätigt damit die Befunde der IHC (Abb. 32a).

Die Positivkontrollen, bei denen zur Amplifikation der genomischen DNA keine DNase- Behandlung erfolgte, zeigten erwartungsgemäß eine sehr starke nukleäre Reaktion (Abb. 32b), die ohne Primer angesetzten Negativkontrollen blieben ungefärbt (Abb. 32c).

A) Probe (400-fache Vergrößerung)



B) Positivkontrolle (400-fache Vergrößerung)



C) Negativkontrolle (400-fache Vergrößerung)

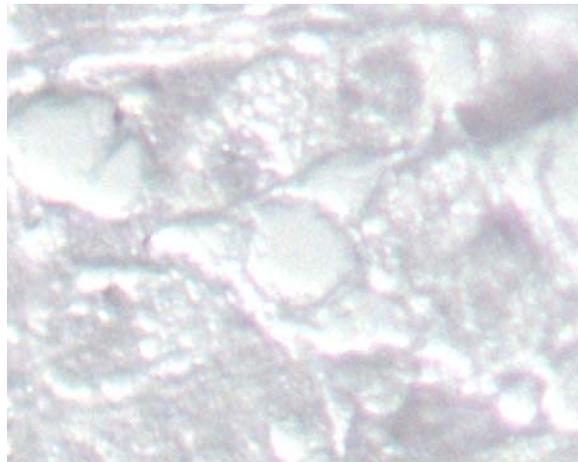


Abb. 32: In situ one step RT-PCR zur Lokalisation der Cox2-Expression im CL der Hündin am Tag 5 p.o.; *A) Probe (spezifische, zytoplasmatische Signale); B); Positivkontrolle (ohne DNase-Behandlung, starke nukleäre Signale); C) Negativkontrolle (ohne Primer, keine Signale).*
(nach Kowalewski et al., 2006b)

4.5 Expression der PGFS im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus

Untersuchungen zur Expression der PGFS erfolgten auf mRNA-Ebene mittels qualitativer RT-PCR. Da die spezifische canine Sequenz nicht vorlag, wurde zunächst die cDNA

isoliert, kloniert und sequenziert. Anschließend konnte die canine PGFS cDNA zum ersten Mal beschrieben und in die Gen-Bank eingetragen werden (s. Kap. 3.8.1).

Da ein Antikörper, der gegen PGFS gerichtet ist, weder kommerziell noch sonst wie zur Verfügung stand konnten Untersuchungen auf der Protein-Ebene nicht durchgeführt werden.

4.5.1 cDNA-Sequenz der caninen PGFS

Wie in Kap. 3.8.1 dargestellt, konnte die cDNA- Sequenz der caninen PGFS mittels 5'- 3'- RACE PCR erfolgreich kloniert werden. Sie besteht aus einer 5'-UTR, deren Länge etwa 144 Nukleotide beträgt und einem 975 bp langen offenem Leserahmen, der 325 Aminosäuren kodiert sowie einer 3'-UTR, die 317 Nukleotide umfasst.

Die cDNA ist in 11 Exonen organisiert. Der ORF befindet sich auf den Exonen 3 - 11 (Abb. 33).

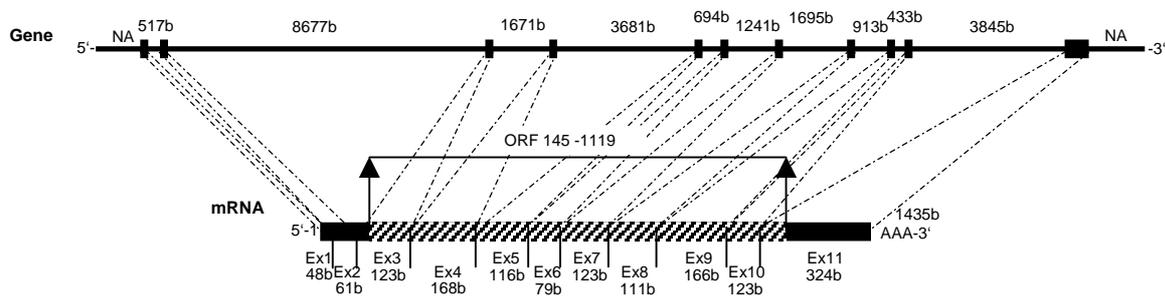


Abb. 33: Genomische Anordnung des caninen PGFS Gens. Die Größe von Exonen und Intronen sowie deren Lokalisation wurden aus der hundespezifischen genomischen Sequenz (Chromosom 2), Genbank Eintragsnummer: NW_876291.1, abgeleitet. Die kodierenden Exone (Ex) sind schraffierter Balken, die nicht-kodierenden Exone als schwarzer Balken und die Introne als dünne Linie gekennzeichnet: NA = nicht verfügbar.

Die genomische Lokalisation der klonierten cDNA erfolgte über einen Vergleich mit der spezifischen genomischen Sequenz des Hundes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/index.html>) mittels BLAST-Software. Dabei zeigte sich, dass 15 Sequenz-Fragmente auf dem Chromosom 2 gefunden wurden. 11 dieser Fragmente wiesen eine 100%ige Homologie mit der klonierten Sequenz auf. Sie entsprachen gleichzeitig den

bekannten 11 Exon-Homologen bei anderen Spezies. Die weiteren Sequenz-Fragmente waren zu 82 % - 92 % mit der klonierten Sequenz ähnlich und weisen somit auf eine mögliche Existenz von PGFS-Isoformen beim Hund hin.

4.5.2 Qualitative RT-PCR

Zu keinem Zeitpunkt im Diöstrus konnte die für die PGFS kodierende mRNA im CL nachgewiesen werden (Abb. 34). Nachdem das als Positivkontrolle dienende Housekeeping Gene GAPDH für jede Probe Amplifikate der gewünschten Länge gezeigt hatte, kann davon ausgegangen werden dass die mRNA-Integrität nach der Isolation aus dem Gewebe und während der Lagerung gewährleistet war.

Zur weiteren Überprüfung der Primer wurde als prospektive Positivkontrolle eine RT-PCR mit mRNA aus dem Uterus/Plazenta-Komplex gravider Hündinnen durchgeführt. Die Gewebeproben waren dazu während des präpartalen Abfall von Progesteron gewonnen worden³ (s. Kap. 3.8.1). Wie Abb. 35 zeigt ergaben sich als Nachweis der Expression der PGFS mRNA eindeutige Amplifikate mit der erwarteten Basenlänge von 77 bp, die parallel dazu von den gleichen Tieren gewonnenen CL gravidatis waren jedoch negativ.

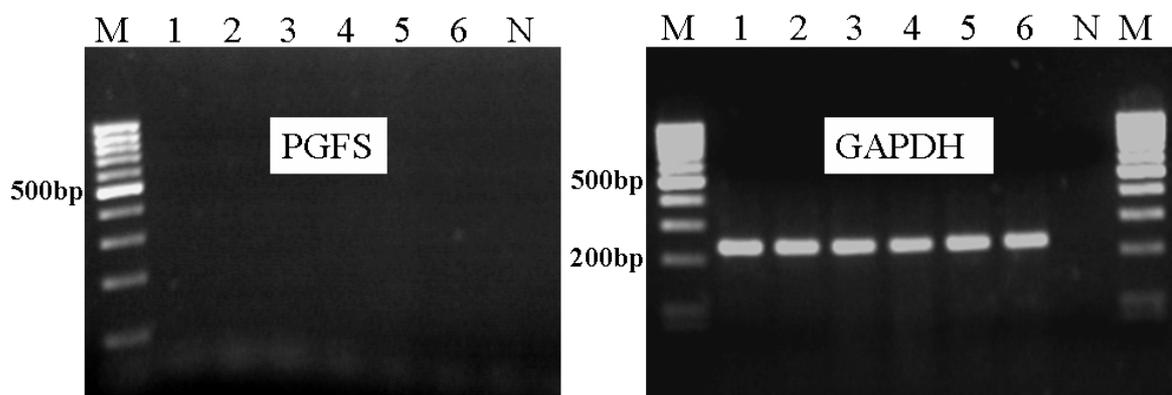


Abb. 34: Amplifikation der caninen PGFS- und GAPDH-mRNA im CL im Verlauf des Diöstrus: *N* = Negativkontrolle; *M* = 100 bp DNA-Marker; 1 - 6 = Proben: 1 = CL, Tag 5 p.o.; 2 = CL, Tag 15 p.o.; 3 = CL, Tag 25 p.o.; 4 = CL, Tag 35 p.o.; 5 = CL, Tag 45 p.o.; 6 = CL, Tag 65 p.o..

³ Versuchsgenehmigung Nr.: V 54-19c20-15 (1) GI 18/14-58/2003

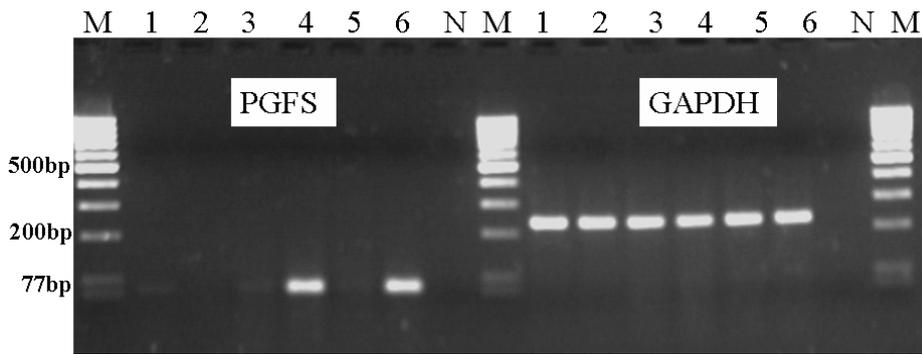


Abb. 35: Amplifikation der caninen PGFS- und GAPDH-mRNA im CL von graviden und nicht graviden Hündinnen und im Uterus/Plazenta-Komplex: *N = Negativkontrolle; M = 100 bp DNA-Marker; 1 - 6 = Proben: 1 = CL, Tag 5 p.o.; Diöstrus; 2 = CL, Tag 65 p.o.; Diöstrus; 3 = CL, Tag 58 der Gravidität; während des P4-Abfalls; 4 = Uterus/Plazenta-Komplex, Tag 58 der Gravidität; während des P4-Abfalls; 5 = CL, Tag 60 der Gravidität; während des P4-Abfalls; 6 = Uterus/Plazenta-Komplex, Tag 60 der Gravidität; während des P4-Abfalls.*

4.6 Expression der PGES im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus

Die Untersuchungen zur Expression der PGES- mRNA wurden mittels qualitativer und semiquantitativer Real Time RT-PCR durchgeführt.

Da auch hier kein spezifischer caniner Antikörper zur Verfügung stand, konnten die Untersuchungen auf Proteinebene nicht stattfinden.

4.6.1 Qualitative RT-PCR

Wie im Kap. 3.8.2 dargestellt, ergaben sich für die RT-PCR notwendigen Primer nachdem es gelungen war, die für PGES kodierende Sequenz zu klonieren.

Die Expression der PGES konnte in den CL zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden (Abb. 36).

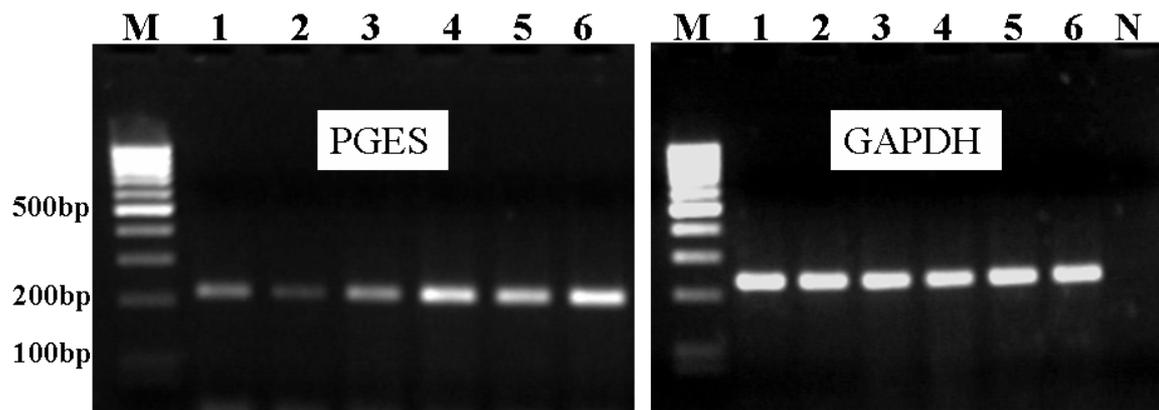


Abb. 36: Amplifikation der caninen PGES- und GAPDH-mRNA im Verlauf des Diöstrus: *N* = Negativkontrolle; *M* = 100 bp DNA-Marker; 1 - 6 = Proben: 1 = CL, Tag 5 p.o.; 2 = CL, Tag 15 p.o.; 3 = CL, Tag 25 p.o.; 4 = CL, Tag 35 p.o.; 5 = CL, Tag 45 p.o.; 6 = CL, Tag 65 p.o..

4.6.2 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Für die Expression der PGES- mRNA ergab sich mit $p = 0,0126$ (ANOVA) ein signifikanter Zeiteffekt im Verlauf des Diöstrus. Die höchste Expression wurde am Anfang der CL-Phase beobachtet (Tag 15 p.o.), der anschließende graduelle Abfall der Expression bis zum Tag 45 und 65 p.o. war signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 37).

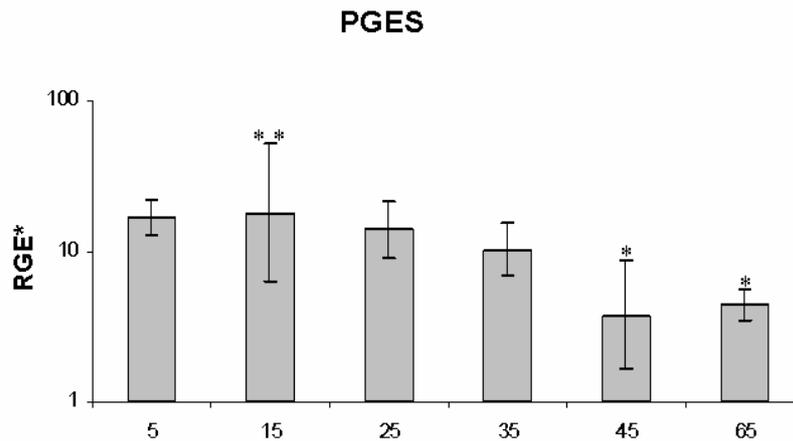


Abb. 37: Expression der PGES-mRNA mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR; *RGE** relative gene expression ($X_{gxD\pm 1}$); Säulen, die mit verschiedenen Sternen (*, **) gekennzeichnet sind unterscheiden sich mit $p \leq 0,05$; 5 - 65 = Tage p.o..

4.7 Expression des PGFR im CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus

Die Darstellung der Expression des PGFR erfolgte auf mRNA-Ebene mittels qualitativer und semiquantitativer Real Time RT-PCR. Es stand kein spezifischer caniner Antikörper zur Verfügung, der den Nachweis der Expression auf Proteinebene ermöglicht hätte.

4.7.1 Molekulares Klonieren

Wie im Kap. 3.8.3 gezeigt wurde, besteht die klonierte cDNA- Sequenz des unterstellten hundespezifischen ORF aus 1101 Nukleotiden, die für 367 Aminosäuren kodieren. Sie weist eine sehr hohe Homologie (82 % - 94 %) mit den bekannten ORF des PGFR bei anderen Tierarten, wie z.B. dem Rind (Sequenz Nr. D17395), Schwein (Sequenz Nr. AY043485) oder der Ratte (Sequenz Nr. U47287) auf.

4.7.2 Qualitative RT-PCR

Die RT-PCR verlief in allen Proben positiv; zu allen Untersuchungszeitpunkten konnten im caninen Luteingewebe Amplifikate mit der erwarteten Länge von 220 bp mittels Gelelektrophorese dargestellt werden (Abb. 38).

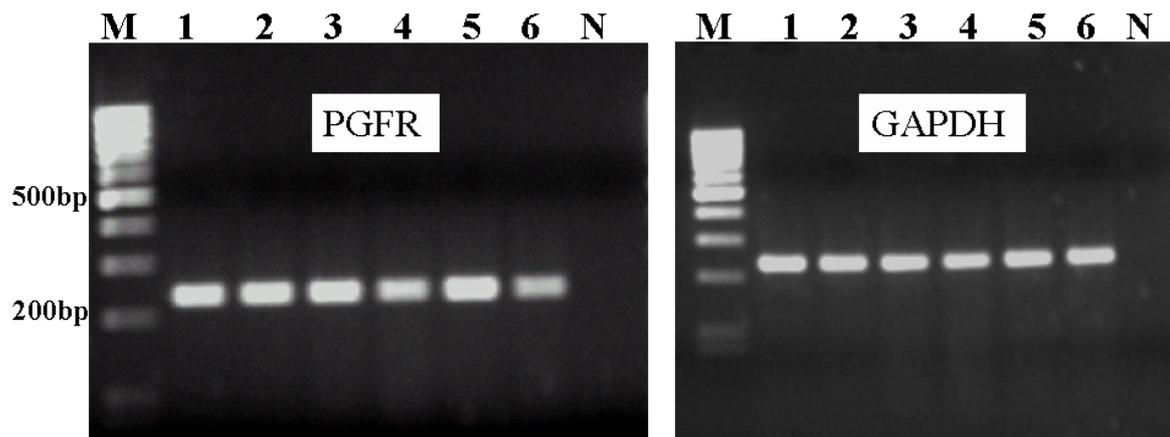


Abb. 38: Amplifikation der caninen PGFR- und GAPDH-mRNA im Verlauf des Diöstrus: *N* = Negativkontrolle; *M* = 100 bp DNA-Marker; 1 - 6 = Proben: 1 = CL, Tag 5 p.o.; 2 = CL, Tag 15 p.o.; 3 = CL, Tag 25 p.o.; 4 = CL, Tag 35 p.o.; 5 = CL, Tag 45 p.o.; 6 = CL, Tag 65 p.o..

4.7.3 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Es wurde ein signifikanter ($p = 0,032$) Zeiteffekt für die Expression der PGFR- mRNA im Verlauf des Diöstrus beobachtet. Die niedrigste Expression wurde am Anfang des Diöstrus am Tag 5 p.o. beobachtet. Danach zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der Expression bis zum Tag 25 p.o., danach blieb das Expressionsniveau bis zum Ende der Beobachtungsperiode konstant (Abb. 39).

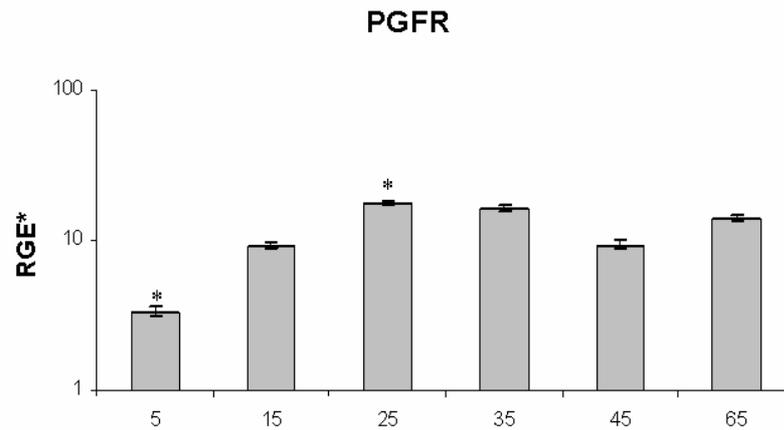


Abb. 39: Expression des PGFR mittels Real Time (TaqMan) RT-PCR: *RGE** relative gene expression ($X_{gxDf \pm 1}$); Säulen, die mit Sternen gekennzeichnet sind unterscheiden sich mit $p \leq 0,05$; 5 - 65 = Tage p.o.

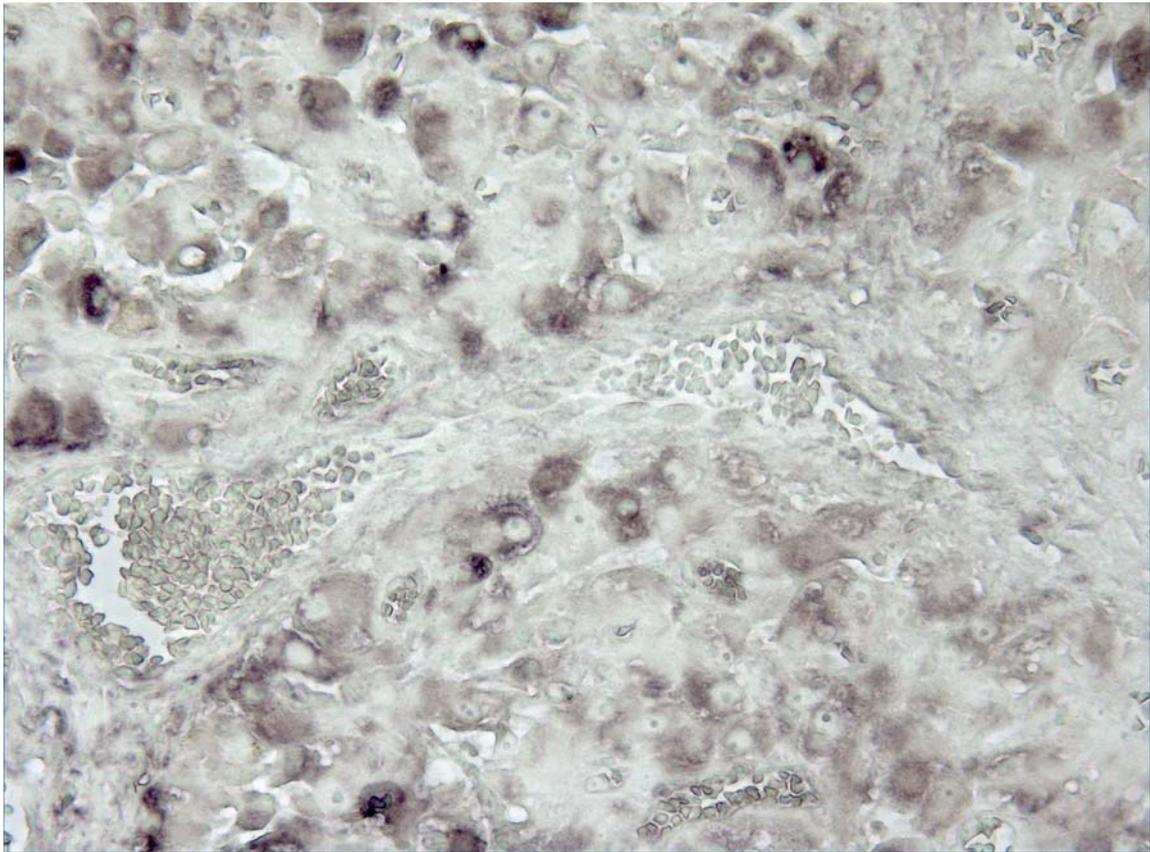
4.8 Lokalisation der Expression des PGFR im CL der Hündin während des Diöstrus

4.8.1 *In situ* Hybridisierung

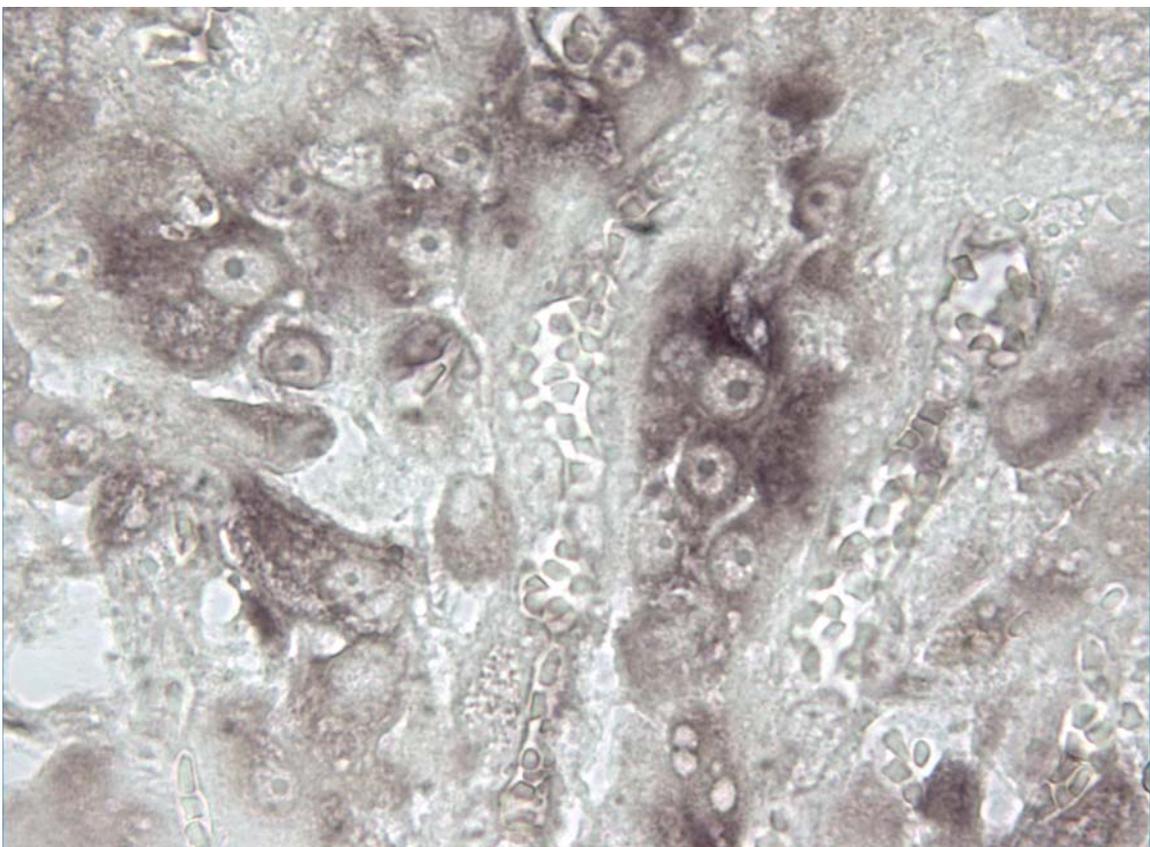
Mittels *in situ* Hybridisierung wurde die Expression des PGFR im Zytoplasma der Luteinzellen lokalisiert (Abb. 40 A, B).

Die Negativkontrollen, in denen die Sonde durch eine Sense-Dig-cRNA ersetzt wurde, blieben nahezu ungefärbt (Abb. 40 C).

A) 200-fache Vergrößerung



B) 400-fache Vergrößerung



C) Negativkontrolle; 100-fache Vergrößerung

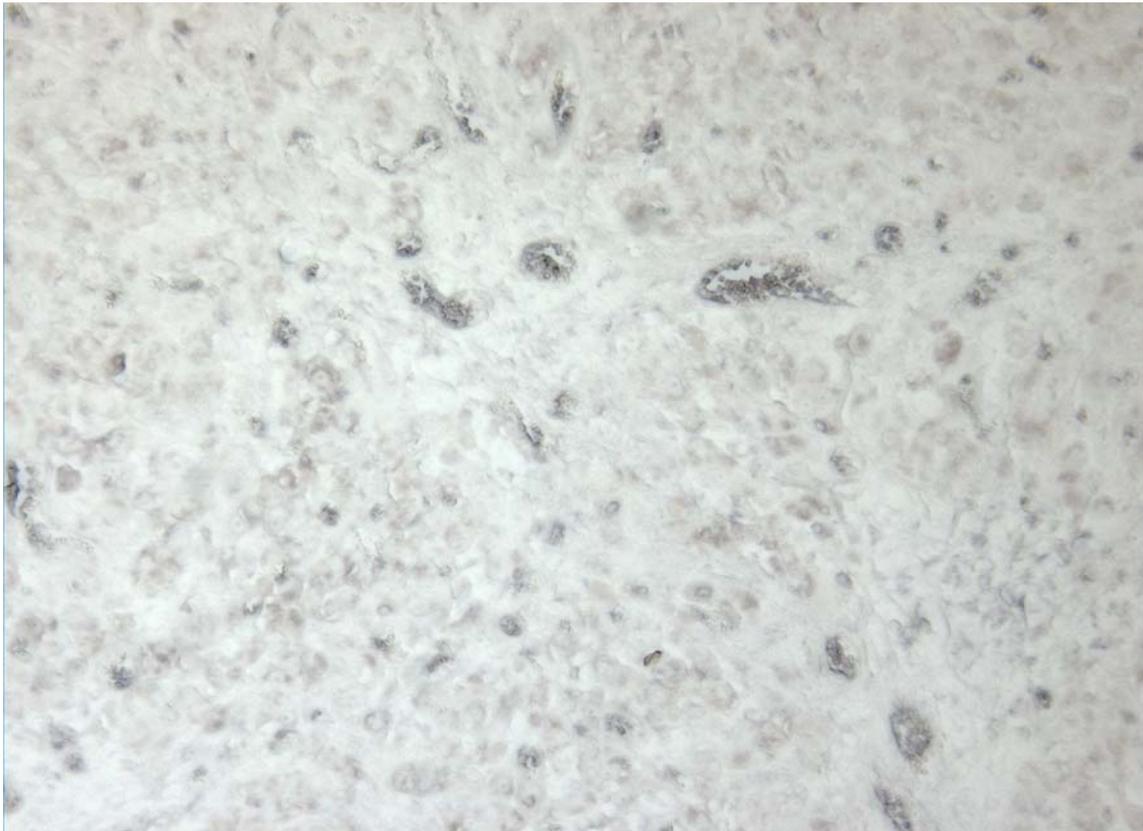


Abb. 40: In situ Hybridisierung zur Lokalisierung PGFR-spezifischer mRNA im CL der Hündin am Tag 5 p.o.. Spezifische Signale befinden sich im Zytoplasma der Luteinzellen. Die Zellkerne bleiben ungefärbt.

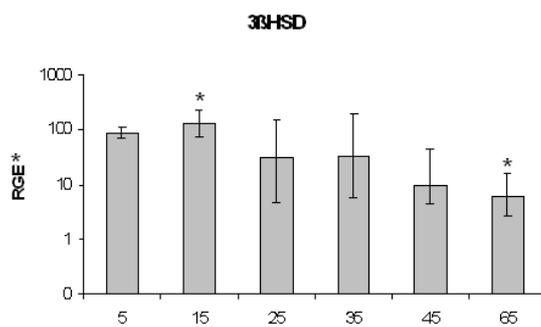
4.9 Schematische Übersicht der durchgeführten Untersuchungen

	Molekulares Klonieren	Nachweis der Expression		Lokalisation der Expression		
		Qualitative RT-PCR	Quantitative RT-PCR	IHC	In situ Hybridisierung	In situ RT-PCR
3βHSD	+	+	+	+	+	
Cox1	bekannt	+	+			
Cox2	bekannt	+	+	+		+
PGFS	+	+				
PGFR	+	+	+		+	
PGES	+	+	+			

4.10 Zusammenstellung der erhaltenen Ergebnisse

4.10.1 Steroidogenese

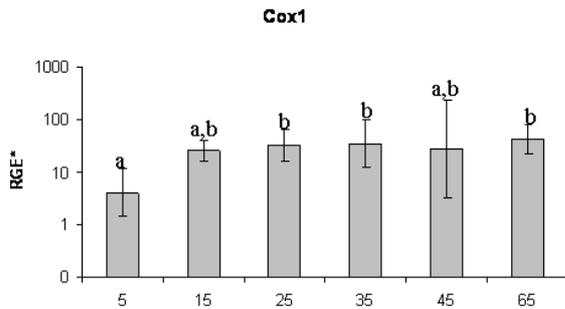
3 β HSD (Abb. 23; Kap. 4.1.3)



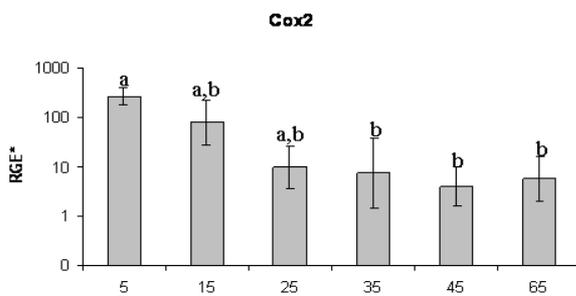
- Hohe Expression in der frühen CL-Phase (Tage 5 – 15), gradueller, signifikanter Abfall bis zum Tag 65 p.o..
- Lokalisation: Luteinzellen.

4.10.2 Prostaglandin-System

Cox1, Cox2 (Abb. 29-30; Kap. 4.3.2)

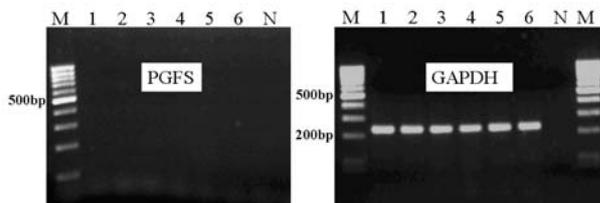


- Niedrigste Expression in der frühen CL-Phase (Tag 5), signifikanter Anstieg bis zum Tag 25, konstante Expression danach.

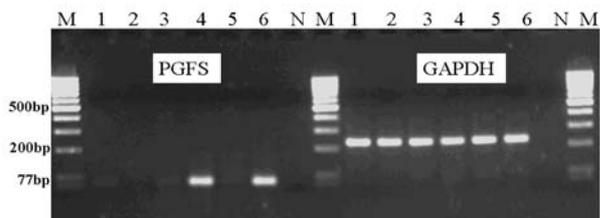


- Höchste Expression am Tag 5, danach signifikanter Abfall bis zum Tag 25, keine weiteren Veränderungen bis Tag 65 p.o..
- Lokalisation: Luteinzellen.

PGFS (Abb. 34-35; Kap. 4.5.2)

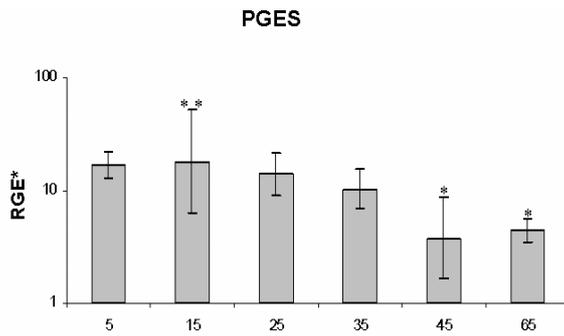


- Nicht nachweisbar mittels RT-PCR zu keinem Zeitpunkt im Diöstrus.



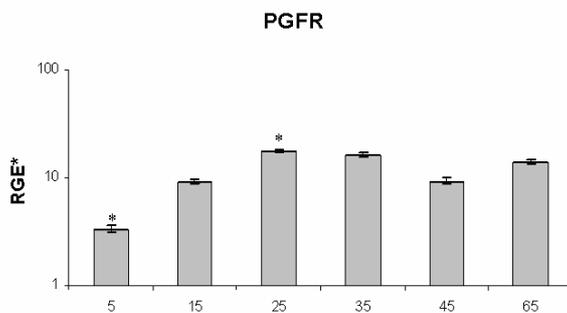
- Nachweisbar in dem Uterus/Plazenta-Komplex, nicht jedoch in den CL graviditatis.

PGES (Abb. 37; Kap. 4.6.2)



- Höchste Expression am Anfang der CL-Phase (Tag 15), danach signifikanter Abfall bis zum Tag 45 – 65.

PGFR (Abb. 39; Kap. 4.7.2)



- Niedrigste Expression am Anfang des Diöstrus (Tag 5), signifikanter Anstieg bis zum Tag 25; konstante Expression danach.
 - Lokalisation: Luteinzellen.

5 DISKUSSION

5.1 Versuchsaufbau

Im Hinblick auf die Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen, die einen identischen Progesteronverlauf bei den intakten und hysterektomierten Tieren ergaben und damit das Vorhandensein eines Luteolysins (Prostaglandin F_{2α}; PGF_{2α}) uterinen Ursprungs beim Hund ausgeschlossen haben (Hoffmann et al., 1992), lag der vorliegenden Arbeit die Hypothese zugrunde, dass lokal im CL produzierte und zur Gruppe der Prostaglandine gehörende Regelfaktoren an der lutealen Regression bei Hündin beteiligt sein könnten.

Diese Hypothese beruht u.a. darauf, dass bei anderen Spezies, wie z.B. Ratte, Kaninchen, Schwein, Schaf, Rind, Pferd und Mensch (Wiltbank und Ottorobe, 2003) über die luteale Prostaglandin-Produktion und deren Beteiligung an der Steuerung der CL- Funktion berichtet wurde. Auch die beim Hund gemachten Beobachtungen weisen auf eine mögliche Bedeutung von PGF_{2α} als luteolytischer Faktor hin. So wurde ein unmittelbarer präpartaller PGF_{2α}-Anstieg parallel zur Luteolyse beschrieben (Nohr et al., 1993b). Auch bei graviden und nich-graviden Hündinnen kann man mit exogen verabreichtem PGF_{2α} eine Luteolyse induzieren (Romagnoli et al., 1991; Übersicht bei Riesenbeck, 1997)

Inwieweit die zu der Gruppe der Prostaglandine gehörenden Wirkstoffe im CL der Hündin während des Diöstrus gebildet werden und dort eine para/autokrine Funktion ausüben, war jedoch bis dato nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Frage durch die Erfassung der Expression des Schlüsselenzyms der Prostaglandinsynthese, der Cyclooxygenase (Cox1 und Cox2) sowie der Prostaglandin F- und E-Synthase (PGFS, PGES) und des Prostaglandin F Rezeptors (PGFR) nachgegangen.

Die Untersuchungen wurden mit CL von Hündinnen durchgeführt, die zu definierten Zeitpunkten in der frühen, mittleren und späten Lutealphase (Tage 5, 15, 25, 35, 45, 65 nach der Ovulation, p.o.) ovariohysterektomiert worden waren.

In Ergänzung dazu wurden die Untersuchungen zur Erfassung der 3βHSD durchgeführt. Diesen Untersuchungen lag die Überlegung zugrunde, dass die Expression dieses Schlüsselenzyms der Steroidbiosynthese einerseits als Parameter zur Charakterisierung des Funktionszustandes der Luteinzellen herangezogen werden kann, darüberhinausgehend

möglicherweise aber auch den Endpunkt einer die Progesteronsekretion kontrollierenden Reaktionskaskade darstellt, an der u.a. auch Eicosanoide beteiligt sein können.

5.2 Methoden

5.2.1 *In vitro RT-PCR, RACE PCR und semiquantitative TaqMan PCR*

Die *in vitro* RT-PCR gehört heutzutage zu den molekularbiologischen Routinemethoden. Bei ihrer hohen Sensitivität stellt sie ein qualitatives Verfahren dar.

Die Primersequenzen, die für die Amplifikation von GAPDH, Cox1 und Cox2 angesetzt wurden, wurden aus den bekannten hundespezifischen Sequenzen in der Genbank entnommen. Dies waren:

- GAPDH AB038240
- Cox1 AF535139
- Cox2 AY044905

Die canine 3 β HSD-, PGFS-, PGES- und PGFR- Sequenzen waren bisher nicht bekannt. Um die Expression der Gene im CL zu untersuchen, mussten die Sequenzen zunächst ermittelt werden.

Zur Klonierung der 3 β HSD und PGFS- Sequenzen wurde die **Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) PCR** herangezogen. RACE stellt eine molekularbiologische Methode dar, mit der es möglich ist, anhand eines bekannten kurzen Fragments einer Gensequenz die fehlenden 3'- und 5'- cDNA- Fragmente der Sequenz zu ermitteln (Kap. 3.7.1). Die daraus resultierenden Sequenzen wurden anschließend in die Genbank eingetragen:

- 3 β HSD AY739720: Canis familiaris 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA, complete cDNA
- PGFS AY875970: Canis familiaris prostaglandin F synthase (PGFS) mRNA, complete cds

Zur Klonierung der PGES- und PGFR- Sequenzen wurde ein so genanntes „homology cloning“ durchgeführt. Dabei erfolgte ein Abgleich (Alignment) der bekannten Sequenzen

von anderen Spezies mit dem ebenfalls bekannten caninen Genom. Aus diesem Vergleich konnten die hundespezifischen Sequenzen abgeleitet und im Genom lokalisiert werden. Der Vergleich wurde *online* mittels BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kap. 3.8.2 und 3.8.3). Die ermittelte PGFR- Sequenz, sowie die zwischenzeitlich mittels RACE PCR amplifizierte gesamte cDNA- Sequenz der PGES (siehe Kap. 3.8.2: Seite 62-63), wurden anschließend in die Genbank eingetragen:

- PGFR DQ138060: Canis familiaris prostaglandin F2-alpha receptor (PGFR), mRNA eingetragen
- PGES EF063141: Canis familiaris prostaglandin E synthase (PGES) mRNA, complete cds

Um eine eventuelle Fälschung der Ergebnisse, die aus der Amplifikation der genomischen DNA resultieren könnte, auszuschließen, wurde vor jeder RT-PCR eine DNase-Behandlung der mRNA durchgeführt (Kap. 3.3.2). Weiterhin wurde zur Überprüfung der Integrität der mRNA bei jeder PCR eine Positivkontrolle mit dem Housekeeping Gene-GAPDH (1,3- Diphosphoglycerat) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente DEPC-Wasser, das anstelle der RNA für die DNase-Behandlung eingesetzt und bis zur Amplifikation wie eine reguläre Probe behandelt wurde. Somit konnten ggf. RNA- und DNA-Kontaminationen von Substrat und Lösungen erkannt und ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch eine Sequenzierung, die von der Firma SRD-Scientific Research and Development GmbH (Oberursel) durchgeführt wurde, bestätigt.

Um ein Expressionsmuster der untersuchten Gene im Verlauf des Diöstrus zu erstellen, wurde die Real Time PCR durchgeführt. Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar. In vorliegender Arbeit erfolgte die relative quantitative Real Time PCR mittels des TaqMan Sonden Verfahrens, das im Vergleich zu anderen Real Time Methoden, wie die Sybr Green- Methode, durch eine höhere Spezifität gekennzeichnet ist. Der einzige Nachteil der Methode liegt in ihrem höheren finanziellen Aufwand, der durch die relativ hohen Kosten der Synthese und Markierung der TaqMan- Sonden verursacht wird.

5.2.2 *Immunhistochemie (IHC)*

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Darstellung der Lokalisation der Expression von Cox2 und 3 β HSD auf Proteinebene mittels Immunhistochemie. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von für die Anwendung beim Hund geeigneter Antikörper war es nicht möglich, die Untersuchungen mittels IHC auf die anderen Parameter (Cox1, PGFS, PGFR, PGES) auszudehnen.

Die IHC-Methode liefert lediglich die Möglichkeit der qualitativen Beurteilung der Expression, eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes, ist hier nicht gegeben. Dennoch möglich ist eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse, und zwar indem der Anteil der das Protein exprimierender Zellen bestimmt wird.

Bei der Durchführung des immunhistochemischen Nachweises wurden für jeden Versuch parallel die so genannten „Isotypenkontrollen“ durchgeführt. Dazu wurde bei den Untersuchungen zur Erfassung der Cox2 jeweils ein Schnitt nicht mit dem antigenspezifischen Primärantikörper sondern mit einem so genannten „nonsens“ Antikörper des gleichen Isotyps, der gegen ein beim Hund nicht vorkommende Antigen gerichtet ist, überschichtet. Im Falle der 3 β HSD wurden die Kontrollschnitte mit dem Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens inkubiert; die gewählte Verdünnung entsprach der des eigentlichen Immunserums. Bei einem negativen Ergebnis konnte ausgeschlossen werden, dass die nach der Verwendung des Primärantikörpers/Immunserums beobachtete Farbreaktion durch dessen Bindung an ein nicht spezifisches Protein hervorgerufen wurde. Eine weitere Kontrolle bestand darin zu prüfen, ob das Detektionssystem, also sekundärer Antikörper und ABC-System, ein unspezifisches Signal erzeugen. Hierfür wurden die Schnitte in den Vorversuchen ohne den 1. Antikörper inkubiert. Die erhaltenen negativen Ergebnisse bestätigten die Spezifität der Immunreaktion.

Bei dem Klon 33 BD Pharmingen handelt es sich um einen murinen Antikörper, welcher das Epitop mit den Aminosäuren 368-604 des C-Terminus der Cox2 der Ratte erkennt (Shiotani et al., 2001); diese hochkonservierte Sequenz stimmt zu 87 % mit der caninen Sequenz überein (Genbank Eintragsnummer AAK97783). Der Antikörper wurde auch bei Mensch (Marrogi et al., 2000) und Maus (Giroux and Descoteaux, 2000) zur Detektion von Cox2 mittels IHC und Western Blot verwendet.

Bei dem anti-3 β HSD- Antikörper handelte es sich um ein nicht-kommerzielles Kaninchens Immunserum, das gegen dem Typ I (plazentär) der humanen 3 β HSD gerichtet ist. Das

Immunserum zeigte nach Untersuchungen von Lorence et al. (1990) sowie in den eigenen Untersuchungen (Kowalewski et al., 2006a) mittels Western Blot eine spezifische Bindung an das native Protein in den Homogenaten aus dem caninen CL und muriner Nebenniere, sowie an das rekombinante humane und canine Protein.

5.2.3 *In situ RT-PCR und in situ Hybridisierung*

Die *in situ* one-step RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode, bei der während der one-step RT-PCR in die Amplifikate DIG-markierte UTPs eingebaut und anschließend detektiert werden. Sie verbindet die Empfindlichkeit einer herkömmlichen PCR mit dem Vorteil der *in situ* Hybridisierung und erlaubt die genaue Lokalisation der Expression von mRNA auf zellulärer Ebene.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die ISH und später die *in situ* one-step RT-PCR zur Lokalisation der Cox2 im CL verwendet. Dabei ergaben die Vorversuche mittels ISH keine positiven Signale, während solche nach Anwendung der *in situ* one-step RT-PCR erhalten wurden. Daraus u.a. wurde geschlossen, dass die relativ neue Methode der *in situ* RT-PCR (Song et al., 2004) gegenüber der ISH eine höhere Sensitivität besitzt. Die Lokalisierung der 3 β HSD erfolgte auf mRNA- Ebene mittels ISH.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 *Prostaglandin- System*

In der vorliegenden Arbeit wurde der Expression des Prostaglandinsystems durch die Erfassung der Expression der Cox1, Cox2, PGES, PGFS und PGFR nachgegangen.

Den Cyclooxygenasen kommt eine limitierende Rolle im Prostaglandinstoffwechsel zu. Sie katalisieren die Umsetzung der Arachidonsäure in PGH₂ und PGG₂ (Kap. 2.7.1.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Cox1 und -2 auf mRNA-Ebene, mittels qualitativer und semiquantitativer RT-PCR untersucht, wobei die konventionelle RT-PCR die Expression beider Enzyme zu allen Untersuchungszeitpunkten im Diöstrus nachgewies.

Der mehr oder weniger gleich bleibende Verlauf der Expression von Cox 1 im Diöstrus des Hundes (Kap. 4.3.2 und 4.10.2) lässt die Aussage zu, dass es sich offensichtlich um ein „Housekeeping Gene“ handelt. Die erniedrigte Expression des Enzyms am Tag 5 p.o. fällt mit der sehr hohen Expression der Cox 2 zum selben Zeitpunkt zusammen, so dass zumindest am Beginn des Diöstrus von einem Shift in der Bereitstellung von Enzymen zugunsten Cox2 auszugehen ist.

Für die Cox2 wurde die maximale Expression am Tag 5 p.o. gemessen. Sie sank danach deutlich ab ($p \leq 0,05$), am Tag 15 p.o. wurde nur noch weniger als die Hälfte der Ausgangskonzentration detektiert; ab Tag 25 p.o. blieben die Werte in unterem Messbereich und es wurden keine weiteren statistisch signifikanten Veränderungen der Expression bis zum Ende der Beobachtungsperiode festgestellt. Ein ähnliches Cox2-Expressionsprofil wurde im CL zyklischer Kühe beschrieben (Kobayashi et al., 2002). Auch hier wurde die höchste Cox2-mRNA Expression in der frühen CL-Phase beobachtet.

Die Ergebnisse der Real Time PCR spiegeln sich auf der Proteinebene wider. So wurden auch mittels IHC die stärksten Signale zu Beginn der CL-Phase beobachtet. Danach nahm die Anzahl positiv gefärbter Zellen ab, ab dem Tag 25 p.o. wurden keine Positivreaktionen im CL des Hundes mehr detektiert. Die Tatsache, dass mittels RT-PCR durchwegs positive Ergebnisse erzielt wurden ist wahrscheinlich auf die geringere Sensitivität der IHC zurückzuführen. In Bezug auf die Lokalisation der Expression der Cox2 wurden die Ergebnisse der IHC auf der mRNA-Ebene mittels in situ RT-PCR bestätigt; auch hier wurden die Signale in den Luteinzellen im Zeitraum von Tag 5 bis Tag 15 p.o. gefunden. Dies weist darauf hin, dass sowohl Transkription als auch Translation der Gene in denselben Zellen stattfinden. Die erhöhte Verfügbarkeit von Cox2 fällt in die Phase der sich noch entwickelnden CL woraus geschlossen werden könnte, dass den in dieser Zeit vermehrt verfügbaren Prostaglandinen eine luteotrope Wirkung zukommt. Ähnliche Beobachtungen wurden beim Rind von Arosh et al. (2004) gemacht.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression der Cox2 und der Expression der luteotropen Prostaglandine in der frühen Lutealphase festzustellen, wurde die Expression der PGE-Synthase im Verlauf des Diöstrus untersucht.

Mit Hilfe der qualitativen RT-PCR war die mRNA der PGES zu allen Untersuchungszeitpunkten nachweisbar (4.6.1). Die Real Time PCR zeigte die höchste Expression der PGES im CL zu Beginn des Diöstrus (Tag 5 und 15 p.o.). Ein Abfall der Expression wurde während der lutealen Regression beobachtet (Kap. 4.6.2), der Zeiteffekt

war hoch-signifikant ($p \leq 0,0126$). Somit konnte eine positive Korrelation zwischen der Expression der PGES und der der Cox2 im Verlauf des Diöstrus gezeigt werden. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass beim Hund, ähnlich wie beim Rind, Schaf und Schwein (Fitz et al., 1984; Shelton et al., 1990; Patek und Watson, 1983), dem PGE₂ eine luteotrope Rolle zukommt.

Die der vermehrten Expression von Cox2 zugrunde liegenden Mechanismen können derzeit nur spekulativ vermutet werden.

Ähnlich wie bei Rind, Ratte und Primaten könnte z.B. in der frühen CL-Phase die Cox2- Expression durch VEGF und Fibroblast Growth Factor (FGF) stimuliert werden (Phillips et al., 1990; Redmer et al., 2001; Rowe et al., 2002). Auch könnte die Aufregulation der Cox2- Expression zu Beginn der CL-Phase im Zusammenhang stehen mit den von Büsges (2003) und Hoffmann et al. (2004a) am Tag 15 p.o. beobachteten erhöhten Mengen an CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten und Makrophagen im CL der Hündin; Beobachtungen von Tag 5 liegen leider nicht vor. Allerdings liegen derzeit keine Erkenntnisse vor, inwieweit diese Immunzellen bzw. die von ihnen sezernierten Zytokine (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α und TGF- β ; Engel et al., 2005) an der Aufregulierung von Cox2 beteiligt sind. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch z.B. bei Maus gezeigt werden, wo die Behandlung von Mastzellen mit IL-10 die Cox2- Expression induzierte (Murakami et al., 1995).

Anders als für die PGES konnte die Expression der PGFS im CL der Hündin zu keinem Zeitpunkt im Diöstrus mittels qualitativer RT-PCR nachgewiesen werden (Kap. 4.5.2). Dass es sich hier um eine echte Beobachtung handelt konnte zunächst dadurch bestätigt werden, dass die mit GAPDH durchgeführten Positivkontrollen die zu erwarteten PCR- Produkte ergaben und damit die Integrität der isolierten RNA bestätigten. Weiterhin zeigte sich bei Verwendung von Gewebeproben aus dem Plazenta/Uterus-Komplex, die während des präpartalen Abfalls von Progesteron gewonnen worden waren, bei Anwendung der gleichen Methode eine deutliche Expression der PGFS (s. Kap. 3.8.1), die parallel dazu von den gleichen Tieren gewonnenen CL gravidatis waren jedoch negativ (Abb. 35). Das weist darauf hin, dass die PGFS im CL der Hündin entweder nicht exprimiert wird, oder die qualitative RT-PCR nicht in der Lage war, die seltenen Transkripte nachzuweisen.

Aufbauend auf den mit dem Uterus/Plazenta-Komplex erhaltenen Amplifikaten konnte das Verfahren der RACE PCR angewendet und die Sequenz der caninen PGFS kloniert werden

(s. Kap. 3.8.1). Diese weist eine sehr hohe Homologie von 82 bis 89 % mit den bekannten PGFS-Sequenzen anderer Spezies auf. Beim Vergleich der klonierten Sequenz mit der *online* verfügbaren hundespezifischen genomischen Sequenz, der mittels BLAST-Software durchgeführt wurde, wurden neben den bekannten und auf Chromosom 2 liegenden 11 Exon-Homologen, die eine 100%ige Homologie mit der klonierten Sequenz aufwiesen, vier weitere Sequenz-Fragmente auf dem Chromosom 2 gefunden, die mit der klonierten caninen Sequenz zu 82 bis 90 % übereinstimmten. Dies weist auf eine mögliche Existenz von weiteren PGFS-Isoformen beim Hund hin, wie sie z.B. auch beim Rind bekannt sind (Madore et al., 2003) (Kap. 2.7.1.2).

Für den PGFR wurde die mRNA-Expression zu allen Untersuchungszeitpunkten im Verlauf der CL-Phase nachgewiesen, wobei sich ein hoch-signifikanter ($p \leq 0,032$) Zeiteffekt ergab. Die Real Time PCR zeigte die niedrigste Expression zu Beginn des Diöstrus (Tag 5 p.o.); ab Tag 25 p.o. bis zum Ende der Beobachtungsperiode (Tag 65 p.o.) wurden keine weiteren Unterschiede in der Expression beobachtet (Kap. 4.7.3). Somit scheint der PGFR in dem caninen CL im Verlauf des Diöstrus konstitutiv exprimiert zu sein, was die dosisabhängige Empfänglichkeit des CL gegenüber dem exogen verabreichten $\text{PGF}_2\alpha$ erklären würde (Romagnoli et al., 1991; Hubler et al., 1991; Watts et al., 2001).

Aus den durchgeführten Untersuchungen und der fehlenden Expression von PGFS im CL der Hündin ergibt sich jedoch, dass das canine CL nicht in der Lage ist $\text{PGF}_2\alpha$ direkt aus PGH_2 via PGFS zu produzieren. Eventuellen alternativen Synthesewegen von $\text{PGF}_2\alpha$ aus PGE_2 und PGD_2 durch die 9- und 11-Ketoreduktasen, wie sie u.a. beim Rind nachgewiesen wurden (Madore et al., 2003), wird derzeit durch entsprechende Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe nachgegangen.

Die mRNA-Expression des PGFR des Hundes wurde mittels in situ Hybridisierung ausschließlich in den Luteinzellen lokalisiert. Dies entspricht den Beobachtungen von Bonyaprakob et al. (2003b); hier wurde der PGFR beim Schwein ebenfalls ausschließlich in den Luteinzellen vorgefunden. Dieser Befund weist darauf hin, dass beim Hund die Luteinzellen das einzige Target für $\text{PGF}_2\alpha$ darstellen. Somit wurde gezeigt, dass bei dieser Spezies $\text{PGF}_2\alpha$ in der Lage ist, direkt auf die Luteinzellen einzuwirken. Eine potenzielle,

indirekte luteolytische Einwirkung des $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf das CL durch den in den Endothelzellen lokalisierten PGFR, wie sie beim Rind gezeigt wurde (Mamluk et al., 1998; Niswender et al., 2000), ist beim Hund aufgrund der mangelnden PGFR-mRNA-Expression in den Endothelzellen nicht zu vermuten.

5.3.2 Expression der $3\beta\text{HSD}$

Die canine $3\beta\text{HSD}$ zeigt eine hohe Homologie mit den Sequenzen vom Rind, Pferd, Schwein und Mensch, die zwischen 79 - 86 % beträgt. Das beweist, dass das Enzym sehr hoch zwischen verschiedenen Spezies im Laufe der Evolution konserviert wurde. Verschiedene Isoformen des Enzyms wurden bei Maus, Mensch und anderen Säugetier-Spezies beschrieben (Mason et al., 2004). Alle Isoformen werden von verschiedenen Genen kodiert und weisen eine sehr hohe Homologie untereinander auf (mehr als > 90 %). Splicevarianten sind bis jetzt nicht beschrieben worden (Abbaszade et al., 1997; Bain et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde die klonierte canine Sequenz mittels der BLAST Software mit der online verfügbaren gesamten caninen genomischen Sequenz verglichen. Die $3\beta\text{HSD}$ wurde auf Chromosom 17 lokalisiert. Hinweise auf eventuelle Isoformen ergaben sich nicht. Daher wird anhand der vorliegenden Ergebnisse vermutet, dass es sich bei der klonierten Sequenz um die einzige Form der caninen $3\beta\text{HSD}$ handelt. Eine endgültige Aussage bezüglich des Vorhandenseins von möglichen Isoformen kann jedoch nicht getroffen werden, da es möglich ist, dass bis jetzt nicht bekannte Isoformen existieren, die aus dem alternativen Splicing resultieren könnten. Möglich wäre auch, dass die Homologie mit den anderen Isoformen sehr niedrig ist, so dass eine Erkennung mittels BLAST nicht möglich war. Dies ist jedoch aufgrund der sehr hohen Homologie der bis jetzt bekannten Varianten der $3\beta\text{HSD}$ bei anderen Spezies eher unwahrscheinlich.

Wie zu erwarten, korreliert die Expression der $3\beta\text{HSD}$ im CL der Hündin mit der Progesteron-Konzentration im peripheren Blut positiv. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene waren die stärksten Signale am Anfang der CL-Phase vorhanden. Der sich anschließende Abfall der Expression bis zum Ende der Beobachtungsperiode entsprach der sinkenden Progesteronproduktion am Ende des Diöstrus.

Nishiyama et al. (1999) haben in den CL der trächtigen Hündinnen stärkere Signale in den Randfeldern der CL als in den mittleren Feldern beobachtet. In der vorliegenden Arbeit bei Verwendung des gleichen Antikörper zeigte sich für die CL der nicht-trächtigen Hündinnen jedoch ein gleichmäßiges Verteilungsmuster. Da diese unterschiedlichen Ergebnisse mit dem gleichen Antikörper erzielt wurden, könnte möglicherweise auf verschiedene 3 β HSD- Expressionsmuster bei den graviden und nicht-graviden Hündinnen geschlossen werden. Möglich wäre jedoch auch, dass es sich um methoden-bedingte Unterschiede handelt, wie Fixierung des Gewebes oder die Sensitivität des angewandten IHC- Nachweises.

Die Verfügbarkeit der gesamten caninen 3 β HSD-Sequenz bietet nun die Möglichkeit, weitere detaillierte Untersuchungen zur gewebeabhängigen Expression und Aktivität der 3 β HSD beim Hund durchzuführen. Dies betrifft insbesondere den präovulatorischen Progesteron-Anstieg und die Phase der gonadotropen Unabhängigkeit des caninen CL am Anfang des Diöstrus.

5.4 Weiterführende Untersuchungen

Parallel zur Abfassung der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen weitergeführt. Dabei wurde der Frage nach Lokalisation der Expression von PGES-mRNA, sowie nach der Expression und Lokalisation ihrer Rezeptoren EP1-EP4 im CL der Hündin während des Diöstrus nachgegangen (Kowalewski et al., nicht publiziert).

Die dafür benötigten Primer wurden aus den hundespezifischen Sequenzen, verfügbar über die Genbank, abgeleitet; dies waren: AF266477 für EP1, NM_001003170 für EP2, AY333179 für EP3 und NM_001003054 für EP4. Um das Expressionsprofil der Rezeptoren im Verlauf des Diöstrus zu ermitteln wurde die Real Time (TaqMan) PCR durchgeführt; die Lokalisation erfolgte mittels ISH.

In der semiquantitativen Real Time PCR war der Expressionsverlauf von EP2 dem von Cox2 und PGES ähnlich. So wurde eine hohe Expression zu Beginn der CL-Phase am Tag 5 nach der Ovulation beobachtet, der anschließende graduelle Abfall der Expression bis zum Tag 45 p.o. war signifikant ($p < 0,05$). Der EP4 zeigte eine konstante mRNA-Expression, es konnten keine Zyklusbezogenheiten festgestellt werden.

Mehr negative als positive Ergebnisse wurden mittels qualitativer RT-PCR für die Expression des EP1 beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von EP1 entweder auf einem sehr niedrigen Niveau verläuft, oder nicht vorhanden ist. Zu keinem der Untersuchungszeitpunkte konnte die Expression von EP3 im CL festgestellt werden (Kowalewski et al., nicht publiziert).

Mittelst ISH wurde die Expression von PGES, EP2 und EP4 ausschließlich in den Luteinzellen lokalisiert.

Die durchgeführten Untersuchungen haben eine Kolokalisation der PGES sowie deren Rezeptoren EP2, EP4 und der Cox2 in den Luteinzellen gezeigt, was auf eine autokrine Funktion des PGE-Systems hindeutet.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Anders als bei landwirtschaftlichen Nutztieren wird beim nicht graviden Hund die Rückbildung der CL nicht durch ein endokrin wirksames Luteolysin uterinen Ursprungs, d.h. PGF 2α , verursacht. Bei der graviden Hündin dagegen weist der parallel zur präpartalen Luteolyse auftretende PGF 2α -Anstieg möglicherweise auf einen funktionalen Zusammenhang hin, was in Übereinstimmung stehen würde mit der Beobachtung, dass mit PGF 2α bei entsprechenden Dosierungen bei graviden Hündinnen eine Luteolyse und damit ein Abort induziert werden kann.

In vorliegenden Untersuchungen wurde daher der Frage nachgegangen, ob beim Hund in den CL produzierte Prostaglandine (PG) als parakrine und/oder autokrine Regelfaktoren eine Rolle bei der Rückbildung zyklischer CL spielen können. Dazu wurde die luteale Expression des Schlüsselenzyms der PG-Synthese, der Cyclooxygenase 1 und -2 (Cox1, Cox2) sowie die Expression der Prostaglandin F 2α - und Prostaglandin E 2 -Synthase (PGFS und PGES) und des Prostaglandin F 2α - Rezeptor (PGFR) in definierten Stadien der Lutealphase (Tage 5, 15, 25, 35, 45 und 65 post ovulationem) charakterisiert.

Den in Ergänzung dazu durchgeführten Untersuchungen zur Erfassung der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β HSD) lag die Überlegung zugrunde, dass die Expression dieses Schlüsselenzyms der Steroidbiosynthese einmal als Parameter zur Charakterisierung des Funktionszustandes der Luteinzellen herangezogen werden kann, darüberhinausgehend möglicherweise aber auch den Endpunkt einer die Progesteronsekretion kontrollierenden Reaktionskaskade darstellt, an der u.a. auch Eicosanoide beteiligt sein können.

Die Untersuchungen zur Expression von Cox 1 und -2 erfolgten auf mRNA-Ebene mittels qualitativer und quantitativer RT-PCR. Die Lokalisation der Cox2 erfolgte auf mRNA -Ebene mittels in situ one-step RT-PCR und auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) mit einem monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen die Cox2 der Ratte (IgG1, Klon 33, BD Pharmingen).

Da die hundespezifischen Sequenzen von PGFS, PGES, PGFR und 3 β HSD bislang nicht bekannt waren, mussten zur Darstellung der Expression der Gene im Verlauf des Diöstrus diese zunächst kloniert und sequenziert werden, was mittels der SMART RACE PCR und des so genannten „homology cloning“ durchgeführt wurde. Die ermittelten Sequenzen wurden anschließend in die Genbank mit den Eintragsnummer: AY875970 für PGFS,

EF063141 für PGES, DQ138060 für PGFR und AY739720 für 3 β HSD, eingetragen. Die weiteren Untersuchungen erfolgten mittels qualitativer und quantitativen RT-PCR.

Die Lokalisation der Expression der 3 β HSD und des PGFR erfolgte auf mRNA- Ebene mittels in situ Hybridisierung (ISH). Zusätzlich wurde auf Proteinebene die 3 β HSD mittels IHC mit einem polyklonalen Antiserum aus dem Kaninchen gegen humanen Typ I (plazentar) 3 β HSD untersucht.

Der mehr oder weniger gleich bleibende Expressionsverlauf der Cox1 im Diöstrus wird dahingehend interpretiert, dass Cox1 die klassische Funktion eines Housekeeping-Genes ausübt; die erniedrigte Expression des Enzyms am Tag 5 p.o. wird auf die sehr hohe Expression der Cox2 zum selben Zeitpunkt zurückgeführt und mit einem Shift in der Bereitstellung von Enzymen zugunsten Cox2 erklärt. Die Expression von Cox2 sank nach einem Höchstwert am Tag 5 p.o. deutlich ab ($p \leq 0,05$), am Tag 15 p.o. wurde nur noch weniger als die Hälfte der Ausgangskonzentration gemessen; ab Tag 25 p.o. blieben die Werte in unteren Messbereich. Immunhistochemie und in situ one-step RT-PCT haben die Expression der Cox2 in dem Zytoplasma der Luteinzellen an den Tagen 5 und 15 p.o. lokalisiert.

Auch die Expression der PGES war zu Beginn des Diöstrus am stärksten (Tag 15 p.o.) und zeigte einen signifikanten Abfall bis zu den Tagen 45 und 65 p.o.. Eine Expression der PGFS konnte dagegen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Der zeitliche Verlauf der Expression von Cox2 und PGES lässt die Folgerung zu, dass den lokal im CL produzierten Prostaglandinen (E-Reihe) eine luteotrope Wirkung bei der Anbildung der CL zukommen könnte. Die fehlende Expression von PGFS zeigt, dass das canine CL nicht in der Lage ist, PGF 2α direkt aus PGH $_2$ via PGFS zu produzieren. Eventuelle alternative Synthesewege von PGF 2α aus PGE $_2$ und/oder PGD $_2$ wurden jedoch nicht untersucht.

Die Expression des PGFR stieg bis Tag 25 p.o. an, danach wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede mehr beobachtet. Dies wird als eine konstitutive Expression des PGFR im caninen CL im Verlauf des Diöstrus interpretiert, was die dosisabhängige Empfänglichkeit des CL gegenüber exogen verabreichtem PGF 2α erklären würde. Die ausschließliche Lokalisation der Expression der PGFR-mRNA in den Luteinzellen zeigt, dass diese das einzige Target für PGF 2α im CL darstellen.

Die Expression der 3 β HSD im CL war erwartungsgemäß positiv mit der Progesteron-Konzentration im peripheren Blut korreliert. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene waren die stärksten Signale am Anfang der CL-Phase vorhanden. Der sich anschließende Abfall der Expression bis zum Ende der Beobachtungsperiode entsprach der sinkenden Progesteronproduktion am Ende des Diöstrus. Die IHC und ISH haben die Expression der 3 β HSD ausschließlich im Zytoplasma der Luteinzellen lokalisiert.

Auf die zwischenzeitlich durchgeführten weiterführenden Untersuchungen wird in der Diskussion auf Seite 122 hingewiesen.

7 SUMMARY

Other than in food animals an endocrine luteolysin (PGF2 α) of uterine origin is not responsible for luteal regression in the non pregnant bitch. However, in pregnant bitches prepartal luteolysis coincides with an increase of PGF2 α indicating a likely functional interrelationship; this would conform with observations that luteolysis and hence abortion can be induced in pregnant bitches by PGF2 α given in the respective dosages.

The present paper therefore addresses the question whether in the dog prostaglandins (PG) synthesized in the corpora lutea (CL) may act as paracrine and/or autocrine regulatory factors involved in the mechanisms leading to regression of the cyclic CL. Consequently expression of the key enzymes of prostaglandin synthesis, Cyclooxygenase 1 and 2 (Cox1, Cox2) as well as of prostaglandin F2 α - and prostaglandin E2- synthase (PGFS and PGES) and the prostaglandin F2 α - receptor (PGFR) were assed at defined stages of luteal function (days 5, 15, 25, 35, 45 and 65 after ovulation, p.o.).

In addition expression of 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (3 β HSD) was determined based on the assumption, that this key enzyme of steroid biosynthesis may serve as a parameter to characterize the functional stages of luteal cells, and that its expression might represent an end-point of a reaction-cascade controlling progesterone production.

On the mRNA-level expression of Cox1 and -2 was assessed by qualitative and quantitative RT-PCR. Localization of Cox2 on the mRNA-level was by in situ one-step RT-PCR and on the protein-level by immunohistochemistry (IHC) using a monoclonal antibody from the mouse directed against Cox2 of the rat (IgG1, clone 33, BD Pharmingen).

As the canine specific sequences of PGFS, PGES, PGFR and 3 β HSD were not known, cloning and sequencing had to be performed prior to determining the expression by qualitative and quantitative RT-PCR. This was achieved via SMART RACE PCR and "homology cloning". The derived sequences were submitted to the Genbank and the following numbers were given: AY875970 for PGFS, EF063141 for PGES, DQ138060 for PGFR and AY739720 for 3 β HSD.

In situ hybridization (ISH) served to localize expression of 3 β HSD and PGFR on the mRNA-level. On the protein-level expression of the 3 β HSD was assessed via IHC using a polyclonal antiserum from rabbit directed against human type I (placenta) 3 β HSD.

Expression of Cox1 during dioestrus was rather constant, indicating the classical function of a housekeeping-gene. The somewhat depressed expression on day 5 p.o. was interpreted as result of the rather high expression of Cox2 at the same point of time due a shift in the provision of enzymes in favour of Cox2. Expression of Cox2 was highest on day 5 p.o., it dropped significantly ($p \leq 0,05$) by about 50 % until day 15 p.o., after day 25 p.o. expression was at the lower detection limit. IHC and in situ one-step RT-PCR localized expression of Cox2 in the cytoplasm of luteal cells on days 5 and 15 p.o..

Also expression of PGES was highest at the beginning of dioestrus (day 15 p.o.) and showed a significant drop towards days 45 and 65 p.o.. At no times expression of PGFS could be detected by routine qualitative RT-PCR. The time-course in the expression of Cox2 and PGES allows the conclusion, that the locally produced prostaglandins (E-type) act luteotrophic during the period of formation of the corpora lutea. The lack in the expression of PGFS suggest that the canine CL is unable to convert PGE₂ directly into PGF₂ α . However, possible alternative synthetic pathways with PGE₂ and/or PGD₂ as a substrate were not determined.

Expression of PGFR increased until day 25 p.o., thereafter it remained fairly constant. This is interpreted as a constitutive expression of the PGFR in the canine CL during the course of the dioestrus, which would explain the dose-dependend responsiveness of the canine CL towards exogenously applied PGF₂ α . PGFR-mRNA was exclusively located in luteal cells, indicating that these cells are the only target for PGF₂ α in the CL.

As was to be expected expression of the 3 β HSD in the CL was positively correlated with peripheral progesterone blood plasma concentrations. Strongest signals on the protein- and the mRNA-level were obtained at the beginning of the CL-phase. This was followed by decrease in the expression until the end of the observation period, matching the decrease of the progesterone concentrations. IHC and ISH exclusively located expression of 3 β HSD in the cytoplasm of the luteal cells.

Reference to additional work done following accomplishing of the thesis is on page 122.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbaszade, IG., Arensburg, J., Park, C.H., Kasa-Vubu, JZ., Orly, J., Payne, AH. (1997)

Isolation of a new mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3 β -HSD VI, expressed during early pregnancy.

Endocrinology 138:1392-1399

Abbaszade, IG., Clarke, TR., Park, CH., Payne, AH. (1995)

The mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins.

Mol. Endocrinol. 9:1214-1222

Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, TH., Bayne, MA., Metters, KM., Slipetz, DM., Grygorczyk, R. (1994)

Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor.

J. Biol. Chem. 269:2632-2636

Andersen, A., Simpson, ME. (1973)

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

Geron-X, Inc, Los Altos, CA

Arici, A., Oral, E., Bukulmez, O., Buradagunta, S., Engin, O., Olive, D.L. (1996)

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

Endocrinology 137:3762-3769

Arosh, JA., Banu, SK., Chapdelaine, P., Madore, E., Sirois, J., Fortier, MA. (2004)

Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function.

Endocrinology 145:2551-2560

Bain, PA., Yoo, M., Clarke, T., Hammond, SH., Payne, A. (1991)

Multiple forms of mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 4- Δ 5 isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes.

Proc. Natl. Acad. Sci. 88:8870-8874, Biochemistry

Belin, F., Goudet, G., Duchamp, G., Gerard, N. (2000)

Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare.

Biol. Reprod. 62:1335-1343

Berisha, B., Pfaffl, MW., Schams, D. (2002)

Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrus cycle and pregnancy.

Endocrine 17:207-214

Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W., Einspanier, R. (2000)

Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during oestrus cycle and pregnancy.

Biol. Reprod. 63:1106-1114

Boonyaprakob, U., Gadsby, JE., Hedgpeth, V., Routh, P., Almond, GW. (2003a)

Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrus cycle.

Reproduction 126:393-405

Boonyaprakob, U., Gadsby, JE., Hedgpeth, V., Routh, P., Almond, GW. (2003b)

Cloning of pig prostaglandin $F_{2\alpha}$ (FP) receptor cDNA and expression of its mRNA in the corpora lutea.

Reproduction 125:53-64

Buddecke, E. (1985)

Grundriß der Biochemie.

Verlag Walter de Gruyter, Berlin-New York

BII, 24:389-393

Bukovský, A., Caudle, MR., Keenan, JA., Wimalasena, J., Upadhyaya, NB., Van Meter, SE. (1995)

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

Biol. Reprod. 53:1373-1384

Büsges, F. (2003)

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

Dissertation Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Giessen.

Chen, S., Zanagnolo, V., Preutthipan, S., Roberts, KP., Goodman, SB., Dharmarajan, A. (1997)
The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and estradiol in rabbit corpus luteum progesterone production.
Endocrine 6:73-77

Cheung, N., Wong, MP., Yuen, ST., Leung, SY., Chung, LP. (1998)
Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon.
Hum. Pathol. 29:910-914

Concannon, PW. (1980)
Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch.
J. Reprod. Fertil. 58:407-410

Concannon, PW. (1993)
Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs.
J Reprod Fert Suppl 47:3-27

Concannon, PW., Hansel, W. (1977)
Prostaglandin F₂α induced luteolysis, hypothermia and abortion in beagle bitches.
Prostaglandins 13:533-542

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. 81:175-180

Davis, JS., Rueda, BR. (2002)
The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies.
Front. Biosci. 7:d1949-d1978

Davis, JS., Rueda, BR., Spanel-Borowski, K. (2003)
Microvascular endothelial cells of the corpus luteum.
Reprod. Biol. Endocrinol. 1:89

- Dawood, MY., Chellaram, R., Khan-Dawood, FS. (1997)
Interleukin-1 beta inhibits in vitro pulsatile progesterone secretion and stimulates prostaglandin F₂alpha secretion by microretrodialysed baboon corpus luteum.
Horm. Metab. Res. 29:483-490
- Endo, T., Henmi, H., Kitajima, Y., Nishikawa, A., Manase, K., Yamamoto, H., Kudo, R. (1998)
Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured granulosa cells.
Gynecol. Endocrinol. 12:29-34
- Engel, E., Klein, R., Baumgartner, W., Hoffmann, B. (2005)
Investigations on the expression of cytokines in the canine corpus luteum in relation to dioestrus.
Anim. Reprod. Sci. 87:163-176.
- Fairchild, DL., Pate, JL. (1989)
Interferon induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells.
Biol. Reprod. 40:453-457
- Fanjul, LF., Ruiz de Galarreta, CM., Hsueh, AJ. (1983)
Progestin augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells.
Endocrinology 112:405-407
- Farin, CE., Moeller, CL., Sawyer, HR., Gambroni, F., Niswender, GD. (1986)
Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum through the estrus cycle.
Biol. Reprod. 35:1299-1308
- Feldman, DL., Nelson, RW. (1987)
Canine and feline endocrinology and reproduction.
In: Canine and feline reproduction.
W. B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, pp:399-480
- Fitz, TA., Hoyer, PB., Niswender, GD. (1984)
Interactions of prostaglandins with subpopulations of ovine luteal cells. I. Stimulatory effects of prostaglandins E₁, E₂ and I₂.
Prostaglandins 28:119-126
- Gibori, G., Keyes, PL. (1978)
Role of intraluteal estrogen in the regulation of the rat corpus luteum during pregnancy.
Endocrinology 102:1176-1182

Giroux, M., Descoteaux, A. (2000)

Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C- α .

J. Immunol. 165:3985-3991

Graves, PE., Pierce, KL., Bailey, TJ., Rueda, BR., Gil, W., Woodward, DF., Yool, AJ., Hoyer, PB., Regan, JW. (1995)

Cloning of a receptor for prostaglandin F_{2a} from the ovine corpus luteum.

Endocrinology 136:3430–3436

Gregoraszczyk, EL. (1983)

Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells. Effect of LH, hCG, PRL and estradiol.

Endocrinol. Experim. 17:59-63

Gregoraszczyk, EL. (1992)

Interrelationship between steroid hormone secretion and morphological changes of porcine corpora lutea at various periods of luteal phase.

Endocr. Reg. 26:189-194

Gregoraszczyk, EL., Oblonczyk, K. (1996)

Effect of a specific aromatase inhibitor on estradiol secretion by porcine corpora lutea at various stages of the luteal phase.

Reprod. Nutr. Dev. 36:65-72

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. 13:2738–2744

Hazzard, TM., Stormshak, F. (1997)

Down-regulation of oxytocin receptors and secretion of prostaglandin F₂ α after chronic treatment of ewes with estradiol-17 β .

Biol. Reprod. 56:1576-1581

Hehnke, KE., Christenson, LK., Ford, SF., Taylor, M. (1994)

Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during PGF₂ α -induced luteolysis.

Biol. Reprod. 50:10-15

Herschman, HR. (1996)

Prostaglandin synthase 2.

Biochim. Biophys. Acta 1299:125- 140

Hoffmann, B., Büsges, F., Baumgartner, W. (2004a)

Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus.

Reprod. Domest. Anim. 39:391-395.

Hoffmann, B., Büsges, F., Engel, E., Kowalewski, MP., Papa, P. (2004b)

Regulation of corpus luteum-function in the bitch.

Reprod. Domest. Anim. 39:232-240

Hoffmann, B., Büttner, G. (1998)

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

Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 106(Suppl. 1):p42

Hoffmann, B., Höveler, R., Hasan, S. H., Failing, K. (1992)

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.

J. Reprod. Fert. 96:837-845

Hoffmann, B., 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. 42:257-288

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

Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog.

Reprod. Dom. Anim. 34:219-226

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

Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog.

Reprod. Dom. Anim. 34:219-240

Hoffmann, B., Schneider, S. (1993)

Secretion and release of luteinizing hormon during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 47:85-91

Höveler, R. (1991)

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Ovarfunktion bei der graviden und ingraviden Hündin.
Dissertation Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Giessen.

Hubler, M., Arnold, S., Casal, M., Flückiger, M., Hauser, B., Corboz, L., Rüschi, P. (1991)

Anwendung von niedrig dosiertem Prostaglandin F_{2α} bei Hündinnen.
Schw. Arch. Tierheilk. 133:323-329

Johnson, MC., Devoto, L., Retamales, E., Kohen, P., Troncoso, JL., Aguilera, G. (1996)

Localization of insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor expression in human corpora lutea: role on estradiol secretion.
Fertil. Steril. 65:489-494

Jones, GE., Boyns, AR., Cameron, EH., Bell, ET., Christie, DW., Parkes, MF. (1973)

Plasma oestradiol, luteinizing hormone and progesterone during pregnancy in the Beagle bitch.
J. Reprod. Fertil. 35:187-189

Jones, LS., Ottobre, JS., Pate, JL. (1992)

Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells.
Mol. Cell Endocrinol. 85:33-39

Juengel, JL., Wiltbank, MC., Meberg, BM., Niswender, GD. (1996)

Regulation of steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding prostaglandin F_{2α} receptor in ovine corpus luteum.
Biol. Reprod. 54:1096-1102

Kenny, N., Herman, JR., Barisas, BG., Roess, DA. (1991)

Flow cytometric analysis of Class I and II MHC antigen on ovine luteal cell types. In: Gibori, E. (ed.).
Signaling Mechanisms and Gene Expression in the Ovary. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York,
Tokyo, pp.467 - 472

Kitanaka, J., Hashimoto, H., Sugimoto, Y., Negishi, M., Aino, A., Gotoh, M., Ichikawa, A., Baba, A. (1994)

Cloning and expression of a cDNA for rat prostaglandin F_{2α} receptor.
Prostaglandins 48:31-41

Kobayashi, S., Acosta, T.J., Hayashi, K., Berisha, B., Ozawa, T., Ohtani, M., Schams, D., Miyamoto, A. (2002)

Intraluteal release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_2 during corpora lutea development in the cow.
J. Reprod. Dev. 48:583-590

Kowalewski, M.P., Mason, J.I., Howie, A.F., Morley, S.D., Schuler, G., Hoffmann, B. (2006a)

Characterization of the canine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus.
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 101:254-262

Kowalewski, M.P., Schuler, G., Taubert, A., Engel, E., Hoffmann, B. (2006b)

Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus.
Theriogenology 66:1432-1430

Lake, S., Gullberg, H., Wahlqvist, J., Sjögren, A.M., Kinhult, A., Lind, P., Hellström-Lindahl, E., Stjernschantz, J. (1994)

Cloning of the rat and human prostaglandin F_{2a} receptors and the expression of the rat prostaglandin F_{2a} receptor.
FEBS Lett. 355:317-325

Lobel, B.L., Levy, E. (1968)

Enzymatic correlates of development, secretory function and regression of follicles and corpora lutea in the bovine ovary. II. Formation, development and involution of corpora lutea.
Acta Endocrinol. 59, Suppl. 132:35-63

Lorence, M.W., Murry B.A., Trant, J.M., Mason J.I. (1990)

Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5 \rightarrow 4$ isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids
Endocrinology 126:2493-2498

Lund, S.A., Murdoch, J., Van Kirk, E.A., Murdoch, W.J. (1999)

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

Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J.A., Fortier, M.A. (2003)

An aldose reductase with 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the bovine endometrium.
J. Biol. Chem. 278:11205-11212

Mamluk, R., Chen, D., Greber, Y., Davis, JS., Meidan, R. (1998)

Characterization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin F_{2α} and luteinizing hormone receptors in various bovine luteal cell types.

Biol. Reprod. 58:849-856

Mariani, TC., Prado, C., Silva, LCG., Paarman, FA., Lima, MC., Carvalho, I., Campos, DB., Artoni, LP., Blasquez, FJH., Papa, PC. (2004)

Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the corpus luteum of the bitch during diestrus and anestus.

Abstracts Book, 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Sao Paulo, Brazil 2004;146-148 .

Marrogi, A., Pass, HI., Khan, M., Metheny-Barlow, LJ., Harris, CC., Gerwin, BI. (2000)

Human mesothelioma samples overexpress both cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (NOS2): in vitro antiproliferative effects of a COX-2 inhibitor.

Cancer Res. 60:3696-3700

Mason, JI., Howe, BEC., Howie, AF., Morley, SD., Nicol, MR., Payne, AH. (2004)

Promiscuous 3β-hydroxysteroid dehydrogenases: testosterone 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activities of mouse type I and VI 3β-hydroxysteroid dehydrogenases.

Endocr. Res. 30:709-714

McCracken, JA., Custer, EE., Lamsa, JC. (1999)

Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event.

Physiol. Rev. 79:263-323.

Milvae, RA., Hansel, W. (1983)

Prostacyclin, prostaglandin F_{2α} and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle.

Biol Reprod. 29:1063-1068.

Milvae, RA., Hansel, W. (1983)

Prostacyclin, prostaglandin F_{2α} and progesterone production by bovine luteal cells during the oestrus cycle.

Biol. Reprod. 29:1063-1068

Miyamoto, A., von Lützwow, H., Schams, D. (1993)

Acute actions of prostaglandin F_{2α}, E₂ and I₂ in microdialyzed bovine corpus luteum in vitro.

Biol. Reprod. 49:423-430

- Muir, AV., Hodgins, MB., Milne, JA., Young, H. (1970)
The presence of hydroxysteroid dehydrogenases in mammalian sebaceous structures.
Br. J. Dermatol. 83:291-295
- Murakami, M., Bingham, CO., Matsumoto, R., Austen, KF., Arm, JP. (1995)
IgE-dependent activation of cytokine-primed mouse cultured mast-cells induces a delayed phase of prostaglandin D-2 generation via prostaglandin endoperoxide synthase-2.
J. Immunol. 155:4445-4453
- Neuvians, TP., Schams, D., Berisha, B., Pfaffl, MW. (2004)
Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum.
Biol. Reprod. 70:473-480.
- Nishiyama, T., Tsumagari, S., Ito, M., Watanabe, G., Taya, K., Takeishi, M. (1999)
Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog.
Anat. Histol. Embryol. 28:125-129
- Niswender, GD., Juengel, JL., Silva, PJ., Rollyson MK., McItush, EW. (2000)
Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.
Physiol. Rev. 80:1-29
- Nohr, B. (1993a)
Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Geburt bei der Hündin unter Anwendung eines Antigestagens.
Dissertation Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Nohr, B., Hoffmann, B., Steinetz, BE. (1993b)
Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen.
J. Reprod. Fertil. 47:542-543
- Okkens, AC., Bevers, MM., Dieleman, SJ., Willemse, AH. (1990)
Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog.
Vet Q. 12:193-201
- Okkens, AC., Dieleman, DJ., Bevers, MM., Lubberink, AAME., Willemse, AH. (1986)
Influence of hypophysectomy on life span of the corpus luteum in the cyclic dog.
J. Reprod. Fertil. 77:187-192

Okuda, K., Uenoyama, Y., Berisha, B., Lange, IG., Taniguchi, H., Kobayashi, S., Kobayashi, S-I., Miyamoto, A., Schams, D. (2001)

Estradiol-17 β is produced in bovine corpus luteum.

Biol. Reprod. 65:1634-1639

Okuda, K., Uenoyama, Y., Lee, KW., Sakumoto, R., Skarzynski, DJ. (1998)

Progesterone stimulation by prostaglandin F_{2 α} involves the protein kinase C pathway in cultured bovine luteal cells.

J. Reprod. Dev. 44:79-84

Olofsson, J., Leung, PC. (1994)

Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function.

Mol. Cell. Endocrinol. 100:87-91

Olofsson, J., Norjavaara, E., Selstam, G. (1992)

Synthesis of prostaglandin F_{2 α} , E₂ and prostacyclin in isolated corpora lutea of adult pseudopregnant rats throughout the luteal life-span.

Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids 46:151-161

Onclin, K., Verstegen, JP. (1997)

Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrus beagle bitches.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 51:203-208

Palliser, HK., Hirst, JJ., Ooi, GT., Rice, GE, Dellios, NL., Escalona, RM., Parkington, HC., Young, IR. (2005)

Prostaglandin E and F receptor expression and myometrial sensitivity at labor onset in the sheep.

Biol. Reprod. 72:937-943

Papa de Carvalho, P. (2001)

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

Dissertation Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Giessen.

Park, CH., Abbaszade, IG., Payne, AH. (1996)

Expression of multiple forms of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse liver during fetal and postnatal development.

Mol. Cell. Endocrinology 116:157-164

Pate, JL. (1988)

Regulation of prostaglandin synthesis by progesterone in the bovine corpus luteum.

Prostaglandins 36:303-315

Pate, JL. (1995)

Involvement of immune cells in regulation of ovarian function

J. Reprod. Fertil. Suppl. 49:365-77

Pate, JL., Keyes, PL. (2001)

Immune cells in the corpus luteum: friends or foes?

Reproduction 122:665-676

Patek, CE., Watson, J. (1983)

Factors affecting steroid and prostaglandin secretion by reproductive tissues of cycling and pregnant sows in vitro.

Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. 755:17-24

Petroff, MG., Petroff, BK., Pate, JL. (2001)

Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells.

Reproduction 121:753-760

Phillips, HS., Hains, J., Leung, DW., Ferrara, N. (1990)

Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum.

Endocrinology 127:965-967

Pierce, KL., Bailey, TJ., Hoyer, PB., Gil, DW., Woodward, DF., Regan, JW. (1997)

Cloning of carboxyl-terminal isoform for the prostanoids FP receptor.

J. Biol. Chem. 272:883-887

Pridjian, G., Schmit, V., Schreiber, J. (1987)

Medroxyprogesterone acetate: receptor binding and correlated effects on steroidogenesis in rat granulosa cells.

J. Steroid Biochem. 26:313-319

Redmer, DA., Dai, Y., Li, J., Charnock-Jones, DS., Smith, SK., Reynolds, LP., Moor, RM. (1996)

Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum.

J. Reprod. Fertil. 108:157-165

Redmer, DA., Daraiswamy, V., Bortem, BJ., Fisher, K., Jablonka-Sharif, A., Grazul-Bilska, AT., Reynolds, LP. (2001)

Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum.

Biol. Reprod. 65:879-889

Riesenbeck, A. (1997)

Untersuchungen über die Verfügbarkeit von LH bei Hündinnen und zur Bedeutung des Regelfaktors PGF2 α für die Luteolyse im präpartalen Zeitraum.

Dissertation Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Giessen.

Rodway, MR., Swan, CL., Crellin, NK., Gillio-Meina, C., Chedrese, PJ. (1999)

Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: a role for progestins.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 68:173-180

Romagnoli, SE., Cela, M., Camillo, F. (1991)

Use of prostaglandin F2 alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch.

Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 21:487-499

Rossmann, WG., Laughlin, GA., Mortola, JF., Johnson, ML., Veldhuis, JD., Yen, SS. (1990)

Pulsatile cosecretion of estradiol and progesterone by the midluteal phase corpus luteum: temporal link to luteinising hormone pulses.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 70:990-995

Rothchild, I. (1981)

The regulation of the mammalian corpus luteum.

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

Rowe, AJ., Morris, KD., Bicknell, R., Fraser, HM. (2002)

Angiogenesis in the corpus luteum of early pregnancy in the Marmoset and the effects of Vascular Endothelial Growth Factor Immunoneutralization on establishment of pregnancy.

Biol. Reprod. 67:1180-1188

Rueda, BR., Hendry, IR., Hendry, WJ. Jr., Stromshak, F., Slayden, OD., Davis, JS. (2000)

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

Biol. Reprod. 62:269-276

Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Houtani, T., Sugimoto, T., Ito, S., Hayaishi, O. (1994)

Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2a receptor.

J. Biol. Chem. 269:3881–3886

Shelton, K., Parkinson, TJ, Hunter, MB., Kelly, RW., Lamming, GE. (1990)

Prostaglandin E2 as a potential luteotropic agent during early pregnancy in cattle.

J. Reprod. Fertil. 90:11-17

Shiotani, H., Denda, A., Yamamoto, K., Kitayama, W., Endoh, T., Sasaki, Y., Tsutsumi, N., Sugimura, M., Konishi, Y. (2001)

Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide.

Cancer Res. 61:1451-1456

Simpson, MB., Cunliffe, WJ., Hoodgins, MB. (1983)

The relationship between the in vitro activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, delta -5-isomerase in human sebaceous glands and their secretory activity in vivo.

J. Invest. Dermatol. 81:139-144

Skarzynski, DJ., Okuda, K. (1999)

Sensitivity of bovine corpora lutea on Prostaglandin F2 α is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins.

Biol. Reprod. 60:1292-1298

Song, J., Aumüller, G., Xiao, F., Wilhelm, B., Albrecht, M. (2004)

Cell Specific Expression of CD10/Neutral Endopeptidase 24.II Gene in Human Prostatic Tissue and Cells.

Prostate 58:394-405

Sonnack, M., Leiser, R., Meyer, W., Hoffmann, B. (2003)

Morphological changes in regressing canine corpus luteum and the occurrence of apoptotic events.

Reproduction in domestic animals 38:354-355

Steinetz, BG., Goldsmith, LT., Harvey, HJ., Lust, G. (1989)

Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: Detection of relaxin as a marker of pregnancy.

Am. J. Vet. Res. 50:68

Stocco, CO., Deis, RP. (1998)

Participation of intraluteal progesterone and prostaglandin F₂α in LH-induced luteolysis in pregnant rat.
J. Endocrinol. 156:253-259

Stouffer, RL., Martinez-Chequer, JC., Molskness, TA., Xu, F., Hazzard, TM. (2001)

Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary.
Arch. Med. Res. 32:567-575

Sugimoto, Y., Hasumoto, K., Namba, T., Irie, A., Katsuyana, M., Negishi, M., Kakizuka, A., Narumiya, S.,
Ichikawa, A. (1994)

Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor.
J. Biol. Chem. 269:1356-1360

Tamanini, C., De Ambrogi, M. (2004)

Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum.
Reprod. Domest. Anim. 39:206-216

Taniguchi, H., Yokomizo, Y., Okuda, K. (2002)

Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum.
Biol. Reprod. 66:754-759

Tsai, SJ., Anderson, LE., Juengel, J., Niswender GD., Wiltbank, MC. (1998)

Regulation of prostaglandin F₂α and E receptor mRNA by Prostaglandin F₂α in ovine corpora lutea.
J. Reprod. Fertil. 114:69-75

Vermeirsch, H., Simoens, P., Coryn, M., Van den Broeck, W. (2001)

Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations.
Reproduction 122:73-83

Watson, ED., Sertich, PL. (1990)

Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares.
J. Reprod. Fert. 88:223-229

Watts, JR., Wright, PJ., Parry, BW. (2001)

Sodium cloprostenol administered at continuous low dosage induces polydipsia and suppresses luteal function in early dioestrus bitches.
Anim. Reprod. Sci. 67:113-123

Wheeler, AG., Walker, M., Lean, J. (1988)

Function of hormonally-induced corpora lutea in the domestic cat.

Theriogenology 29:971-978

Wiepz, GJ., Wiltbank, MC., Nett, TM., Niswender, GD., Sawyer, HR. (1992)

Receptors for prostaglandin F₂ α and E₂ in ovine corpora lutea during maternal recognition of pregnancy.

Biol. Reprod. 47:984-991

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. fertile. 116:103-111

Wiltbank, MC., Belfiore CJ., Niswender GD. (1993)

Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells.

Mol. Cell. Endocrinol. 97:1-7

Wiltbank, MC., Ottorobe, JS. (2003)

Regulation of intraluteal production of prostaglandins.

Reprod. Biol. Endocrinol. An on line journal published by BioMed Central Nov 10;1(1):91

Wuttke, W., Spiess, S., Knoke, I., Pitzel, L., Leonhardt, S., Jarry, H. (1998b)

Synergistic effects of prostaglandin F₂ α and tumor necrosis factor to induce luteolysis in the pig.

Biol. Reprod. 58:1310-1315

Wuttke, W., Thelling, K., Pitzel, L. (1998a)

Regulation of steroid production and its function within the Corpus Luteum.

Steroids 63:299-305

9 **LEBENS LAUF**

Biodata

Name: KOWALEWSKI Mariusz Paweł
Geburtsdatum: 04 April 1976
Geburtsort: Włocławek
Staatangehörigkeit: Polnisch
Familienstand ledig



Kontakt Adresse

Fester Wohnsitz: Ul. Kazimierza Wielkiego 37
87-820 Kowal/Polen.
Bei der Arbeit: Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 98
35392 Gießen
Tel.: 0641-9938115

e-mail: Mariusz.Kowalewski@vetmed.uni-giessen.de
kowalewski1@yahoo.de

Schulischer Werdegang

- 2003-2006** Promotionsstudium im Rahmen des PhD-Programmes der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2002-2005** DFG Graduiertenkolleg "Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen", der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Philips Universität Marburg.
- 1996-2002** Studium der Veterinärmedizin; Veterinärmedizinische Fakultät der Ermländisch-Masurischen Universität in Olsztyn/Polen.
Beendet mit Gesamtnote: sehr gut.
Während dieser Zeit von März bis Juli 2001 studiert im Rahmen des Socrates-Erasmus Programms an der Veterinärmedizinischen Fakultät der JLU Gießen.
- 1991-1996** Technische Fachschule für Tierheilkunde an der Landwirtschaftlichen Gesamtschule in Września/Polen, mit Abitur als Abschlussprüfung. Titel eines Technikers für Tierheilkunde.
- 1991-1997** Pelagia Słotwińska Grundschule in Włocławek/Polen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann für die Überlassung des interessanten Themas und die jederzeit gewährte freundliche fachliche Unterstützung und Beratung. Ganz besonders möchte ich mich für die überaus engagierte Hilfestellung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Die Korrekturen und Ratschläge haben mir sehr geholfen und sind nicht selbstverständlich. Vielen Dank Professor!

Herrn PD Dr. Gerhard Schuler danke ich für die freundliche Aufnahme und die fachliche Beratung. Die Einladung auf die Masuren bleibt immer offen...

Frau Prof. Dr. Elvira Hinsch danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme ins Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“; Herrn Prof. Klaus Dieter Hinsch danke ich herzlich für die gute und intensive Betreuung während der Anfertigung der Arbeit. Allen Stipendiaten des Graduiertenkollegs, insbesondere Frau Dr. Karen Bücher und Frau Dr. Sonja Hartmann möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung.

Beim PhD-Programm bedanke ich mich für die Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit.

Außerdem richtet sich mein ganz besonderer Dank an alle Mitarbeitern der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II.

Ein ganz großes Dankeschön richte ich an meine Kollegin Ursula Teichmann für ihre herzliche Aufnahme im Labor, ihre Offenheit und die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie für unsere gemeinsamen „Zigaretten-Pausen“, die wir zusammen mit Frau Margret Bach genießen durften, bei der ich mich an dieser Stelle für Ihre mütterliche Betreuung bedanken möchte.

Bei dem RIA-Labor Team möchte ich mich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Insbesondere Herrn Willi Damm für seine ständige Hilfsbereitschaft bei jedem durch Computerprobleme verursachten Hilfeschrei: „Willi, der Computer geht wieder nicht....“.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an alle „Einwohner“ des Doktorandenzimmers, an die Helga Greven, Maike Gruhn, Carolin Ludwig und Peter Richterich die mit ihrer Freundlichkeit, Zusammenarbeit und durch das freundliche Arbeitsklima wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem guten Freund Herrn Dr. Henry M’ikiugu Mutembei möchte ich mich für seinen Beistand, das immer offene Ohr, seinen Rat und die gegenseitige Unterstützung bedanken. Unsere gemeinsame wissenschaftliche Diskussionen waren mir ebenso wichtig, wie die zusammen auf den Reisen durch viele Länder und Städte erlebten Momente. Ich freue mich, dass ich mit dir die Schönheit meines Heimatlandes aufs neue entdecken durfte.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser und Prof. Dr. M. Bergmann an dem Institut für Veterinär -Anatomie -Histologie und -Embryologie und ihren Mitarbeitern danke ich für ihre Geduld und freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Prof. R. Leiser gilt mein besonderer Dank für seine Gastfreundlichkeit und seine immer gute Laune, die ich zum ersten Mal vor fünf Jahren als Austausch-Sokrates-Student an der damals für mich noch fremden Fakultät in Giessen kennenlernen durfte und die sich bis heute nicht geändert hat.

Herrn Prof. Dr. Bülte und den Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungskunde, vor allem Herrn Dr. Holger Schönenbrücher und Frau Walter, sowie Frau Dr. Anja Taubert aus dem Institut für Parasitologie möchte ich mich für deren Hilfe und Zusammenarbeit bei der Durchführung der quantitativen Real Time PCR, bedanken.

Mein größter Dank richtet sich an meine geliebten Eltern, meine Schwester Mariola und meine Freunde, insbesondere an Robert. Ihr habt mich durch das ganze Studium begleitet, bei jeder Wahl des weiteren Weges unterstützt und ermutigt. Ohne eurer Unterstützung und liebevoller Anteilnahme wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der (DFG) Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.