

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

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

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

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

Eingereicht von
Eva Engel
Tierärztin aus Eppelborn (Saarland)

Gießen 2004

INHALTSVERZEICHNIS

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

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.11 | Zusammenfassende Übersicht der Effekte von Zytokinen im CL | 58 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 61 |
| 3.1 | Versuchsdesign..... | 61 |
| 3.2 | Spendertiere..... | 61 |
| 3.3 | Bestimmung des Ovulationszeitpunktes und Gewinnung der Blutproben..... | 62 |
| 3.4 | Bestimmung von Progesteron im Blutplasma | 62 |
| 3.5 | Ovariohysterektomie (OHE) | 63 |
| 3.6 | Konservierung der Corpora lutea (CL) | 63 |
| 3.7 | RNA-Isolierung..... | 64 |
| 3.7.1 | Durchführung | 64 |
| 3.8 | Bestimmung der RNA-Konzentration und Herstellung einer RNA-Gebrauchsverdünnung..... | 66 |
| 3.9 | DNase-Behandlung..... | 66 |
| 3.9.1 | Durchführung | 66 |
| 3.10 | Reverse Transkription (RT-PCR) | 67 |
| 3.10.1 | Durchführung | 67 |
| 3.11 | Amplifikation (PCR) | 68 |
| 3.11.1 | Durchführung der PCR (in Anlehnung an ein Protokoll von GRÖNE et al. 1999)..... | 71 |
| 3.11.2 | Primer | 72 |
| 3.12 | Agarosegelektrophorese..... | 75 |
| 3.12.1 | Durchführung | 75 |
| 3.12.2 | Auswertung der Agarosegele | 76 |
| 3.13 | Auswertung der Ergebnisse..... | 76 |
| 3.14 | Kontrollen | 76 |
| 3.14.1 | Positivkontrolle | 76 |
| 3.14.1.1 | Lymphozytenstimulationstest (LTT) zur Gewinnung einer Positivkontrolle | 77 |
| 3.14.1.1.1 | Lymphozytenisolierung mittels einstufiger Perkoll®-Dichtegradientenzentrifugation | 77 |
| 3.14.1.2 | Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung | 78 |
| 3.14.1.3 | Stimulationsparameter | 78 |
| 3.14.1.2 | Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) | 79 |
| 3.14.2 | Negativkontrolle | 80 |
| 3.15 | Sequenzierung der PCR-Produkte | 81 |
| 3.16 | Immunhistologische Untersuchungen | 81 |
| 3.17 | Materialien und Geräte..... | 82 |
| 3.17.1 | Primer | 82 |
| 3.17.2 | Puffer und Lösungen | 82 |
| 3.17.3 | Reagenzien | 83 |
| 3.17.4 | Auflistung der Geräte | 84 |
| 4 | ERGEBNISSE | 86 |
| 4.1 | Progesteronkonzentrationen im Blutplasma | 86 |
| 4.2 | Untersuchungen zur Expression der mRNA mittels RT-PCR | 88 |
| 4.2.1 | Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TNF- α und TGF- β 1 | 88 |
| 4.2.2 | Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-6 und IFN- γ | 93 |
| 4.2.3 | Untersuchungen zur Expression des Zytokins IL-4 | 101 |

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