

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	Agarosegelelektrophorese	75
3.12.1	Durchführung	75
3.12.2	Auswertung der Agarosegele	76
3.13	Auswertung der Ergebnisse	76
3.14	Kontrollen	76
3.14.1	Positivkontrolle	76
3.14.1.1	Lymphozytenstimulationstest (LTT) zur Gewinnung einer Positivkontrolle	77
3.14.1.1.1	Lymphozytenisolierung mittels einstufiger Percoll®-Dichtegradientenzentrifuga- tion	77
3.14.1.1.2	Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung.....	78
3.14.1.1.3	Stimulationsparameter.....	78
3.14.1.2	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).....	79
3.14.2	Negativkontrolle	80
3.15	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	81
3.16	Immunhistologische Untersuchungen	81
3.17	Materialien und Geräte	82
3.17.1	Primer	82
3.17.2	Puffer und Lösungen	82
3.17.3	Reagenzien	83
3.17.4	Auflistung der Geräte	84
4	ERGEBNISSE	86
4.1	Progesteronkonzentrationen im Blutplasma	86
4.2	Untersuchungen zur Expression der mRNA mittels RT-PCR	88
4.2.1	Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12 (p40 Subunit), TNF- α und TGF- β 1	88
4.2.2	Untersuchungen zur Expression der Zytokine IL-6 und IFN- γ	95
4.2.3	Untersuchungen zur Expression des Zytokins IL-4	101

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