

## 5. Zusammenfassung

Die Gonadotropine liegen aufgrund von Unterschieden in der Kohlenhydratstruktur in der Hypophyse und im Serum als Molekülfamilie, bestehend aus sog. Isoformen, vor. Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Plasmahalbwertszeit und der Bioaktivität.

In dieser Arbeit wurden die Isoformenverteilung von LH und FSH und der Einfluß von GnRH beim Hengst untersucht.

Hierfür wurden bei fünf Zuchthengsten vor und nach Stimulation mit einem niedrig dosierten GnRH-Analogen Blutproben von 1000 ml entnommen. Außerdem wurden Proben von zwei zwei- und dreijährigen Junghengsten und einem einseitig kastrierten Kryptorchiden gewonnen.

Die Gonadotropine wurden aus den Sera mittels Affinitätschromatographie isoliert. Der gegen equine Gonadotropine gerichtete Fängerantikörper der Affinitätschromatographie wurde durch Ammoniumsulfatfällung aus Hybridomüberständen aufgereinigt und nach einer Dialyse mit 1M Phosphatpuffer effektiv an das Chromatographie-Gel gekoppelt.

Die nach der Affinitätschromatographie in weiteren Schritten aufgereinigten Gonadotropine wurden in Isoelektrischen Fokussierungen aufgetrennt, und die Konzentrationen der verschiedenen LH- und FSH-Isoformen in homologen Radioimmunoassays bestimmt.

Die fünf Zuchthengste zeigten für LH relativ einheitliche Isoformmuster mit immunologischer Aktivität über einen pH-Bereich von 4,0-9,0. Die Isoformen mit einem IP um 5,0 hatten durchgehend den höchsten Anteil an der Gesamthormonmenge. Bei pH 6,3 war ein Einschnitt des Hormongehaltes auffallend.

Infolge der Stimulation mit dem GnRH-Analogen Buserehin wurde ein signifikanter Anstieg des Anteils der weniger sauren bzw. basischen LH-Isoformen nachgewiesen ( $p < 0,001$ ).

Die FSH-Muster der Zuchthengste wiesen eine größere Varianz auf. Die in ihrem Ausmaß deutlichen individuellen Schwankungen unterliegenden Isoformen-Peaks traten dennoch bei allen fünf Tieren an denselben isoelektrischen Punkten auf, wobei die Peaks bei pH 4,4 und 5,1 durchgehend sehr deutlich ausgebildet waren. Immunologische Aktivität war über den gesamten pH-Bereich von 3,3-9,3 vorhanden.

Nach der Stimulation war ein deutlich höherer Anteil der basischeren Isoformen von FSH nachzuweisen. Diese Verschiebung war ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Isoformenverteilungen der Junghengste wichen mehr oder weniger deutlich von denen der Zuchthengste ab, mit einer Tendenz zu einem höheren Anteil der basischeren Isoformen von LH und FSH. Inwieweit hierfür die Altersunterschiede oder Haltungsunterschiede zwischen den Hengsten -insbesondere der fehlende oder vorhandene Zuchteinsatz- verantwortlich sind, ist fraglich.

Die Gonadotropin-Muster des Kryptorchiden wiesen ebenfalls deutliche Unterschiede zu den adulten Hengsten auf. Ein Zusammenhang mit dem vorliegenden Kryptorchismus ist aber, da es sich hier um eine Einzeluntersuchung handelt, nicht gesichert.

In dieser Arbeit wurden somit erste Ergebnisse über die Isoformenmuster von LH und FSH im Serum des Hengstes in verschiedenen Altersklassen und bei Kryptorchismus gewonnen werden. Es wurde nachgewiesen, daß die Applikation eines GnRH-Analogons neben einer quantitativen Zunahme auch eine qualitative Veränderung der Serumgonadotropine des Hengstes in Form einer Zunahme des Anteils der weniger sauren und basischen Isoformen hervorruft.

**Stefan Giesbert**

### **Isoform patterns of gonadotropins in the serum of stallions**

#### **6. Summary**

Gonadotropins occur in the pituitary gland and in serum as families of similar molecular forms frequently termed "isoforms", mainly due to differences in carbohydrate structure.

The present work examined the microheterogeneity of eLH and eFSH and the influence of GnRH on the isoform-profile in the serum of stallions.

Blood samples of 1000 ml were collected from five breeding stallions before and after administration of a low-dose GnRH-agonist and from four younger stallions, two- and three years of age, and a semi castrated cryptorchid horse without GnRH-challenge.

The gonadotropins were isolated from serum by affinity chromatography using an antibody directed against the  $\alpha$ -subunit of equine gonadotropins. The antibody had been extracted and purified from hybridoma supernatant by ammoniumsulfate-precipitation and dialysis and was coupled to the chromatography gel using 1M phosphatbuffer

After affinity chromatography and further cleaning steps the gonadotropins were separated by gel isoelectric focusing. The gel was cut, the gel pieces were eluted and the contents of LH and FSH were determined in homologous radioimmunoassays.

The five breeding stallions showed quite similar isoform-profiles for LH with immunological activity occurring in the range of pH 4,0-9,0. The highest amount of hormone in all five stallions was found in the isoform with an IP of 5,0. Low hormone levels were detected at around pH 6,3

After stimulation with the GnRH-agonist Buserelin a significant increase in the relativ amounts of less acidic and basic isoforms was observed ( $p < 0,001$ ).

The FSH profiles of the breeding stallions were more variable. Nevertheless the FSH-isoform peaks, which showed individual differences in magnitude, occurred at the same Ips in the five stallions. Major peaks were found at pH 4,4 and 5,1. The immunological activity of FSH was detected over a pH-range from 3,3-9,3. After stimulation with GnRH a significantly greater proportion of basic FSH isoforms were present in serum

In the non breeding stallions there was a tendency for a higher proportion of the basic isoforms of LH and FSH compared to the breeding animals. Whether these differences are due to the age of the animals or by other factors related to fertility requires further investigation.

The gonadotropin profiles of the cryptorchid animal also differed from the patterns of the breeding stallions. The significance of these differences remains to be seen.

In this study the preliminary data on the isoform profiles of LH and FSH in the serum of stallions of different ages and cryptorchism were presented. It could be shown, that the administration of a GnRH agonist resulted in a higher proportion of the less acidic and basic isoforms of cLH and eFSH.