

5. Zusammenfassung

Glykoproteinhormone kommen in verschiedenen Erscheinungsformen vor. Die verschiedenen Isoformen weisen unterschiedliche biologische Wirkungen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung der equinen Gonadotropine LH und FSH die Veränderung der Mikroheterogenität dieser Proteohormone im Zyklus der Stute untersucht. Die Mikroheterogenität der Glykoproteine beruht auf der unterschiedlichen Ausstattung mit verschiedenen Oligosaccharidresten.

Dazu wurde bei fünf Stuten mit Hilfe der klinischen und ultrasonographischen Untersuchung eine Zyklusansprache durchgeführt. Tägliche Blutproben wurden über einen Zyklus gezogen und die für die Reproduktion relevanten Hormone Östradiol, Progesteron, LH und FSH zur Kontrolle des physiologischen Zyklus bestimmt. Zur Ovulation (D_0) im Östrus sowie neun Tage später (D_9) im Interöstrus wurden je 1200 ml Blut entnommen. Mit monoklonalen Antikörpern wurden die Gonadotropine eLH und eFSH mittels der Affinitätschromatographie aufgereinigt und konzentriert. Anschließend erfolgte die Isoelektrische Fokussierung, bei der sich die Isoformen ihrem Isoelektrischen Punkt (IEP) entsprechend in dem pH-Gradienten anordneten. Nach Trennung der Fokussierungsbahnen in 45 Fraktionen wurden für diese mittels Radioimmunoassay eFSH und eLH (RIA) sowie mit einem murinen Leydig-Zell-Assay die biologische Aktivität des eLH (Bio-Assay) bestimmt und somit das Verteilungsmuster der Isoformen im pH-Gradienten erstellt.

Die Verläufe der Hormonkonzentrationen spiegeln die physiologische Reproduktionssituation der Probanden wider. Die mehrmalige Entnahme von 1200 ml Blut führt zu keiner Beeinflussung des physiologischen Verhaltens oder der Konzentrationsverläufe der Reproduktionshormone.

Durch die Affinitätschromatographie mit monoklonalen Antikörpern und die anschließende Isoelektrische Fokussierung ist eine effiziente Methode zur Untersuchung und Darstellung der im Serum zirkulierenden Isoformen der Hormone gegeben.

Bei der statistischen Auswertung der ermittelten IEP werden nur wenige signifikante Unterschiede gefunden. Aber es findet eine Änderung der Isoformenmuster der gonadotropen Hormone FSH und LH im Zyklus der Versuchsstuten, die bei mehreren Tieren die gleiche Richtung aufweisen, statt.

Durch die drei Hormonuntersuchungen wird bei den zehn Proben die Summe von 138 Isoformen im pH-Bereich von 4,3 bis 8,6 ermittelt, die sich auf 30 Isoelektrische Punkte verteilt. Dabei findet eine Verschiebung in der Verteilung der Isoformen aller Stuten zu den beiden Untersuchungszeitpunkten statt. Für die Probe im Östrus (D_0) findet sich der überwiegende Anteil der Isoformen (58,6%) im neutralen bis basischen pH-Bereich von 6,2 bis 8,6. Im Gegensatz dazu finden sich für die Probe im Interöstrus (D_9) 70,6% der Isoformen im sauren pH-Bereich von 4,3 bis 6,1.

Die sauren und neutralen Isoformen (pH 4,0 bis 7,1) weisen eine höhere biologische Aktivität auf als die basischen (pH 7,2 - 9,5). Bei den individuellen Verteilungsspektren der Stuten treten einzelne Isoformen auf, die zu beiden Zeitpunkten unterschiedliche biologische Aktivitäten entfalten. Es lassen sich aber für die fünf Tiere keine übereinstimmenden Veränderungen für bestimmte Isoformen ermitteln.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, daß bei der geschlechtsgesunden Stute qualitative und quantitative Variationen im zyklischen Geschehen bei der Expression der gonadotropen Hormone LH und FSH bestehen. Diese Ergebnisse geben Anlaß für weitergehende Forschungen, um die physiologische Bedeutung der Mikroheterogenität der Gonadotropine besser zu verstehen.

Peter Bleischwitz

Isoelectric focusing of serum gonadotropins in the cycle of the mare.

6. Summary

Glycoprotein hormones circulate in different isoforms in peripheral blood suggesting diverse biological effects. The present work has examined the transformation of the microheterogeneity of the hormones in the cycle of the mare, by means of isoelectric focusing of the equine gonadotropins LH und FSH. The microheterogeneity of the glycoproteins is mainly caused by different glycosylation.

The ovarian cycle of five mares was monitored by clinical investigation and ultrasonography. Daily blood samples were analysed for oestradiol, progesterone, eLH and eFSH. Large blood samples (1200 ml) were collected at ovulation (D_0 , oestrous) and at day nine (D_9 , interoestrous). The gonadotropins eLH und eFSH were extracted and concentrated by affinity chromatography using monoclonal antibodies. The concentrated gonadotropin fractions were separated by isoelectric focusing. ELH and eFSH concentrations in IEF fractions were estimated by radioimmunoassay and eLH bioactivity was analyzed by murine Leydig-cell-assay.

The hormonal changes observed in the present study are normal for the ovarian cycle of the mare and appear not to be affected by the withdrawal of 2 x 1200 ml blood.

The affinity chromatography with monoclonal antibodies has been shown to be an efficient means of concentrating gonadotropins from equine peripheral blood rendering the concentrates suitable for separation by isoelectric focusing.

The isohormone pattern of eFSH and eLH changes during the cycle of the mare. Both the number of detectable individual isoforms and their spectrum of distribution is different between oestrus (D_0) and interoestrus (D_9).

A total of 138 isoforms in the pH range 4,3 to 8,6, attributively to 30 isoelectric points, were identified in ten serum extracts. The distribution of isoforms differed in all mares between the two cycle days investigated. At D_0 the largest part of isoforms (58,6%) was found in the basic pH-area from 6,2 to 8,6. In contrast 70,6% of the isoforms were found in acidic pH-area from 4,3 to 6,1 at D_9 .

The acidic and neutral isohormones (pH 4,0 - 7,1) showed higher biological potencies than the basic isohormones (pH 7,2 - 9,5), irrespective of the stage of cycle. Individual isoforms of eLH are observed in individual animals. The biological activity of those isoforms differs between the mares. No uniform changes of individual isoforms could be detected.

The present thesis has shown that there are qualitative and quantitative changes in the isohormone pattern of the gonadotropic hormones LH and FSH during the cycle of sexually sound mares. Further studies are required to elucidate the physiological significance of these findings.