

Tierärztliche Hochschule Hannover  
Arbeitsgruppe Immunologie  
Klinik für Rinder

---

**Untersuchungen zum Einfluss von Chemokinen und  
Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  auf die Funktion des  
Corpus luteum beim Rind während des Diöstrus, der  
Trächtigkeit und der Luteolyse**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin  
der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

**Sybille Raddatz**

aus Altdöbern

Hannover 2008

Wissenschaftliche Betreuung: Apl. Prof. Dr. med. vet. H.-J. Schuberth

Prof. Dr. med. vet. H. Bollwein

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. med. vet. H.-J. Schuberth

Prof. Dr. med. vet. H. Bollwein

2. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. D. Rath

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2008

# **Meiner Familie und Sven**

Was wir wissen, ist ein Tropfen;  
Was wir nicht wissen, ein Ozean.  
(Sir Isaac Newton)



## Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
1.1 Anbildung, Blüte und Regression des Corpus luteum während des Zyklus .....	2
1.1.1 Anbildungsphase .....	2
1.1.2 Blütephase .....	3
1.1.3 Regressionphase .....	3
1.2 Entwicklung des Corpus luteum graviditatis .....	5
1.3 Einfluss der Angiogenese und der lutealen Durchblutung auf die Funktion des Corpus luteum .....	7
1.4 Zyklusabhängige Besiedelung des Corpus luteum durch Immunzellen .....	8
1.4.1 Eosinophile Granulozyten .....	8
1.4.2 Neutrophile Granulozyten .....	10
1.4.3 Monozyten und Makrophagen .....	11
1.4.4 Lymphozyten .....	12
1.4.5 Mastzellen .....	13
1.5 Beteiligung von Zytokinen an der Sekretions- und Regressionsphase des Corpus luteum .....	14
1.5.1 Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ .....	15
1.6 Beteiligung von Chemokinen an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des Corpus luteum, sowie der Luteolyse .....	17
1.6.1 Chemokin zur Anlockung von Eosinophilen .....	18
1.6.2 Interleukin-8 .....	18
1.6.3 Growth-regulated oncogene- $\alpha$ .....	20
1.6.4 Monocyte chemoattractant protein-1 .....	20
1.6.5 Macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ .....	21
1.7 Auswirkungen eines gestörten Immunsystems auf die Ovarfunktion .....	22
1.7.1 Beeinflussung der hypophysären Sekretion des luteinisierenden Hormons .....	22
1.7.2 Beeinflussung der Ovarphysiologie durch Leukozyten .....	23
1.8 Hypothesen zum Einfluss des Immunsystems auf die Funktion des Corpus luteum während des Zyklus .....	24
<b>2 Geräte, Material, Methoden</b> .....	<b>25</b>

2.1	Geräte .....	25
2.2	Material .....	26
2.2.1	Klinikbedarf .....	26
2.2.2	Laborbedarf .....	27
2.2.3	Reagenzien .....	28
2.2.4	Versuchstiere.....	32
2.2.5	Antikörper .....	34
2.2.6	Kulturmedien, Puffer und Lösungen.....	36
2.2.7	Plasmid für die Herstellung von Standardreihen .....	41
2.3	Methoden.....	43
2.3.1	Gewinnung und Bearbeitung von Corpora lutea-Gewebe .....	43
2.3.2	Gewinnung von Corpora lutea-Gewebekulturüberständen zum indirekten Nachweis chemoattraktiver Substanzen.....	44
2.3.3	Stimulation von Corpora lutea-Gewebestücken mit PGF <sub>2α</sub> oder TNF-α für den direkten Nachweis von ausgewählten Chemokinen und Zytokinen .....	44
2.3.4	Gewinnung von Granulozyten .....	44
2.3.5	Molekularbiologische Verfahren .....	45
2.3.6	Quantitative Real Time-PCR .....	55
2.3.7	Zellbiologische Verfahren.....	60
2.3.8	Histologische Nachweise .....	63
2.3.9	Bestimmung des P <sub>4</sub> -Gehaltes durch den kompetitiven Doppelantikörper- Enzymimmunoassay .....	67
2.4	Statistische Verfahren .....	68
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
3.1	Identifikation von immunologisch wirksamen Substanzen im bovinen Corpus luteum graviditatis und Corpus luteum cyclicum .....	69
3.1.1	Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF-α im bovinen Corpus luteum graviditatis und cyclicum .....	70
3.1.2	Beeinflussung des Migrationsvermögens von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten durch CL Kulturgewebeüberstände.....	72
3.1.3	Progesteronkonzentrationen in Kulturüberständen von Corpora lutea- Gewebekulturen .....	77
3.1.4	Nachweis von Leukozyten im Corpus luteum .....	78

3.2	Einfluss einer luteolytisch wirksamen Dosis PGF <sub>2α</sub> auf die Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF-α des Corpus luteum in der Blütephase .....	82
3.2.1	Einfluss von PGF <sub>2α</sub> auf die Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF-α des Corpus luteum von Tag 10 bis 12 p.ov. in vivo.....	82
3.2.2	Einfluss von PGF <sub>2α</sub> auf die Genexpression von Chemokinen, TNF-α und die P <sub>4</sub> -Sekretion des Corpus luteum cyclicum in vitro .....	87
3.3	Einfluss von TNF-α auf die Genexpression ausgewählter Chemokine, TNF-α und die P <sub>4</sub> -Sekretion des Corpus luteum cyclicum in vitro .....	92
3.4	Einfluss unterschiedlicher Methoden der Ovargewinnung auf die luteale Genexpression an den Tagen 10 bis 12 p.ov. und von Corpora lutea cyclica in der Blütephase .....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>
4.1	Möglichkeiten und Auswirkungen einer unterschiedlichen Ovargewinnung auf die Genexpression von Chemokinen und TNF-α, sowie die Leukozytenanzahl.....	98
4.1.1	Ovarentnahme im Tiermodell .....	99
4.1.2	Ovarentnahme auf dem Schlachthof .....	100
4.1.3	Einteilung des Corpus luteum in Peripherie und Zentrum.....	100
4.2	Einfluss der Trächtigkeit auf die luteale Leukozytenzahl, die Genexpression von Chemokinen und TNF-α, sowie die Sekretion von chemoattraktiven Substanzen und P <sub>4</sub> .....	101
4.2.1	Vorkommen von Leukozyten im Corpus luteum.....	101
4.2.2	Luteale Genexpression von Chemokinen und TNF-α.....	102
4.3	Beeinflussung der lutealen Expression von Chemokinen und TNF-α durch PGF <sub>2α</sub> .....	107
4.4	Beeinflussung der lutealen Expression von Chemokinen und TNF-α, sowie der P <sub>4</sub> -Sekretion durch TNF-α in vitro.....	111
4.5	Luteale Genexpression an den Tagen 10 bis 12 p.ov. im Vergleich mit Corpora lutea cyclica in der Blütephase.....	112
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>122</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata (destiliertes Wasser)
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destiliertes Wasser)
Aqua tridest.	Aqua tridestillata (dreifach destiliertes Wasser)
B-Lymphozyten	im Knochenmark (englisch: bone marrow) geprägte Lymphozyten
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL20	von Makrophagen sezerniertes Chemokin (synonym für Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ )
CCL5	Chemokin zur Anlockung von Eosinophilen (Synonym für RANTES)
CD	cluster of differentiation (System zur Bezeichnung humaner Zelldifferenzierungsantigene)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre DNA, die nach reverser Transkription von messenger RNA entsteht)
CL	Corpus luteum
C <sub>t</sub>	Cycle threshold
CV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
CXCL 1	Chemokin zur Anlockung von Neutrophilen (Synonym für growth-regulated oncogene $\alpha$ )
CXCL 8	Chemokin zur Anlockung von Neutrophilen (Synonym für Interleukin 8)
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIA	enzyme linked immunosorbent assay (kompetitiver Doppelantikörper-Enzymimmunoassay)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase
Eosinophile	eosinophile Granulozyten
et al.	et alii
ET-1	Endothelin-1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat



FL-1, -2, -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL-1 = Grünfluoreszenz, $530 \pm 15$ nm; FL-2 = Orange fluoreszenz, $585 \pm 21$ nm; FL-3 = Rotfluoreszenz, $>650$ nm
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht, Messparameter des FACScan®)
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GRO- $\alpha$	growth-regulated oncogene $\alpha$ (Synonym mit CXCL1)
h	Stunde (lateinisch: hora)
H <sub>2</sub> O	Wasser
hCG	humanes Coriogonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Holstein-Friesian
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISG15	durch Interferon $\tau$ stimuliertes Gen einer Größe von 15 Kilodalton
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LH	luteinsierendes Hormon
M199	Medium 199
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MDS	Mikrodialysesystem
MHC II	major histocompatibility complex class II (Hauptkompartibilitätskomplex der Klasse II)
MIF	Membranimmunfluoreszenz
min	Minute(n)
MIP-3 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Mililiter
mm	Millimeter
mM	Milimolar
MNC	mononuclear cells (mononukleäre Zellen, hier: des Blutes)
mol	Mol
$\mu$ mol	Mikromol
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MW	arithmetischer Mittelwert
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Daten- gruppen
p.c.	post conceptionem
p.i.	post injectionem
p.ov.	post ovulationem
postöstrus	nach Auftreten von Brunstsymptomen
P <sub>4</sub>	Progesteron
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PG	Prostaglandin
PGFM	13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F <sub>2α</sub> (inaktiver Metabolit von PGF <sub>2α</sub> )
PJ	Propidiumjodid
qRT-PCR	quantitative Real time-Polymerase chain reaction
r	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß zur Berechnung der Güte der RT-PCR Schmelzkurve
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (Chemokin, welches u.a. eosinophilen Granulozyten anlockt)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time-Polymerase chain reaction
s.o.	siehe oben
sec	Sekunden
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
s	Standardabweichung
sog.	so genannte(r)
SSC	Seitwärtsstreulicht (englisch: side scatter, Messparameter des FACScan <sup>®</sup> )
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Polymerase des Bakteriums <i>Thermophilus aquaticus</i>
TEC-Puffer	Tris EDTA-Citrat-Puffer
T-Lymphozyten	im Thymus geprägte Lymphozyten
TNFR	Rezeptor der TNF-Superfamilie
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
u.a.	unter anderem

UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
z.T.	zum Teil



### Einleitung

In den letzten Jahrzehnten sank die Trächtigkeitsrate beim Hochleistungsmilchrind bei steigender Milchleistung kontinuierlich ab (Lucy, 2001). Die Hauptursache für Fertilitätsstörungen ist eine hohe embryonale Sterblichkeitsrate, welche durch Dysfunktionen in der Ovarphysiologie hervorgerufen wird. Fehlfunktionen des Ovars können in Umwelteinflüssen wie Hitze (Roth, 2008; Townson, 2006), einer negativen Energiebalance (Leroy et al., 2008) und Entzündungen, wie die Mastitis (Hansen et al., 2004; Hockett et al., 2005) begründet sein. Im Einzelnen können sich diese Faktoren negativ auf den Progesteron ( $P_4$ )-Gehalt des Blutplasmas (Townson, 2006) und somit auf den Erhalt der Trächtigkeit auswirken. Welchen Einfluss das Immunsystem dabei auf die  $P_4$ -Synthese des Corpus luteum (CL) ausübt und ob dies durch Entzündungsreaktionen beeinflusst wird, ist bisher nur ansatzweise erforscht (Pate und Keyes, 2001).

So wiesen Hoeben et al. (2000) eine erhöhte Konzentration des pro-inflammatorisch wirksamen Zytokins Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nach einer durch *Escherichia coli* (*E.coli*) ausgelösten Infektion des Euters im Blutkreislauf nach. Außerdem hemmte die Infusion von TNF- $\alpha$  über die Aorta abdominalis die  $P_4$ -Synthese des CL und führte zu einer vorzeitigen Auslösung der Luteolyse (Skarzynski et al., 2007).

Immer größere Beachtung finden Zellen des Immunsystems, welche indirekt durch ihre Sekretionsprodukte, wie Zytokine, und direkt durch die Phagozytose von Lutealzellen, Einfluss auf die  $P_4$ -Synthese ausüben (Bornstein et al., 2004; Sakumoto und Okuda, 2004; Skarzynski et al., 2008). Die Besiedlung mit unterschiedlichen Leukozytenpopulationen wird zyklusabhängig durch die Sekretion von chemoattraktiven Substanzen, sog. Chemokinen induziert (Bauer et al., 2001). Chemokine und Zytokine beeinflussen die physiologische Entwicklung und Regression des CL, jedoch wird ihre genaue Funktion kontrovers diskutiert (Pate und Keyes, 2001). In wieweit das Immunsystem bei der Erhaltung der CL-Funktion während der Trächtigkeit eine Rolle spielt ist kaum bekannt.

Aus diesen Gründen war es Ziel dieser Studie eventuell bestehende Beziehungen zwischen dem Auftreten von Leukozyten, Chemokinen und TNF- $\alpha$  beim CL cyclicum im Vergleich zum CL graviditatis festzustellen. Zusätzlich wurde geprüft, in wieweit eine Modulation der lutealen Chemokin- und TNF- $\alpha$  Genexpression, sowie der  $P_4$ -Synthese durch Prostaglandin (PG)  $F_{2\alpha}$  und den Entzündungsmediator TNF- $\alpha$  stattfindet.

# 1 Literaturübersicht

## 1.1 Anbildung, Blüte und Regression des Corpus luteum während des Zyklus

Die Lutealphasen werden nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten in drei Abschnitte eingeteilt. Dabei nehmen eine Reihe von Faktoren, sowohl endokrin als auch para- und autokrin, Einfluss auf die Anbildung, Blüte und Regression des CL. Klassische endokrine Regulatoren sind das Luteinisierende Hormon (LH) und das Wachstumshormon (Berisha und Schams, 2005). Bei der para- und autokrinen Regulation der physiologischen Funktion des CL spielen das Peptidhormon Oxytozin,  $17\beta$ -Östradiol sowie viele weitere Faktoren eine wichtige Rolle. Diese Faktoren werden im Folgenden nur in soweit behandelt, als das sie zum Verständnis der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind.

### 1.1.1 Anbildungsphase

Die Phase der Anbildung, welche auch als Luteinisierung bezeichnet wird, beginnt mit der Ovulation des dominanten Follikels und dauert 5 Tage (Rosiansky-Sultan et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde die Länge der Anbildungsphase bei Ireland et al. (1980) mit 4 Tagen post östrus (p.ö.) angegeben. Nach der Ovulation füllt sich das Lumen des Follikels mit Blut und koaguliert zu einem rötlichen Gewebe. Dieses Gebilde wird als Corpus rubrum oder Corpus haemorrhagicum bezeichnet und ist bis Tag 3 post ovulationem (p.ov.) auf der Ovaroberfläche sichtbar. Aus der den Follikel zuvor umschließenden Wand, der sog. Theka folliculi, wachsen nun Gefäße in das Corpus rubrum ein. Mit diesen gelangen Granulosa-, sowie Thekazellen und Fibroblasten in den Blutpfropf, welcher durch diese Zellen organisiert wird. Zwischen den Tagen 3 und 5 beginnen sich die Theka- zu kleinen Lutealzellen und die Granulosa- zu großen Lutealzellen zu differenzieren. Sie synthetisieren nun v.a. das Steroidhormon  $P_4$  (Skarzynski et al., 2005). Dieser Prozess der Luteinisierung wird mit der Formation von Tumorgewebe verglichen, da in keiner weiteren Gewebeart das Zellwachstum und die Gefäßeinsprossung so rasant von statten gehen (Skarzynski et al., 2008). Die ersten 4 Tage der Anbildungsphase sind durch eine fehlende Ansprechbarkeit der Lutealzellen auf eine luteolytisch wirksame Dosis  $PGF_{2\alpha}$  gekennzeichnet (Wiltbank et al., 1995).

### 1.1.2 Blütephase

In der Blütephase kommt es zu einem Maximum der  $P_4$ -Sekretion. Angaben über die Dauer der Blütephase variieren in der Literatur. So wurde die Blütephase nach Ireland et al. (1980) in zwei Abschnitte unterteilt, welche sich durch die Farbe des Apex unterscheiden. An den Tagen 5 bis 10 nach Auftreten der Brunst ist der Apex rot bis braun, während das restliche Gewebe von orange-gelber Farbe ist. Zwischen den Tagen 11 bis 17 p.ö. ist das gesamte CL von orange-gelber Farbe, wobei kein rot-brauner Apex mehr sichtbar ist (Ireland et al., 1980). Im Gegensatz dazu umfasste diese Phase nach Rosiansky-Sultan et al. (2006) die Tage 8 bis 15 p.ov. Nach Berisha und Schams (2005) währt die Blütephase ab Tag 7 bis 17 p.ov. Durch die zu Beginn der Blütephase weiter fortschreitende Luteinisierung ändert sich die Farbe des CL in gelb-orange, das Gewebe ist nun stark vaskularisiert und zum Apex ziehende Gefäße sind gut sichtbar (Ireland et al., 1980).

Histologisch betrachtet ist das CL ein heterogenes Gewebe, welches aus Endothelzellen, großen und kleinen Lutealzellen, Fibroblasten, Immunzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten besteht (Berisha und Schams, 2005; Sakumoto et al., 2000; Stocco et al., 2007). Als wichtiger Modulator der  $P_4$ -Synthese wird der interzelluläre Kontakt zwischen Endothel- und Lutealzellen angegeben (Girsh et al., 1995; Shirasuna et al., 2007). So üben Endothelzellen einen luteotropen Effekt auf Lutealzellen aus, indem sie Prostaglandin  $I_2$  sezernieren (Girsh et al., 1995). Die Autoren verglichen in ihrer Studie die  $P_4$ -Synthese von separierten Lutealzellen mit der von Lutealzellen zusammen mit Endothelzellen. Sie stellten dabei eine geringere  $P_4$ -Synthese bei reinen Lutealzellkulturen im Vergleich zu Lutealzellen, welche zusammen mit Endothelzellen inkubiert wurden (Girsh et al., 1995) fest. Andererseits produzieren Endothelzellen aber auch luteolytisch wirksame Substanzen (Hayashi et al., 2002; Shirasuna et al., 2007).

### 1.1.3 Regressionphase

Das zyklische CL hat die kürzeste Lebensspanne aller Gewebestrukturen beim Säugetier (Bukovsky, 2006). Bei nicht trächtigen Rindern kommt es zwischen den Tagen 17 und 18 p.ov. zu einer Rückbildung der Lutealzellen und der Gefäße (Niswender und Nett, 1994). Nach Ireland et al. (1980) liegt diese Phase zwischen den Tagen 18 und 20 p.ö. Ausgelöst wird die Luteolyse durch die pulsatile Sekretion von  $PGF_{2\alpha}$  vom Endometrium (Berisha und Schams, 2005).

Ohne die Lunge zu passieren, wo es enzymatisch inaktiviert werden würde (Niswender et al., 2000), gelangt es direkt über den Blutweg zum Ovar. Möglich ist dies durch eng aneinander liegende Gefäße eines utero-ovariellen Plexus, welcher einen Stoffaustausch zwischen der Vena uterina und der Arteria ovarica ermöglicht (McCracken et al., 1999). Jedoch scheint  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nicht allein für die Auslösung der Luteolyse verantwortlich zu sein. So zeigten Ohtani et al., (2004) dass die alleinige Infusion von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in das CL von Schafen, an den Tagen 9 bis 11 p.ov. über einen Zeitraum von 4 Stunden, zu keiner Reduzierung der  $\text{P}_4$ -Sekretion führte. Erst die kombinierte Infusion von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  und Endothelin-1 (ET-1) reduzierte der lutealen  $\text{P}_4$ -Sekretion (Ohtani et al., 2004). Hierfür implantierten die Autoren ein Mikrodialysesystem (MDS), welches einerseits eine direkte Perfusion des CL mit  $\text{TNF-}\alpha$  und ET-1, und andererseits eine exakte Messung der  $\text{P}_4$ -Sekretion, ermöglichte.

Die Luteolyse wird in zwei Phasen gegliedert. So reduzieren die Lutealzellen in der ersten Phase, welche als funktionelle Luteolyse bezeichnet wird, die  $\text{P}_4$ -Synthese. Jedoch ist dieser Vorgang potentiell bis 12 Stunden nach Freisetzung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  reversibel (Neuvians et al., 2004). In der zweiten Phase, welche als strukturelle Luteolyse bezeichnet wird, findet der programmierte Zelltod (Apoptose) der Lutealzellen statt, wodurch das CL schnell an Masse verliert (Shirasuna et al., 2008; Stocco et al., 2007). Hierbei wird die  $\text{P}_4$ -Synthese eingestellt, was eine drastische Reduzierung der Plasma  $\text{P}_4$ -Konzentration [ $< 1,0 \text{ ng/ml}$ ] innerhalb von 12 bis 48 Stunden zur Folge hat (Neuvians et al., 2004). Die Gefäßversorgung wird durch Kollagenfasern, Fibroblasten und Makrophagen ersetzt, so dass allein eine Narbe im Stroma des Ovars als sog. Corpus albicans sichtbar bleibt (Stocco et al., 2007).

Der Mechanismus, durch welchen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die luteale  $\text{P}_4$ -Synthese reduziert, ist trotz weitreichender Untersuchungen bisher nicht vollständig geklärt (Stocco et al., 2007). So kann  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , über seinen Rezeptor, zwar direkt an große Lutealzellen binden und die funktionelle Luteolyse induzieren. In kleinen Lutealzellen ist jedoch kein  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Rezeptor nachgewiesen worden (Pate und Keyes, 2001).

In vitro führt die Applikation von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nicht generell zu einer Senkung der lutealen  $\text{P}_4$ -Sekretion (Korzekwa et al., 2008). Die Autoren verglichen verschiedene Methoden der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation in vitro und ihre Wirkung auf die luteale  $\text{P}_4$ -Synthese. So hatte die Gabe von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zu Lutealzellkulturen in vitro eine stimulierende (Korzekwa et al., 2004; Skarzynski und Okuda, 1999), inhibierende (Pate und Condon, 1989) oder keinen Effekt auf die  $\text{P}_4$ -Sekretion (Skarzynski und Okuda, 1999). Im Gegensatz dazu wird durch die Injektion einer luteolytisch wirksamen Dosis von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die  $\text{P}_4$ -Konzentration des Blutplasmas in vivo zuverlässig reduziert (McCracken et al., 1999). Korzekwa et al. (2008) schließen daraus, dass



eine  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation *in vitro*, abhängig der jeweiligen Untersuchungsmethode, unterschiedliche Auswirkungen auf die  $\text{P}_4$ -Synthese haben würde. Eine luteolytische Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  *in vitro* werde nur bei Verfahren erreicht, welche keine Separation der Lutealzellen von weiteren Zelltypen des CL vornehmen würden (Korzekwa et al., 2008). Unterstützt wird diese Aussage durch die Tatsache, dass Endothelzellen, deren Anteil an der Gesamtzellzahl im CL 50% beträgt, Peptide freisetzen, die an der lutealen Regression beteiligt sind (Kobayashi et al., 2002). So werden die Peptide Endothelin-1 und Angiotensin-II vermehrt nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung sezerniert (Shirasuna et al., 2007). Auch die gemeinsame Applikation von Angiotensin-II und einer subluteolytischen Dosis  $\text{PGF}_{2\alpha}$  führte zu einer Reduzierung der  $\text{P}_4$ -Synthese *in vivo* (Hayashi et al., 2002).

## 1.2 Entwicklung des Corpus luteum graviditatis

Die Dauer der Gravidität beim Holstein Friesian (HF) Rind liegt zwischen 278 und 288 Tagen (Grunert und Berchtold, 1999). Während diesem, im Vergleich zum Zyklus sehr langen Zeitraum, ist das CL graviditatis nicht in der Lage Zellen zu regenerieren, wie dies bei anderen Gewebearten möglich ist. Trotz dieser Tatsache synthetisiert das CL graviditatis ausreichende Mengen  $\text{P}_4$ , um eine Trächtigkeit aufrecht zu erhalten. Ob diese über einen so langen Zeitraum stattfindende  $\text{P}_4$ -Sekretion auf morphologischen oder funktionellen Änderungen im CL graviditatis im Vergleich zum CL cyclicum basiert, wurde bisher kaum erforscht (Oliveira et al., 2008).

Einen Unterschied in der Genexpression des CL graviditatis im Vergleich zum CL cyclicum wiesen Oliveira et al. (2008) bei Schafen am Tag 15 post conceptionem (p.c.) nach. So war die Genexpression eines durch Interferon tau ( $\text{IFN-}\tau$ )-stimulierten Gens mit einer Größe von 15 Kilodalton (ISG15) im CL graviditatis signifikant höher als im CL nicht trächtiger Schafe (Oliveira et al., 2008).  $\text{IFN-}\tau$ , welches eine antiluteolytische Wirkung auf das CL hat, fungiert bei allen Wiederkäuern als maternales Erkennungssignal der Trächtigkeit (Bazer et al., 1997). Robinson et al. (2006) wiesen die Genexpression von  $\text{IFN-}\tau$  während der Elongation des Konzeptus in den Riesenzellen des bovinen Trophoblasten zwischen den Tagen 14 und 18 p.c. nach. Über die Uterusvene gelangt  $\text{IFN-}\tau$  in den Kreislauf und induziert in extrauterinen Geweben wie dem CL die Genexpression von ISG15 (Oliveira et al., 2008)

Im Gegensatz dazu sind viele Autoren der Meinung, dass  $\text{IFN-}\tau$  allein parakrine Wirkung auf den Uterus und die sich darin entwickelnde Frucht ausübt (Klein et al., 2006; Song et al., 2007). So erklärt Hansen et al. (1999) die ausbleibende Luteolyse zu Beginn der Trächtigkeit

mit einer Hemmung der endometrialen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung, bedingt durch  $\text{IFN-}\tau$ . Letztgenannte Substanz führe zu einer Verschiebung der uterinen PG-Synthese vom luteolytisch wirkenden  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hin zum luteoprotektiv wirkenden  $\text{PGE}_2$ . In Folge dessen würde das CL am Ende des Zyklus nicht abgebaut, sondern sezerniere weiter kontinuierlich  $\text{P}_4$  (Hansen et al., 1999). Im Gegensatz beruht nach Silva et al. (2000) die Erhaltung der  $\text{P}_4$ -Sekretion, während der maternalen Erkennung der Trächtigkeit, auf einer Resistenz des CL gegenüber  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , bei welcher die Lutealzellen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in seinen inaktiven Metaboliten 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  (PGFM) umwandeln würden.

Einen weiteren Unterschied zwischen dem CL graviditatis und dem CL cyclicum beschrieb Bukovsky (2006) bei der Frau. So konnte er durch immunhistochemische Färbungen nachweisen, dass im CL graviditatis Immunglobulin M (IgM) an Endothelzellen, aber nicht an Lutealzellen bindet. Im Gegensatz dazu band IgM während der Luteolyse an Luteal- und Endothelzellen (Bukovsky, 2006). Bukovsky (2006) vermutet daher eine Beteiligung von Entzündungs-induzierten, Komplement-aktivierenden IgM-Molekülen an der Regression des CL.

Die Höhe der  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration unterscheidet sich nach Chagas e Silva und Lopes da Costa (2005) nicht zwischen graviden und zyklischen Rindern, bis zum Tag 17 p.c.. Dies würde bedeuten, dass eine signifikante Abweichung der  $\text{P}_4$ -Werte erst zum Zeitpunkt einer zu erwartenden Luteolyse erfolgt. Ab den Tagen 180 bis 200 p.c. übernimmt der Uterus die  $\text{P}_4$ -Synthese bis zum Partus, während die  $\text{P}_4$ -Sekretion des CL kontinuierlich absinkt (Hoffmann, 1999; Niswender et al., 2000). Auch nach  $\text{P}_4$ -Supplementation konnten Chagas e Silva et al. (2008) keine Beziehung zwischen der embryonalen Überlebensrate und der  $\text{P}_4$ -Konzentration zwischen den Tagen 7 bis 25 post inseminationem feststellen.

Im Gegensatz dazu wiesen Ashworth et al. beim Schaf (1989), Jindal et al. bei der Ziege (1996) und Mann und Lamming beim Rind (2001), eine Beeinflussung des embryonalen Wachstums und Überlebens durch die  $\text{P}_4$ -Konzentration während der Frühträchtigkeit nach. Mann und Lamming (2001) stellten an den Tagen 5 bis 16 nach erfolgreicher Insemination von Kühen eine erhöhte  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration fest, im Vergleich zu Kühen bei welchen kein Embryo nach Insemination gefunden wurde. Almeida et al. (2000) vermuten das  $\text{P}_4$  konzentrationsabhängig die embryonale Überlebensrate verbessert.

Beim Schwein fanden (O'Leary et al., 2006) allein durch die intrauterine Injektion von Seminalplasma deutliche Unterschiede in der  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration an den Tagen 5 bis 9 post inseminationem im Vergleich zu Sauen welchen PBS injiziert wurde.

### **1.3 Einfluss der Angiogenese und der lutealen Durchblutung auf die Funktion des Corpus luteum**

Die physiologische Entwicklung und Funktion des CL ist stark abhängig von der Einsprossung neuer Gefäße (Angiogenese) sowie einer hohen Durchblutungsrate (Berisha und Schams, 2005; Dickson et al., 2001), um Nährstoffe heran und Stoffwechselmetaboliten abzutransportieren. In Folge dessen ist im ausdifferenzierten CL fast jede parenchymale Zelle in Kontakt mit einer oder mehreren Kapillaren (Abulafia und Sherer, 2000). So steigt der luteale Blutfluss an den Tagen 2 bis 5 p.ov. gleichzeitig mit dem Volumen des CL und der P<sub>4</sub>-Plasmakonzentration an (Acosta et al., 2003). Abgeschlossen ist die Angiogenese des CL an den Tagen 8 bis 12 p.ov. (Schallenberger et al., 1984). Für die Entwicklung dieses dichten Netzwerkes aus Kapillaren sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren notwendig, welche die Proliferation, Migration und Differenzierung von v.a. Endothelzellen auf autokrine oder parakrine Weise steuern. Die bedeutendsten Faktoren sind dabei der Insulin-like growth factor, der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und der Fibroblast growth factor (Berisha und Schams, 2005; Skarzynski et al., 2008).

Shirasuna et al. (2008) beschreiben morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen peripheren und zentralen Bereichen im Blüte CL. So wiesen die Autoren immunhistochemisch eine höhere Zahl großer Blutgefäße mit einem Durchmesser von mehr als 20 µm in der Peripherie des Blüte CL nach (Shirasuna et al., 2008). Auch stieg nach PGF<sub>2α</sub>-Injektion die Genexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) in der Peripherie, gegenüber dem Zentrum an (Shirasuna et al., 2008). Stickstoffmonoxid führt zur Relaxation der Gefäße. Auch eine erhöhte Durchblutung wiesen die Autoren dopplersonographisch nach PGF<sub>2α</sub>-Injektion in der Peripherie, im Vergleich zum Blutfluss vor PGF<sub>2α</sub>-Applikation nach (Shirasuna et al., 2008).

Auch Endothelzellen, welche in Form von Kapillaren im Blüte-CL zu fast jeder einzelnen Lutealzelle Kontakt haben (Redmer und Reynolds, 1996), üben durch die von ihnen gebildeten Substanzen (siehe 1.5 und 1.6) direkten Einfluss auf die P<sub>4</sub>-Synthese aus (Hayashi et al., 2002). Zudem sahen Berisha und Schams (2005) einen direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der P<sub>4</sub>-Synthese und der Genexpression von Angiopoetin-1 und -2 sowie dem VEGF.

## **1.4 Zyklusabhängige Besiedelung des Corpus luteum durch Immunzellen**

Leukozyten besiedeln das CL vieler Spezies (Bukovsky, 2006; Lawler et al., 1999; Standaert et al., 1991), so auch beim Rind (Skarzynski et al., 2008). Dabei gelangen Leukozyten über das Blut zum CL, binden an Endothelzellen und wandern anschließend in das Gewebe ein. Spanel-Borowski et al. (1997) zählten die lutealen Leukozyten während der Anbildungsphase, der Blütephase und der Regression im bovinen CL durch immunhistochemische Färbung von zellspezifischen Oberflächenmolekülen (Spanel-Borowski et al., 1997). Die Autoren wiesen so einen stetigen Anstieg der Anzahl von Leukozyten, im Verlaufe des gesamten Zyklus, nach. Diese Immunzellen bestehen aus verschiedenen Unterarten, welche in Abhängigkeit vom Zyklusstadium das CL besiedeln (Bauer et al., 2001). Viele Autoren beschrieben eine massive Migration einzelner Leukozytensubpopulationen, vor allem während der Anbildung und der Regression bei verschiedenen Spezies (Hameed et al., 1995; Lei et al., 1991) und auch beim Rind (Bukulmez und Arici, 2000; Townson, 2006). Leukozyten beeinflussen direkt oder durch die von ihnen gebildeten Mediatoren, die sich im Verlaufe des Zyklus ändernden Strukturen des CL, sowie die luteale P<sub>4</sub>-Synthese. Im Folgenden werden alle beteiligten Leukozytensubpopulationen vorgestellt. Auf die Faktoren, welche zu einer Einwanderung von Leukozyten in das CL führen, wird im Abschnitt 1.6 genauer eingegangen.

### **1.4.1 Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten (Eosinophile) sind multifunktionelle Leukozyten, welche an der Pathogenese einer Vielzahl von Entzündungsprozessen, wie der Abwehr von Parasiten und allergischen, sowie asthmatischen Reaktionen beteiligt sind (Bignold, 1995; Walsh, 1997). So wandert diese Leukozytensubpopulation bei Entzündungsprozessen massiv in unter physiologischen Verhältnissen kaum von Eosinophilen besiedeltes Gewebe ein (Vogel et al., 2005). Nur wenige Organe enthalten unter physiologischen Bedingungen eine gewisse Anzahl von Eosinophilen. Zu ihnen zählen die Milz, Lymphknoten, der Thymus, der Gastrointestinaltrakt und das Ovar (Kato et al., 2001). In das CL gelockt werden die im Blut zirkulierenden Eosinophilen durch chemoattraktive Substanzen (Chemokine), welche v.a. von Endothelzellen gebildet werden. Beim Rind wird dies hauptsächlich durch das Chemokin „regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted“ (RANTES, siehe 1.6.1) übernommen (Aust et al., 1999)

Reibiger und Spanel-Borowski (2000) untersuchten mittels histologischer Färbungen den Anteil an Eosinophilen an den lutealen Leukozyten während der Anbildung, der Blüte und der

Regression, von CL frisch geschlachteter Rinder unbekannter Herkunft. Die Autoren stellten dabei einen im Verlaufe des Zyklus sinkenden Anteil von Eosinophilen an der Gesamtanzahl an Leukozyten im CL fest. So waren während der Anbildungsphase 90 % Eosinophile vorhanden. Während der Sekretionsphase sank deren Anteil auf 30 % und zum Zeitpunkt der Luteolyse waren nur 10 % der sich im CL befindenden Leukozyten eosinophile Granulozyten.

Auch Rohm et al. (2002) fanden Hinweise, welche eine verstärkte Einwanderung von Eosinophilen kurz nach der Ovulation bestätigten. Als Probenmaterial dienten den Autoren CL-tragende Ovarien unbekannter Rinder, welche kurz zuvor im Schlachthof getötet wurden. Immunhistochemisch wurde eine erhöhte Proteinexpression von Selektinen in lutealen Leukozyten und Endothelzellen nachgewiesen (Rohm et al., 2002), welche die Bindung von Eosinophilen an die Gefäßwand und eine anschließende Migration der Zellen in das Gewebe ermöglichen. Über die Funktion der Eosinophilen im CL gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse. So vermuteten Murdoch und Steadman (1991), dass Eosinophile beim Schaf zum Zeitpunkt der Ovulation eine Rolle beim Abbau der Follikelwand und der Vaskularisation des sich anschließend bildenden CL spielen. Für ihre Untersuchung behandelten die Autoren Schafe vor der Ovulation mit Prednisolon, was eine Degranulierung der zirkulierenden Eosinophilen zur Folge hatte. Zwar ovulierten die behandelten Schafe, jedoch erwies sich die  $P_4$ -Plasmakonzentration und die luteale Gefäßausbildung niedriger als bei unbehandelten Tieren (Murdoch und Steadman, 1991).

Espey (1980) ist der Ansicht, dass der Prozess der Ovulation eine „physiologische Inflammation“ darstellt und sich aus diesem Grunde viele Eosinophile während der periovulatorischen Phase im CL befinden (Reibiger und Spänel-Borowski, 2000).

Ein zweiter Influx von Eosinophilen zum Beginn der Luteolyse, wie er bereits beim Schaf nach  $PGF_{2\alpha}$ -induzierter Luteolyse (Murdoch und Steadman, 1991) nachgewiesen wurde, ist im bovinen CL nicht erkennbar (Reibiger und Spänel-Borowski, 2000). Auch bei der Sau kommt es während des Zyklus sowohl zum Zeitpunkt der Ovulation, als auch während der spontan eintretenden Luteolyse zu einem Einstrom von Eosinophilen in das CL (Standaert et al., 1991). Bei der Stute wiesen Lawler et al. (1999) eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen nach  $PGF_{2\alpha}$ -induzierter Luteolyse im CL nach. Jedoch waren im Vergleich dazu, die Zahl der Eosinophilen zum Zeitpunkt der natürlichen Luteolyse, an den Tagen 16 und 17 p.ov., geringer (Lawler et al., 1999). Die Autoren vermuten daher einen durch die exogene Gabe von  $PGF_{2\alpha}$  induzierten Einstrom von Eosinophilen in das CL.

Bei der Frühträchtigkeit der Stute wiesen Lawler et al. (1999) Eosinophile im CL in geringer Anzahl als an den Tagen 12 bis 14 p.ov. nach. Dabei stellten die Autoren eine erfolgreiche Trächtigkeit mittels Ultraschall an den Tagen 20 bis 50 p.c. fest und entnahmen anschließend operativ das CL-tragende Ovar. Ob Eosinophile auch während der Trächtigkeit im bovinen CL vorhanden sind, wurde bislang nicht untersucht.

#### **1.4.2 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten (Neutrophile) sind hoch spezialisierte, kurzlebige Phagozyten, deren Hauptaufgabe darin besteht, mikrobielle Erreger zu phagozytieren und abzutöten. Sie gelten u.a. als Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems bei bakteriellen Infektionen (Paape et al., 2003). Neben den Lymphozyten bilden Neutrophile die zweithäufigste Fraktion (25 bis 45%) des Differentialblutbildes beim Rind (Tizard, 2008). Weder im CL, noch in anderen Strukturen des Ovars, wurde die Anwesenheit von Neutrophilen bisher beim Rind belegt.

Bei der Stute (Al-Zi'abi et al., 2002) und bei der Ratte (Brannstrom et al., 1994) wird eine Beteiligung von Neutrophilen an der Luteolyse vermutet. Al-Zi'abi et al. (2002) belegten immunhistochemisch eine große Anzahl an Neutrophilen im CL 12 und 36 Stunden nach PGF<sub>2α</sub>-Injektion, im CL am Tag 12 p.ov.. Im Vergleich dazu wiesen die Autoren an den Tagen 3 und 4, sowie 10 und 14 p.ov. Neutrophile nur vereinzelt und am Tag 17 p.ov. in etwas größerer Anzahl nach.

Auch bei der Ratte sind Neutrophile vermutlich an der Luteolyse beteiligt (Pepperell et al., 1992), da durch die Gabe von immunsuppressiv wirkendem Dexamethason die Funktion von Neutrophilen unterdrückt und in Folge dessen die Luteolyse blockiert werden kann (Wang et al., 1993). Andererseits kommen Neutrophile aber auch während des gesamten Zyklus und der Trächtigkeit im Ovar der Ratte vor (Brannstrom et al., 1994). So bilden Neutrophile zusammen mit Makrophagen bei Trächtigkeit und der Pseudotächtigkeit der Ratte die größte Population an Immunzellen im CL (Brannstrom et al., 1994). Ihre maximale Anzahl wurden im CL graviditatis am Tag 10 p.ov. und im CL pseudogaviditatis am Tag 9 p.ov. immunhistochemisch nachgewiesen (Brannstrom et al., 1994). Bei der Frau wurden Neutrophile in der Wand des dominanten Follikels zum Zeitpunkt der Ovulation (Zeineh et al., 2003) nachgewiesen.

Belege über chemoattraktive Substanzen, welche Neutrophile in das Ovar anlocken, wurden bisher nur bei der Frau gefunden. Diese spezifischen Mediatoren sind das Growth-regulated oncogene  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ , siehe 1.6.3), Interleukin-8 (1.6.2) und Interleukin-1 (Zeineh et al., 2003).

Brannstrom et al. (1994) vermuten, dass es bisher allein aufgrund der im Vergleich zu anderen Leukozyten aufwändigeren Nachweismethode von Neutrophilen im CL, noch keine Belege für das Vorhandensein dieser Immunzellen bei weiteren Spezies gibt.

### **1.4.3 Monozyten und Makrophagen**

Makrophagen sind Phagozyten, welche sich aus Monozyten nach Einwanderung in einen Gewebeverband differenzieren (Wu et al., 2004). Während der Anbildungs- und der Blütephase konnten Bauer et al. (2001) durch immunhistochemische Färbungen nur eine sehr geringe Anzahl von Makrophagen im bovinen CL nachweisen. Im Gegensatz dazu sind an den Tagen 12 und 18 p.ov. Monozyten und Makrophagen die dominierende Leukozytenpopulation des bovinen CL, gefolgt von den Lymphozyten (Townson et al., 2002).

Jedoch nicht alle eingewanderten Monozyten differenzieren sich nach Eintritt in das Gewebe zu Makrophagen. So untersuchten Townson et al. (2002) den Anteil von Monozyten im Vergleich zu Makrophagen an den Tagen 6, 12 und 18 p.ov. im bovinen CL. Zu allen drei Zeitpunkten lag der Anteil der inaktiven Monozyten signifikant höher im Vergleich zu den Makrophagen. Die Autoren folgerten daraus, dass die Rekrutierung von Immunzellen bereits zu diesem Zeitpunkt in Zusammenhang mit der erst einige Tage später beginnenden Luteolyse steht (Townson et al., 2002). Monozyten migrierten zahlreich an den Tagen 11 bis 17 p.ov. aus kleinen Blutgefäßen zwischen die Septen des CL, wo sie sich während der späten Regression zu Makrophagen differenzieren (Bauer et al., 2001). Den weitaus größten Anteil von Makrophagen (95 %), an der Gesamtzahl an proliferierenden lutealen Leukozyten, zählten Bauer et al. (2001) zum Zeitpunkt der späten Regression, an den Tagen 19 bis 20 p. ov..

Auch bei der Frau stellten Duncan et al. (1998) eine signifikant größere Anzahl von Makrophagen während der Regression im Vergleich zur Blütephase fest. Auch Lawler et al. (1999) wiesen bei der Stute eine höhere Anzahl an Makrophagen zum Zeitpunkt der Luteolyse, an den Tagen 16 und 17 p.ov. nach. So lagen im Vergleich dazu an den Tagen 2 bis 4 p.ov., 7 bis 10 p.ov. und 12 bis 14 p.ov. die Anzahl an Makrophagen niedriger. Im Gegensatz dazu zählten Townson et al. (2002) beim Rind bereits am Tag 12 p.ov. eine signifikant größere Anzahl an Monozyten und Makrophagen, im Vergleich zu Tag 6 p.ov..

Makrophagen sind einerseits durch ihre hohe Phagozytoseleistung direkt an der Reinigung von zellulärem Debris beteiligt, welches während der strukturellen Luteolyse entsteht (Kato et al., 2005; Penny, 2000; Wu et al., 2004), andererseits beeinflussen sie durch die von ihnen sezernierten Zytokine und Chemokine (siehe 1.5 und 1.6) die P<sub>4</sub>-Sekretion und das Überleben

der Lutealzellen (Bauer et al., 2001; Wu et al., 2004). Zu den von Makrophagen sezernierten Zytokinen gehören TNF- $\alpha$  (Sakumoto und Okuda, 2004); siehe 1.5.1), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 und Interleukin 8 (1.6.2).

Duncan et al. (1998) vermuten eine überwiegend luteolytische Funktion der von Makrophagen stammenden Sekretionsprodukte, da sie während der simulierten Frühschwangerschaft der Frau in geringerer Anzahl als zum Zeitpunkt der Luteolyse vorkommen. Im Rahmen ihres Versuchs applizierten die Autoren zyklischen Frauen humanes Choriongonadotropin (hCG). Auf diesem Wege simulierten sie das Signal zur maternalen Erkennung des Embryos (hCG) und entnahmen anschließend Gewebe aus dem CL. Die Autoren zählten eine signifikant niedrigere Anzahl von Makrophagen bei zuvor mit hCG behandeltem CL-Gewebe, als in Gewebe, welches zu Beginn der lutealen Regression dem CL entnommen wurde. Duncan et al. (1998) vermuten daher eine durch hCG verursachte Reduzierung der Makrophagen im humanen CL während der Frühschwangerschaft, welche zur Erhaltung der Sekretionsphase beiträgt.

Ein weiterer Hinweis auf die luteolytische Wirkung von Makrophagen und deren Sekretionsprodukte ist die Tatsache, dass es nach Entfernung von Makrophagen durch eine Milzresektion bei pseudoträchtigen Kaninchen zu einer signifikant längeren Lutealfunktion kam (Endo und Kanayama, 1998). Im Gegensatz dazu sprechen Pate und Keyes (2001) Makrophagen und den von ihnen gebildeten Sekretionsprodukten nicht nur eine luteolytische, sondern auch eine luteotrope Funktion zu. So konnte in einer humanen Granulosazellkultur nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Peritoneal-Makrophagen zu einer erhöhten P<sub>4</sub>-Synthese führte (Halme et al., 1985).

#### **1.4.4 Lymphozyten**

Lymphoide Zellen lassen sich grob in drei Zelltypen unterscheiden. Die im Thymus geprägten T- Lymphozyten sind ein wichtiger Teil der zellulären Immunantwort nach Infektionen. Im Knochenmark entstehende und selektionierte B-Lymphozyten sind durch die Produktion von Antikörpern an der Immunabwehr beteiligt (Janeway et al., 2005). Als dritte Gruppe lymphoider Zellen erkennen natürliche Killerzellen Tumor- und virusinfizierte Zellen und töten diese ab.

Townson et al. (2002) untersuchten das Vorkommen von Lymphozyten im bovinen CL an den Tagen 6, 12 und 18 p.ov. In allen drei Zyklusphasen wurden von den Autoren T-Lymphozyten gefunden, wobei eine signifikant größere Anzahl an den Tagen 12 und 18 p. ov. im Vergleich zum Tag 6 p. ov. gezählt wurde (Townson et al., 2002).



Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass der Anstieg der Zahl von T-Lymphozyten, ähnlich zu den Verhältnissen bei den Makrophagen, mit der erst einige Tage später beginnenden Luteolyse in Verbindung steht (Townson et al., 2002). Eine Reihe von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) werden von T-Lymphozyten sezerniert. Sie unterdrücken in Lutealzellkulturen die P<sub>4</sub>-Synthese und können die PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Produktion anregen (Sakumoto und Okuda, 2004; Skarzynski et al., 2005).

Auch direkt können T-Lymphozyten Lutealzellen beeinflussen. So exprimieren Lutealzellen auf ihrer Oberfläche Proteine, welche eine Bindung von T-Lymphozyten ermöglicht. Eine Gruppe davon, die MHC-Klasse-II-Moleküle, wurden in vivo an den Tagen 6, 10 bis 12 und 18 p.ov. im bovinen CL nachgewiesen (Benyo et al., 1991). Ein höheres Genexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen wurden am Tag 18 p.ov., nach einer luteolytisch wirksamen PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe, im Vergleich zu Tag 6 p.ov. und Tag 18 p.c. gemessen (Benyo et al., 1991). Die Autoren vermuten daher eine Beteiligung von MHC-Klasse-II-Molekülen an der Luteolyse beim Rind. Petroff et al. vermuten eine gesteigerte Proliferation von T-Lymphozyten in Anwesenheit von MHC-Klasse-II-Molekülen (Petroff et al., 1997).

#### **1.4.5 Mastzellen**

Mastzellen sind gewebeständige Sensor- und Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie sind in vielen verschiedenen Organen und Geweben lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle bei Allergien und der systemischen Anaphylaxie (Tizard, 2008).

Beim Rind wurden durch histologische Färbungen mit Toluidin-Blau während des gesamten Zyklus keine Mastzellen im CL, den Follikeln und dem Rindenbereich des Ovars nachgewiesen (Reibiger und Spanel-Borowski, 2000). Allein im interstitiellen kortikalen Stroma und im Markbereich des Ovars konnten Mastzellen belegt werden. Dabei betrug ihr Anteil an allen Leukozyten, welcher im Verlaufe des Zyklus keinen Schwankungen unterlag, 60% bis 76 % (Reibiger und Spanel-Borowski, 2000).

Im Gegensatz dazu wiesen Nakamura et al. (1987) beim Rind in der Follikelwand, dem Randbereich des CL und im Ovarstroma, Mastzellen durch die gleiche histologische Nachweismethode, nach. Dabei untersuchten sie bovine Ovarien an den Tagen 4, 10 und 19 p.ö. Besonders viele Mastzellen zählten sie in der Wand des dominanten Follikels am Tag 19, im Vergleich zu nicht dominanten Follikeln, an den Tagen 4 und 10 (Nakamura et al., 1987).

Beim Hamster und der Ratte degranulierten Mastzellen zum Zeitpunkt der Ovulation unter dem Einfluss von LH und setzten Histamin frei (Krishna und Terranova, 1985; Tamura und Kogo, 1999). Szukiewicz et al. (2007) vermuten eine Beteiligung von Histamin an der Apoptose von Zellen.

## **1.5 Beteiligung von Zytokinen an der Sekretions- und Regressionsphase des Corpus luteum**

Zytokine stellen einen Sammelbegriff für eine Vielzahl von Substanzen dar, die durch verschiedene Zellarten gebildet und sezerniert werden. Als interzelluläre Mediatoren steuern sie immunologische Regelkreise (Akhawi-Araghi, 2005).

Sie können von jeder kernhaltigen Zelle des Körpers freigesetzt werden und üben auf Zellen mit spezifischen Rezeptoren verschiedenste biologische Effekte aus. Zytokine sind zellregulatorische Eiweiße und haben ein Molekulargewicht von 8 bis 40 Kilo Dalton (kDa). Sie werden lokal produziert, haben sehr kurze Halbwertszeiten und sind schon in pikomolaren Konzentrationen wirksam (Akhawi-Araghi, 2005). Zytokine können autokrin, parakrin oder endokrin wirken. Letzteres hängt von ihrer Halbwertszeit ab und ob sie in den Kreislauf gelangen (Janeway et al., 2005).

Eine Vielzahl von Zytokinen wurde bereits mit der Regulation der lutealen  $P_4$ -Synthese und der Luteolyse in Verbindung gebracht. Zu den bekanntesten Vertretern zählen die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ , welche verstärkt während Entzündungsprozessen sezerniert werden (Janeway et al., 2005).

Im CL werden sie von Endothelzellen und Makrophagen gebildet. Einige Autoren sind der Ansicht, dass Zytokine eine entscheidende Rolle während der Luteolyse spielen (Pate und Keyes, 2001; Skarzynski et al., 2005). So unterdrücken TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  die  $P_4$ -Synthese und führen zu einer erhöhten lutealen PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Produktion (Neuvians et al., 2004; Townson und Pate, 1996). Nach Neuvians et al. (2004) beeinflussen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  die funktionelle Luteolyse. So wiesen die Autoren einen signifikanten Anstieg der Genexpression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im bovinen CL nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter Luteolyse an den Tagen 8 bis 12 p. ov., im Vergleich zu unbehandelten Kühen nach (Neuvians et al., 2004). Dazu entfernten die Autoren das CL tragende Ovar 2, 4, 12, 48, und 64 Stunden nach der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation. Bereits 2 Stunden nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation wurde ein signifikanter Anstieg der Zytokine beobachtet. Besonders intensiv erforscht wurde in den letzten Jahren der Einfluss

von TNF- $\alpha$  auf die P<sub>4</sub>-Synthese des CL. Dieses Zytokin wird daher im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.5.1 Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$

Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  ist ein von Makrophagen produziertes (Pate und Keyes, 2001), nicht glykosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, welches nach seiner Fähigkeit Tumorzellen abzutöten benannt wurde (Carswell et al., 1975). Dabei ist TNF- $\alpha$  eines der ersten Zytokine, welches am Beginn einer Entzündungsreaktion im Körper freigesetzt wird (Janeway et al., 2005). Lokal erhöht TNF- $\alpha$  die Gefäßpermeabilität und erleichtert so die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe, systemisch kann es Fieber verursachen (Janeway et al., 2005). Auch an pathologisch bedingten Gefäßeinsprossungen (Gardiner et al., 2005), wie der Endometriose der Frau ist TNF- $\alpha$  beteiligt. So wiesen Falconer et al. (2006) durch Gabe von TNF- $\alpha$  Antikörpern eine Reduzierung der Ausbreitung der Endometriose beim Affen nach.

Hoeben et al. (2000) wiesen 10 Stunden nach intramammärer Infektion des Euters mit *E. coli* bei laktierenden Kühen eine erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$  im Blutplasma von im Mittel 6 ng/ml nach. Wurden die Tiere gleichzeitig mit Antibiotika behandelt, stieg der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Blutplasma auf nur 3 ng/ml. Im Vergleich dazu lag vor Beginn der Behandlung lag der TNF- $\alpha$ -Plasmagehalt bei 0,5 ng/ml (Hoeben et al., 2000).

Nach Studien von Skarzynski et al. beeinflusst TNF- $\alpha$  die Zykluslänge beim Rind (Skarzynski et al., 2003; Skarzynski et al., 2007). Ob TNF- $\alpha$  dabei eine lutelytische oder eine luteotrope Wirkung hatte war von der Dosis abhängig. Skarzynski et al. (2007) infundierten HF-Kühen am Tag 14 p.ö. TNF- $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen über die Aorta abdominalis an der Abzweigung der Ovararterie (Skarzynski et al., 2007). Die Infusion von 10 ng/ml und 100 ng/ml TNF- $\alpha$  hatte eine starke Senkung der P<sub>4</sub>-Sekretion und eine Verkürzung der Zykluslänge zur Folge. Hohe Mengen an TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/ml bis 50  $\mu$ g/ml) stimulierten dagegen die P<sub>4</sub>- und PGE<sub>2</sub>-Sekretion und unterdrückten die Leukotrien C<sub>4</sub>-Sekretion, was zu einer Verlängerung des Zyklus um neun Tage führte (Skarzynski et al., 2007). Vermutlich wirkt TNF- $\alpha$  über den Arachidonsäurestoffwechsel, da durch die Infusion von Indomethacin, einem Cyclooxygenase-Inhibitor, die Wirkung von TNF- $\alpha$  blockiert wurde (Okuda et al., 2004).

Shaw und Britt (1995) zeigten in vivo einen Anstieg von TNF- $\alpha$  nach spontaner und induzierter Luteolyse bis 48 Stunden nach dem Beginn der Regression nach, jedoch erst nach einem initialen Abfall der P<sub>4</sub>-Sekretion. Die Autoren hatten dazu bei nicht laktierenden HF-Kühen

zwischen den Tagen 12 und 16 p.ö. ein Mikrodialysesystem (MDS) implantiert. Warum erst nach Abfall der  $P_4$ -Konzentration der TNF- $\alpha$ -Gehalt des Dialysates absank, ist unklar. Die Autoren vermuten einen langsameren Transport von TNF- $\alpha$  innerhalb des CL zur Dialysemembran, im Vergleich zu  $P_4$  (Shaw und Britt, 1995).

Die Genexpression von TNF- $\alpha$  wurde in allen Zyklusstadien sowie während der Trächtigkeit in bovinen Luteal- und Endothelzellen nachgewiesen (Petroff et al., 1999; Sakumoto et al., 2000). Erlebacher et al. (2004) vermuten eine Beteiligung von TNF- $\alpha$  an der Fruchtresorption bei der Maus. Die Autoren injizierten dazu täglich an den Tagen 5 und 8 p.c. CD40, ein Rezeptor, welcher an der Zell-vermittelten Immunantwort von TNF- $\alpha$  beteiligt ist. An beiden Versuchstagen sank 24 Stunden p.i. die  $P_4$ -Plasmakonzentration so stark, dass es in 100 % der Fälle zu einem Abbruch der Trächtigkeit kam. Auch Bagavandoss et al. (1990) zeigten eine verstärkte Sekretion von TNF- $\alpha$ , nach Exposition mit Lipopolysacchariden (LPS) bei Kaninchen während der Luteolyse, im Vergleich zu trächtigen und pseudoträchtigen Tieren. Dazu entnahmen die Autoren am Tag 5 der Trächtigkeit und der Pseudoträchtigkeit, sowie am ersten Tag post partum, die Ovarien und inkubierten diese CL mit LPS. Während es bei den CL graviditatis und pseudograviditatis zu einem 2 bis 4fachen Anstieg der TNF- $\alpha$  Sekretion kam, stieg diese in den CL vom ersten Tag post partum um das 10 bis 30fache an (Bagavandoss et al., 1990).

Von anderen Gewebearten ist bekannt, dass sowohl TNF- $\alpha$  (Leibovich et al., 1987), als auch  $PGE_2$  (Form und Auerbach, 1983) die Proliferation von Endothelzellen beeinflussen. Sakumoto und Okuda (2004) vermuten daher, dass während der Anbildung des CL TNF- $\alpha$  eine positive Wirkung auf die Angiogenese und die  $P_4$ -Synthese ausüben könnte. TNF- $\alpha$  wirkt luteotrop, indem es die Synthese von  $PGE_2$  bei lutealen Endothelzellkulturen *in vitro* induziert (Okuda et al., 1999).

Während der Blütephase und der Regression wiesen Sakumoto et al. (2000) einen Anstieg der Genexpression von TNF- $\alpha$  in CL, welche von Ovarien geschlachteter Rinder stammten, im Vergleich zu Anbildungs-CL nach. Die Autoren fanden eine höhere Genexpression von TNF- $\alpha$  während der Regressions- als in der Anbildungsphase. Sakumoto und Okuda (2004) vermuten daher eine luteolytische Wirkung von TNF- $\alpha$ .

Auch nach  $PGF_{2\alpha}$ -induzierter Luteolyse wiesen Neuvians et al. (2004) und Kliem et al. (2008) einen signifikanten Anstieg der Genexpression von TNF- $\alpha$  bei Kühen an den Tagen 8 bis 12 p.ov. nach. Warum die Wirkung von TNF- $\alpha$  während des Zyklus von luteotrop auf luteolytisch wechselt ist jedoch unbekannt. Verschiedene Autoren vertreten die Auffassung, dass erst

das Zusammenspiel von TNF- $\alpha$  mit anderen Faktoren eine luteolytische Wirkung hervorruft (Benyo und Pate, 1992; Petroff et al., 2001).

So konnte nur dann eine Reduzierung der P<sub>4</sub>-Synthese in Lutealzellkulturen festgestellt werden, wenn TNF- $\alpha$  zusammen mit IFN- $\gamma$  über einen Zeitraum von 7 Tagen auf die Zellen einwirkte (Benyo und Pate, 1992). Eine Inkubation der Lutealzellkulturen allein mit TNF- $\alpha$  führte zu keine Reduzierung der P<sub>4</sub>-Synthese. Diese Abnahme der P<sub>4</sub>-Synthese beruht auf einer zytotoxischen Wirkung von TNF- $\alpha$  in Kombination mit IFN- $\gamma$  auf Lutealzellen (Benyo und Pate, 1992).

Im Gegensatz dazu starben bei einer Untersuchung von Petroff et al. (2001) die Lutealzellen bereits 48 Stunden nach Beginn der Inkubation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ab. Die luteale P<sub>4</sub>-Synthese wurde von den Autoren bei diesem Versuch nicht bestimmt. Sowohl Benyo und Pate (1992), als auch Petroff et al. (2001) separierten die Lutealzellen aus CL die sich in der Blütephase befanden. Über die Wirkung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf Lutealzellen, welche nicht aus dem Gewebeverband separiert wurden, gibt es keine Untersuchungen.

## **1.6 Beteiligung von Chemokinen an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des Corpus luteum, sowie der Luteolyse**

Chemokine stellen eine Superfamilie strukturell verwandter Zytokine dar, welche in den ersten Phasen einer Infektion im betroffenen Gewebe freigesetzt werden um Immunzellen anzulocken (Janeway et al., 2005). Chemokine induzieren u.a. auf Endothelzellen die Expression von Selektinen, an welche im Blut zirkulierende Leukozyten binden, sich zwischen die Endothelzellen schieben und in das Gewebe einwandern (DeVries et al., 1999). Weiterhin bewirken Chemokine eine Aktivierung der angelockten Leukozyten im Gewebe (Rainard et al., 2008; Townson und Liptak, 2003).

Im Ovar sind chemoattraktive Zytokine an der Ovulation, der CL-Entwicklung und der Luteolyse beteiligt (Bornstein et al., 2004; Kliem et al., 2007; Townson und Liptak, 2003). Dabei werden aufgrund der vermehrten Einwanderung und Aktivität von Leukozyten sowohl die Ovulation (Espey, 1980), als auch die Luteolyse (Bauer et al., 2001; Neuvians et al., 2004; Pate und Keyes, 2001) mit den während einer Entzündungsreaktion stattfindenden Vorgängen verglichen.

Alle Chemokine zeigen eine ähnliche Struktur. Sie besitzen konservierte Cysteinreste nahe der aminoterminalen Region. Diese Position der Cysteinreste ist die Basis für die Klassifika-

tion der Chemokine in vier Familien. Die –CXC-, oder  $\alpha$ -Chemokinfamilie, enthält eine Aminosäure (X), welche zwei der vier Cysteinreste separiert. Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist das Interleukin-8 (CXCL8), welches u.a. von Endothelzellen zur Anlockung von Neutrophilen ausgeschüttet wird. Im Gegensatz dazu hat die –CC- oder  $\beta$ -Chemokinfamilie zwei benachbarte Cysteinreste. Ein Mitglied dieser Familie ist z.B. das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), welches Monozyten und T-Lymphozyten anlockt (Townson, 2006).

### **1.6.1 Chemokin zur Anlockung von Eosinophilen**

Das chemoattraktive Zytokin RANTES gehört zur  $\beta$ -Chemokinfamilie und hat daher die Bezeichnung CCL5. Es bewirkt eine Anlockung von v.a. Eosinophilen, aber auch Monozyten in das CL und in den dominanten Follikel der Frau (Aust et al., 2000) und des Rindes (Aust et al., 1999).

Kliem et al. (2007) vermuten eine Beteiligung von CCL5 an der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Luteolyse beim Rind. Die Autoren untersuchten hierfür die Genexpression von CCL5 in CL, welche sie operativ von Kühen an den Tagen 8 bis 12 p.ov. entweder sofort nach der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation oder nach 30 min, sowie 2, 4, 12, 24, 48 und 64 Stunden entnahmen. Bereits bei Kühen, welchen nach 30 min das CL-tragende Ovar entnommen wurde, konnten Kliem et al. (2007) einen Anstieg der Genexpression von CCL5 im Vergleich zu sofort ovariectomierten Tieren messen. Dieser Anstieg erreichte sein Maximum nach 2 Stunden und blieb bis zum Ende der Untersuchungszeit bestehen. Die Autoren vermuten, dass diesem, zum Zeitpunkt der funktionellen Luteolyse stattfindenden Anstieg der Genexpression, eine verstärkte Migration von Eosinophilen folgt (Kliem et al., 2007).

Aust et al. (1999) wiesen die Synthese von CCL5 in residenten Makrophagen zum Zeitpunkt der Ovulation beim Rind immunhistochemisch nach. Auch in humanen Granulosazellkulturen, welche aus Follikelflüssigkeit gewonnen wurden, konnten Aust et al. (2000) die Genexpression von CCL5 Protein nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten Karstrom-Encrantz et al. (1998) kein CCL5-Protein im Kulturmedium, welches mit humanen Granulosazellen inkubiert wurde, feststellen. Ob CCL5 während der Trächtigkeit exprimiert wird, wurde bisher bei keiner Spezies untersucht.

### **1.6.2 Interleukin-8**

Interleukin-8 ist ein Mitglied der CXC- Familie. Daher wird dieses Chemokin auch als CXCL8 bezeichnet. Es wird von Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endo-

thelzellen gebildet. Im Rahmen einer entzündlichen Reaktion wird CXCL8 von Makrophagen sezerniert und lockt v.a. Neutrophile, aber auch auf basophile Granulozyten und T-Zellen aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe an (Janeway et al., 2005). CXCL8 ist zudem an der Proliferation und der Neubildung vaskulärer Strukturen beteiligt (Koch et al., 1992).

Bisher wurde CXCL8 beim Rind weder im CL, noch in anderen Strukturen des Ovars nachgewiesen. Jedoch ist CXCL8 an entzündlichen Prozessen des Rindes beteiligt (Fitzgerald et al., 2007; Rainard et al., 2008). Fitzgerald et al. (2007) zeigten eine erhöhte Genexpression dieses Chemokins in Euterepithelzellkulturen, wenn diese zusammen mit TNF- $\alpha$  inkubiert wurden. Ob CXCL8 endokrin die P<sub>4</sub>-Synthese beeinflussen kann, ist nicht bekannt.

Im CL der Hündin wurde die Genexpression von CXCL8 im Verlauf des Diöstrus ohne zyklusbedingte Variationen nachgewiesen (Engel, 2004). Es wurden dazu Hündinnen unterschiedlicher Rassen und unterschiedlichen Alters im Diöstrus an den Tagen 5, 15, 25, 45 und zwischen Tag 60 und 80 p.ov. ovariectomiert. Die Autorin vermutet, dass CXCL8 als Wachstumsfaktor die Angiogenese im CL cyclicum fördern könnte (Engel, 2004).

Auch an der Ovulation der Frau ist CXCL8 vermutlich beteiligt (Arici et al., 1996). So enthält die Follikelflüssigkeit der Frau zum Zeitpunkt der Ovulation einen 14-fach höheren Gehalt an CXCL8 als das Blutserum, wobei die Konzentration von CXCL8 im Follikel mit der des Serums korreliert. Des Weiteren besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Größe des Follikels und dessen CXCL8-Gehalt (Arici et al., 1996). Auch Assou et al. (2006) stellten eine hohe Expressierung von CXCL8 in humanen Kumuluszellen zum Zeitpunkt der Ovulation fest.

Des Weiteren wurde nach Inkubation von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  in humanen Granulosa-Luteinzell-Kulturen, vermehrt das CXCL8-Protein nachgewiesen (Zeineh et al., 2003). Da IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  pro-inflammatorische Zytokine sind, wurde daraus geschlossen, dass die Ovulation bei der Frau einen entzündungsähnlichen Prozess darstellt. Auch in humanen Ovarstroma-Zellkulturen wurde die Genexpression von CXCL8 nachgewiesen. Durch die Gabe von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  stieg die Genexpression von CXCL8 konzentrationsabhängig an (Arici et al., 1996).

Neuvians et al. (2004) beschrieben auch die Regression des bovinen CL als einen inflammatorischen Prozess. Jedoch wurden keine Untersuchungen zum Einfluss von CXCL8 bei der Luteolyse durchgeführt. Auch ist nicht bekannt ob CXCL8 während der Trächtigkeit des Rindes eine Rolle spielt.

### **1.6.3 Growth-regulated oncogene- $\alpha$**

Ein weiteres Chemokin der CXC- Familie, welches chemoattraktiv auf Neutrophile und T-Zellen wirkt, ist CXCL1 (Janeway et al., 2005). Dieses Chemokin, welches u.a. auch Growth-regulated oncogene- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ) bezeichnet wird, wird ähnlich zu CXCL8 verstärkt während entzündlicher Prozesse sezerniert. So wurde eine erhöhte Proteinexpression von CXCL1 in der Milch von Kühen nachgewiesen, welche 4 Stunden zuvor intramammär mit Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien behandelt wurden (Rainard et al., 2008). Auch wurde CXCL1 mit der Angiogenese von humanen Ovarzelltumoren in Verbindung gebracht (Lee et al., 2006)

Bisher wurde CXCL1 nur in Granulosa-Luteinzellen (Zeineh et al., 2003) und Kumuluszellen (Assou et al., 2006) der Frau nachgewiesen. Dort wird es, ähnlich wie CXCL8, mit inflammatorischen Prozessen während der Ovulation in Verbindung gebracht (Zeineh et al., 2003). Ähnlich zu CXCL8 ist die Konzentration von CXCL1 in der Follikelflüssigkeit der Frau im Vergleich zum Blutserum stark erhöht. So wird im Follikel ein 10-fach höherer Wert im Vergleich zum Blutserum gemessen (Karstrom-Encrantz et al., 1998). Zeineh et al. (2003) wiesen in humanen Granulosa-Luteinzellen eine Stimulation der Sekretion von CXCL1 durch TNF- $\alpha$  nach.

### **1.6.4 Monocyte chemoattractant protein-1**

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) wird auch als CCL2 bezeichnet, da es zur C-C Chemokinfamilie gehört. Es ist eines der potentesten Moleküle zur Anlockung und Aktivierung von Monozyten (Liptak et al., 2005). Bildungsorte des MCP-1 im CL sind u.a. Endothelzellen (Liptak et al., 2005), aber auch T-Lymphozyten, Fibroblasten und Lutealzellen (Penny, 2000).

Weit mehr als über die zuvor beschriebenen Chemokine, ist über die Beteiligung von MCP-1 an der Anbildung, Sekretion und Regression des bovinen CL bekannt. So wurde bereits von vielen Autoren ein Anstieg der MCP-1 Genexpression während der Blütephase des CL bei der Frau (Bukulmez und Arici, 2000), der Stute (Lawler et al., 1999) und beim Rind (Townson et al., 2002) festgestellt. Townson et al. (2002) untersuchten die Genexpression von MCP-1 nach operativer Entfernung des CL tragenden Ovars an den Tagen 6, 12 und 18 p.ov. Die Autoren fanden eine signifikant höhere Genexpression von MCP-1 im CL an den Tagen 12 und 18 p.ov. im Vergleich zu Tag 6. Ihre Ergebnisse stimmten mit dem gleichzeitig vermehrten Auftreten von Monozyten und Makrophagen im bovinen CL überein (siehe 1.4.3).



Stimuliert wird die Synthese und Sekretion von MCP-1 im bovinen CL durch PGF<sub>2α</sub>. So untersuchten Kliem et al. (2007) die Genexpression von MCP-1 in CL, welche sie operativ von Kühen an den Tagen 8 bis 12 p.ov., entweder sofort nach PGF<sub>2α</sub>-Applikation oder nach 30 min, sowie 2, 4, 12, 24, 48 und 64 Stunden entnommen hatten. Bereits bei Kühen, welchen nach 30 min das CL tragende Ovar entnommen wurde, konnte ein Anstieg der Genexpression von MCP-1 im Vergleich zu sofort ovariectomierten Tieren gemessen werden, der bis zum Ende des Untersuchungszeitraums anhielt (Kliem et al., 2007).

Jedoch ist die Induktion der MCP-1 Genexpression durch PGF<sub>2α</sub> von der Entwicklungsphase des bovinen CL abhängig. So applizierten Tsai et al. (1997) Kühen an den Tagen 4 und 11 p.ov. eine luteolytische Dosis PGF<sub>2α</sub> und entnahmen anschließend operativ das CL-tragende Ovar. Die Autoren stellten nur bei den CL von Tag 11 p.ov. einen Anstieg der MCP-1 Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Townson et al. (2002) ziehen daraus die Schlussfolgerung, dass Komponenten des immunologischen Prozesses der lutealen Regression, wie MCP-1, bereits am Tag 12 p.ov. im CL etabliert sind, aber erst später durch andere Faktoren wie PGF<sub>2α</sub> aktiviert werden. Dieses Szenario stimmt mit dem Model von Tsai und Wiltbank (1998) überein, in welchem die Fähigkeit des CL auf PGF<sub>2α</sub> in Form der Luteolyse zu reagieren, erst am Tag 12 p.ov. erreicht wird.

Der Anstieg der MCP-1 Genexpression nach Gabe von PGF<sub>2α</sub> wird als Beleg für die Beteiligung von MCP-1 an der bovinen Luteolyse angesehen (Kliem et al., 2007; Tsai und Wiltbank, 1998).

### **1.6.5 Macrophage inflammatory protein-3α**

Das macrophage inflammatory protein 3 α (MIP-3α), ist ein weiteres Mitglied der C-C Chemokinfamilie und wird nach neuerer Nomenklatur als CCL20 bezeichnet. Es wird in der Leber, von Neutrophilen und peripheren Blut-Lymphozyten nach IL-1β-Stimulus sezerniert (Townson und Liptak, 2003). Hauptsächlich wirkt es auf Lymphozyten und weniger auf Granulozyten chemotaktisch (Schutyser et al., 2000). Bei der bovinen Mastitis kommt es zu einem Anstieg der Genexpression von CCL20. So wies Meyer (2008) 24 Stunden nach Infektion des Euters mit *E.coli* oder *Staphylococcus aureus* einen signifikanten Anstieg der Genexpression von CCL20 im Vergleich zu Kontrolltieren nach.

Kawano et al. (2004) untersuchten die Beteiligung von CCL20, welches in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden konnte, am Ovulationsprozess der Frau. Die Konzentration in der Flüssigkeit aus Follikeln mit reifen Oozyten lag signifikant höher als in der von unreifen

Oozyten. Die Autoren vermuten daher eine wichtige Beteiligung von CCL20 an der Oozytenmaturation bei der Frau (Kawano et al., 2004). Außerdem zeigten die Autoren eine dosisabhängig, erhöhte Expression von CCL20 in kultivierten Granulosazell-Kulturen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ , welche aus Follikelflüssigkeit hergestellt wurde. Ob CCL20 bei der Entwicklung, Sekretion und Regression des bovinen CL beteiligt ist oder durch CCL20 beeinflusst wird, ist bisher nicht untersucht.

## **1.7 Auswirkungen eines gestörten Immunsystems auf die Ovarfunktion**

Nach einer Studie von Hockett et al. (2005) zeigten 63% aller Kühe mit einer klinischen Mastitis eine verlängertes Zyklusintervall oder nur geringgradig ausgebildete Brunstsymptome. Ursache der unterdrückten Ovarfunktion ist die, einer Mastitis zugrunde liegenden Infektion und daraus resultierenden Entzündungsreaktion. Diese kann sich auf zwei verschiedenen Wegen inhibierend auf die Ovarfunktion auswirken.

Einerseits kommt es zu einer entzündungsbedingten Beeinflussung der Hypophyse, was eine reduzierte LH-Sekretion und damit eine verzögerte oder ausbleibende Ovulation zur Folge hat (Hockett et al., 2005). Andererseits können Leukozyten und deren pro-inflammatorische Sekretionsprodukte direkt die luteale P<sub>4</sub>-Synthese und Follikelentwicklung im Ovar unterdrücken (Neuvians et al., 2004; Schams und Berisha, 2004).

### **1.7.1 Beeinflussung der hypophysären Sekretion des luteinisierenden Hormons**

Hockett et al. (2005) beschrieben den direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer durch *Streptococcus uberis* verursachten Mastitis und einer ausbleibenden Ovulation. Die Autoren infizierten zwei klinisch gesunde Euterviertel mit *Streptococcus uberis* am Tag 8 p.ö. bei 19 Kühen. Daraufhin entwickelte sich eine klinische Mastitis bei 63% der Tiere (n= 12). Von diesen 12 Tieren wiesen 8 keine Ovulation und eine reduzierte Frequenz der LH-Sekretion auf. Im Gegensatz dazu zeigten alle Kontrolltiere (nicht infizierte, laktierende Kühe), 5 infizierte aber nicht erkrankte Tiere und 4 der infizierten und erkrankten Tiere einen ungestörten Zyklus.

Als Ursache einer ausbleibenden Ovulation sehen Hockett et al. (2005) eine Reduzierung der hypophysären LH-Sekretion. Diese wird vermutlich durch Zytokine unterdrückt (McCann et al., 2000), welche im Verlaufe einer durch Bakterien oder Viren verursachten Entzündungsreaktionen verstärkt sezerniert werden (Zerbe et al., 2001). So verursacht u.a. der Zellwandbe-

standteil gram-negativer Bakterien (LPS) welcher im Blut nach Infektionen zirkuliert, die Freisetzung einer Reihe von Zytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-2 und TNF- $\alpha$  (McCann et al., 2000). Diese können aufgrund ihrer geringen Größe von maximal 15 kDa die Blut-Hirn-Schranke überwinden und die Funktion der Hypophyse beeinflussen (McCann et al., 2000). Kalra et al. (1998) untersuchten den Effekt verschiedener Zytokine und LPS auf die die Plasma-LH-Konzentration bei kastrierten Ratten. Bereits 30 min nach intracerebroventriculärer Infusion von IL-1 $\beta$  sank die LH-Konzentration im Blut signifikant ab. Nach 60 min bis 95 min wurden auch TNF- $\alpha$  und LPS eine signifikant niedrigere LH-Konzentration, im Vergleich zu den Werten vor Behandlungsbeginn, gemessen (Kalra et al., 1998). Auch Rivest et al. (1993) zeigten eine Reduzierung der LH-Sekretion nach intracerebroventrikulärer Infusion von IL-1 $\beta$  bei weiblichen Ratten und eine daraus resultierende ausbleibende Ovulation. Im Gegensatz dazu sind Skarzynski et al. (2007) der Auffassung, dass sich TNF- $\alpha$  direkt auf die Ovarfunktion negativ auswirkt (1.5.1).

### **1.7.2 Beeinflussung der Ovarphysiologie durch Leukozyten**

Castro et al. (1998) untersuchten den Einfluss von Leukozyten auf die P<sub>4</sub>-Synthese humaner Lutealzellkulturen. Wurden die Leukozyten aus den humanen Lutealzellkulturen entfernt, so wiesen diese eine zweifach höhere P<sub>4</sub>-Synthese auf als Lutealzellkulturen, deren Leukozyten nicht entfernt wurden. Alia und Hansel (1984) zeigten, dass die Reduktion der im Blut zirkulierenden Lymphozyten, wie sie im Rahmen einer Leukopenie, als Folge einer Infektion, häufig auftritt, bei zyklischen Färsen die Funktion des CL so stört, dass die P<sub>4</sub>-Sekretion im peripheren Blut stark absinkt. Dazu injizierten die Autoren den Färsen an den Tagen 9 bis 17 p.ov. täglich 50 ml eines anti-Lymphozytenserums, welches den P<sub>4</sub>-Plasmagehalt 5 Stunden nach Beginn der ersten Injektion signifikant, im Vergleich zu nicht behandelten Tieren, senkte. Wurde den Färsen eine um 20 ml geringere Dosis des anti-Lymphozytenserums injiziert, sank der P<sub>4</sub>-Plasmagehalt erst 18 Stunden nach der ersten Injektion. Andere Leukozytenpopulationen wurden in ihrer Anzahl im Blut nicht beeinflusst (Alila und Hansel, 1984).

Auch scheint eine intakte Funktion des Thymus während der prä- und postnatalen Entwicklung essentiell für die Aufrechterhaltung der physiologischen murinen Ovarfunktion zu sein (Bukulmez und Arici, 2000). So sind Tiere, welche ohne Thymus geboren werden oder welchen postnatal der Thymus operativ entfernt wird, unfruchtbar oder zeigen eine abnormale Ovarfunktion (Nishizuka und Sakakura, 1969).

## **1.8 Hypothesen zum Einfluss des Immunsystems auf die Funktion des Corpus luteum während des Zyklus**

Warum Leukozyten das CL stärker als andere Organe besiedeln und aus welchem Grunde dies zyklusabhängig geschieht, ist weiterhin unklar. Bukovsky (2006) stellte die Hypothese auf, dass die Anwesenheit verschiedener Immunzellpopulation während der CL Entwicklung und Regression ihre Ursache darin haben könnte, dass während in der frühen Ontogenese mit T-Zellselektion und Toleranzinduktion das CL noch nicht ausgebildet ist. Der Autor folgert daraus, dass CL-spezifische Proteine als fremd angesehen werden. Des Weiteren stellten Bukovsky (2006) heraus, dass das Immunsystem die Regeneration, den Schutz und das Altern von Gewebe-spezifischen Zellen reguliert. Er bezeichnet dies als ein System der „Gewebe-kontrolle“, welches im CL aus Immunzellen, vaskulären Perizyten und der autonomen Innervation besteht (Bukovsky, 2006).

Einige Autoren vermuten eine entzündungsähnliche Reaktion zum Beginn der Luteolyse (Bauer et al., 2001; Neuvians et al., 2004), jedoch widersprechen mehrere Faktoren dieser Hypothese. So liegt der Anteil apoptotischer Zellen ungewöhnlich hoch, außerdem fehlen zwei Hauptmerkmale einer Entzündung: die Schwellung und die Vasodilatation (Acosta et al., 2002). Das Fehlen einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe (Neuvians et al., 2004) lässt vermuten, dass der Einstrom von Immunzellen zum Zeitpunkt der Luteolyse das umliegende Ovargewebe vor entzündlichen Bedingungen schützt, welche durch tote und absterbende Zellen im CL hervorgerufen wird (Pate und Keyes, 2001).

## 2 Geräte, Material, Methoden

### 2.1 Geräte

Aqua dest. Aufbereitungsanlage Umkehr-Osmose Anlage, „Typ RO 50/14SMB Typ I“	(Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel)
Aqua tridest. Aufbereitungsanlage „SG Reinstwasser System Typ SG-RS90-4 UF“	(Wasser- und Regenerierstation, Barsbüttel)
Autoklav Typ GE406	(Getinge AB, Getinge/Schweden)
Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung, Baureihe 5060	(Heraeus, Hanau)
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(Wartewig (6.001.000), Göttingen)
Eismaschine Typ UBE 30-10	(Ziegra, Isernhagen)
Feinwaage "TE 124 S"	(Sartorius AG)
feuchte Kammer	(Einzelhandel)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer "FACScan®" mit angeschlossener Computereinheit	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Gelelektrophorese-Kammer "Mini-Sub® Cell GT"	(BioRad Laboratories GmbH, München)
Gewebeeinbettungsautomat "Hypercenter II"	(Shandon, Frankfurt)
Heißluftsterilisator „Typ ST5050“	(Heraeus, Hanau)
Heizblock „Techne Dir-Block DB.3"	(thermo Dux, Wertheim)
Kühlzentrifuge Varifuge K	(Heraeus Instruments, Osterode)
Laborwaage „BL310“	(Sartorius GmbH, Göttingen)
Magnetrührer mit Heizplatte	(Janke und Kunkel, Staufen)
Mikroskop "Eclipse 80i"	(Nikon Cooperation, Japan)
Molecular Imager "Gel Doc XR"	(BioRad Laboratories GmbH, München)
PCR Thermocycler "T-Gradient"	(Biometra, medizinische Analytik GmbH, Göttingen)
pH-Meter „766 Calimatic“	(Knick, Berlin)
Photometer "BioPhotometer"	(Eppendorf, Hamburg)
Pinzette, gebogen, anatomisch	(Eickemeyer (170710), Tuttlingen)
Pipette, 8 Kanal	(Biohit Deutschland GmbH, Köln)
Pipette, einstellbar „Transferpette®“ (2-20 µL)	(Brand (09U2539), Wertheim)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-20 µL, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	(Gilson, Villers Le Bel/Frankreich)
Pipettierhilfe „accu-jet®“	(Brand (26404), Wertheim)
Plastikbox mit Gittereinsatz	(Einzelhandel)
Plattenzentrifuge mit Plattenrotor (UJ II KS)	(Heraeus-Christ. Osterode)
Reinwerkbank Laminair HL2448	(Heraeus-Christ, Hanau)

Rotationsmikrotom	(Leica Instruments GmbH, Nußloch bei Heidelberg)
Rüttler für Mikrotiterplatten „AM69 Microshaker“	(Dynatec, Zug, Schweiz)
Schale für Heizung	(IKA Werke, Staufen)
Schlauchpumpe zum Absaugen von Flüssigkeiten „Rumo100“	(Heidolph (52100), Schwabach)
Schüttelinkubator RS 90-4 UF	(SG Barsbüttel)
Stanze für Corpora lutea	(Hoffmann, Frankreich)
StepOnePlus-PCR System	(Applied Biosystems, CA, USA)
Sterilbank	(Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland)
Tiefkühltruhe -95°C	(Kendro, Hanau)
Tischzentrifuge "5415C"	(Eppendorf, Hamburg)
Transmigrationskammer 10 wells; 400 µl/285 µl	(Neuro Probe (AA10), Gaithersburg, MD/USA)
Transportbehälter "Isotherm"	(KGW, Deutschland)
Ultraschallgerät "LOGIQe" mit 5 10 MHz Linearsonde	(GE Healthcare, Germany)
Vortexer	(IKA Werke, Staufen)
Wasserbad mit Temperaturregelung „Typ 1003“	(GFL, Hannover)
Zählkammer nach Bürker	(Brand, Wertheim)
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	(Heraeus Instruments, Osterode)

## 2.2 Material

### 2.2.1 Klinikbedarf

Desinfektionslösung Vetisept® 2%	(Albrecht, Aulendorf)
Effiminator nach Reisinger, modifiziert durch Richter	(Hauptner, Solingen)
GnRH-Agonist Buserelin, „Receptal®“	(Intervet, Milton Keynes, UK)
Kanülen 1,80 x 40 mm, steril „TSK STERIJECT“	(TSK-Supra, Tochigi/Japan)
nichtsteroidales Antiphlogistikum, „Romefen PR 10%®“	(Merial, Frankreich)
PGF <sub>2α</sub> -Agonist, Cloprostenol-Natriumsalz, „Dalmazin®“	(Fatro, Ozzano Emilia/Italien)
PGF <sub>2α</sub> -Agonist, Dinoprost, „Dinolytic®“	(Upjohn, Crawley, UK)
Procainhydrochlorid, „Procasel 2%“	(Selectavet, Weyarn-Holzolling)
Staukette nach Witte	(Eickemeyer (442015), Tuttlingen)

Vacutainer Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson (367300), Heidelberg)
Vacutainerröhrchen, 10 mL, EDTA-K2 (18 mg)	(Becton Dickinson (367525), Heidelberg)

### 2.2.2 Laborbedarf

adhäsive Objektträger "HistoBond <sup>®</sup> "	(Marienfeld (0810000), Lauda-Königshofen)
Chirurgische Skalpelle	(Aesculap (5518075), Tuttlingen)
Combitips, 1,25 ml	(Eppendorf (0030069.420), Hamburg)
Combitips, 2,5 ml	(Eppendorf (0030069.447), Hamburg)
Cryo-Freezing-Container	(Nalgen, Rochester, USA)
Einmal-Filter, Celluloseacetate Membrane, 0,2 µm, steril	(Renner (26146040), Dannstadt)
Einmal-Küvetten 70 µl "UV-Küvette mikro"	(Brand (759200), Wertheim)
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld	(Merck (612F1767), Darmstadt)
Entsorgungsbeutel	(Brand (759705), Wertheim)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 ml	(Greiner (616201), Frickenhausen)
Eppi-Pistille aus Polypropylen	(schuett-biotec (3200512), Göttingen)
24 well Flachboden Zellkulturplatten mit Abdeckung	(Costar, Bethesda, USA)
96 well Flachboden-Mikrotiterplatten, Nunc Immuno Plate	(Nunc (363-401), Wiesbaden)
Glasküvetten	(Assistent, Deutschland)
Glasobjektträger	(Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Halterung für die PCR 96 well Platte "96-Well Support Base"	(Applied Biosystems (4379590), CA, USA)
Klebefolie zur Abdeckung der PCR 96 well Platte "Optical Adhesive Cover"	(Applied Biosystems (4360954), CA, USA)
Laborflaschen mit Gewinde, 500 ml	(VWR international (215L1516), Hannover)
Parafilm	(American can Company, USA)
Pasteurpipetten, 22,5 mm aus Glas	(Brand (747720), Wertheim)
PCR-Platte Micro Amp "Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)"	(Applied Biosystems (4346907), CA, USA)
PCR-Reaktionsgefäß 0,6 ml	(Biozym Scientific, Hess. Oldendorf)
PCR-Reaktionsgefäß 200 µl	(Biozym Scientific, Hess. Oldendorf)
Petrischalen 94 mm Durchmesser	(Greiner(616222), Frickenhausen)
Pipettenspitzen "Safeseal Tips Premium" 10 µl	(Biozym Scientific (692150), Hess. Oldendorf)

Pipettenspitzen "Safeseal Tips Premium" 100 µl	(Biozym Scientific (692066), Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen "Safeseal Tips Premium" 1000 µl	(Biozym Scientific (691000), Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen 200 und 1000 µl	(Sarstedt (70/762002), Frickenhausen)
Polycarbonat-Membran 25 x 80 mm, 3 µm Porengröße, PVP Membranen	(Cytogen (155812), Ober-Mörlen)
Polystyrolröhrchen	(Nerbe Plus (62 161 0000) Winsen/Luhe)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml	(Becton Dickinson (352008), Heidelberg)
serologische Pipetten, 10 ml, nicht pyrogen	(Biochrom (94010), Berlin)
Zentrifugenröhrchen, 15 ml aus Polypropylen (steril)	(Sarstedt (62.554.502), Nürmbrecht)
Zentrifugenröhrchen, 50 ml aus Polypropylen (Falcons, steril)	(Corning (430829), Wiesbaden)

### 2.2.3 Reagenzien

10x TBE, (Tris Boric Acid EDTA)-Puffer	(Bio Rad Laboratories (161-0770), München)
5x First-Strand-Buffer	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Acridin-Orange	(Sigma-Aldrich (A-6014), Steinheim)
Agarose	(Life Technologies (15510-027), Paisely, Scotland)
Ammoniumaluminiumsulfat, 10%	(Roth, Karlsruhe)
Ampicillin	(Sigma-Aldrich (A-9518), Steinheim)
Bromphenolblau (3', 3', 5', 5'-Tetrabromphenolsulfophtalin)	(Severin (15375), Heidelberg)
BSA (Bovines Serum Albumin)	(Serva (11930) Deutschland)
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> (Tri-Natriumcitrat, 2 x H <sub>2</sub> O)	(Serotec (PBP 005), Oxford, UK)
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (Zitronensäure)	(Riedel-de-Haen(27109) Seelze)
CH <sub>3</sub> COOH (Essigsäure)	(Riedel de Haen, Seelze)
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Urea-Hydrogen-Peroxid)	(Grüssing (12149) Filsum)
Concanavalin A (Con A)	(Amersham Bioscience (17-0450-01) Freiburg)
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	(DAKO BioTek Solutions, Ca, USA)
DMF (N,N-Dimethyl-Formalide)	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
DMSO (Dimethyl sulfoxide, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS (min. 99,5%))	(Sigma-Aldrich (D5879), Steinheim)
DNA Ladder 1Kb plus	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
dNTP Mix (Deoxynucleotide Triphosphates)	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)



DTT 0,1 M (Dithiothriol)	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
<i>E. coli</i> Bakterien zur Plasmidklonierung non-K-12 Wildtyp, W-Stamm	(ATCC No. 9637, S.A. Waksman)
EDTA (Ethylendiamine-Tetraacetic Acid)	(Sigma-Aldrich (ED2SS), Steinheim)
EnVision <sup>®</sup> Detections System	(DAKO BioTek Solutions, Ca, USA)
Enzym für Progesteronassay (Progesteron-3-CMO-HRP, Verdünnung: 1:6000)	hergestellt durch Prof. HHD Meyer (Technische Universität München)
Eosin	(Merck, Darmstadt)
Ethanol, absolut zur Analyse, unvergällt	(Merck (1.00983.1000), Darmstadt)
Ethanol, vergällt	(Riedel-de-Haen, Seelze)
Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich (E87A51), Steinheim)
Eukitt <sup>®</sup>	(Kindler, Freiburg)
FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)	(Sigma-Aldrich (F7250), Steinheim)
Formaldehyd 37%, p.a., ACS, Rotiuran <sup>®</sup>	(Roth (49794.1), Karlsruhe)
Gel Star <sup>®</sup> Nucleic Acid Gel Stain	(Lonza (50535), ME,USA)
Giemsa	(Merck, Darmstadt)
Glyzerol	(Merck, Darmstadt)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	(SAV, Feldkirchen)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)	(Merck, Darmstadt)
Hämatoxylin	(Merck, Darmstadt)
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Isopropanol	(SAV, Feldkirchen)
KCl (Kaliumchlorid, kristallin)	(Biochrom (T046-10), Berlin)
LB (Lennox L-broth) Agar	(Invitrogen (00705091), Karlsruhe)
LB (Lennox L-broth) Medium	(Invitrogen (00705241), Karlsruhe)
Lipopolysaccharid von <i>Escherichia coli</i> Serotyp O55:B5	(Sigma-Aldrich (L-2637), Steinheim)
Lösung zur Stabilisierung von RNA "RNAlater"	(Ambion (7020), Austin, TX)
Lymphozytenseparationsmedium <sup>®</sup>	(PAA Laboratories (J15-004), Linz/Österreich)
May-Grünwald-Lösung	(Merck, Darmstadt)
Medium 199 (M199)	(Earle's Salts, Gibco,USA)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Natriumcarbonat	(Sigma-Aldrich (S-2127), Steinheim)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O (Natriumcarbonat-10-Hydrat)	(Grüssing (12121) Filsum)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenphosphat)	(AppliChem(A2943) Darmstadt)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2 H <sub>2</sub> O (Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	(Grüssing (12149) Filsum)
NaCl (Natriumchlorid)	(Roth (9265.2), Karlsruhe)
NaClO (Natriumhypochlorid)	(Sigma-Aldrich (425044), Steinheim)
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	(Sigma-Aldrich (S-8875), Stein-

NaHPO <sub>4</sub> (Natriumphosphat)	heim)
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid, 10%ig)	(Merck, Darmstadt)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (75% ges. Ammoniumsulfat)	(Sigma-Aldrich (S-2002), Steinheim)
Oligo-(dt) <sub>12-18</sub> -Primer	(Roth (3746.2), Karlsruhe)
Paraffin "Paraplast"	(Invitrogen (18418-012), Karlsruhe)
Paraformaldehyd	(Shandon, Frankfurt)
PBS (Phosphat Buffert Solution w/o Ca <sub>2+</sub> , Mg <sub>2+</sub> + Trockensubstanz)	(Sigma Aldrich (P6148), Steinheim)
PCR Rxn Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	(Biochrom (L182.10), Berlin)
Penicillin G	(Invitrogen (401305), Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin-Glutamine-Lösung liquid 100fach konzentriert	(Sigma Aldrich (204-038-0), Steinheim)
Percoll™ (spezifisches Gewicht: 1,130 g/ml)	(Invitrogen (10378-016), Karlsruhe)
PGF <sub>2α</sub> (Prostaglandin F <sub>2α</sub> Tris Salz)	(Amersham Bioscience (170-89101), Uppsala/Schweden)
PJ (Propidiumjodid)	(Sigma-Aldrich (82477-1MG), Steinheim)
Plasmidextraktionskit "QIAprep Spin Miniprep Kit"	(Calbiochem (537059), Bad Soden)
Puffer REact® 2 (10 fach konzentriert)	(Qiagen (27104), Hilden)
QIA Gel Extraction Kit	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
QIAquick® PCR Purification Kit	(QIAGEN GmbH (28704), Hilden)
recombinantes bovines TNFα	(QIAGEN GmbH (28104), Hilden)
Restriktionsenzym <i>Hind</i> III	(Serotec (PBP005), Oxford, UK)
Restriktionsenzym <i>Sca</i> I	(Invitrogen (15207-012), Karlsruhe)
rhCXCL8 (CXCL8, human, rekombinant)	(Invitrogen (15436-017), Karlsruhe)
RNA Extraktionskit "RNAqueous Kit"	(cell concepts GmbH (C-20008-ME), Umkirch)
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	(Ambion (AM1912), Austin, TX)
RNase/DNase-freies Wasser	(Invitrogen (10777-019), Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium ( Roswell Park Memorial Institute Medium)	(Sigma Aldrich (W4502), Steinheim)
SEA (Staphylokokken-Enterotoxin A, lyophilisiert)	(Calbiochem (537059), Bad Soden)
Streptomycin Sulfat	(Sigma-Aldrich (S-9399), Steinheim)
	(Sigma Aldrich (S6501-256), Steinheim)

Superscript™ II Reverse Transkriptase	(Invitrogen (18064-014), Karlsruhe)
SYBR Green® PCR Master Mix	(Applied Biosystems (4309155), Darmstadt)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	(Invitrogen (10342-053), Karlsruhe)
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> )	(AppliChem(A-3840) Darmstadt)
TOPO TA Cloning® Kit	(Invitrogen (K 450641) Karlsruhe)
Tris (Trizma Base)	(Sigma-Aldrich (T8524), Steinheim)
Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat)	(AppliChem(A-4743), Darmstadt)
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)	(Invitrogen (15520-034), Karlsruhe)
Xylol	(SAV, Feldkirchen)
Ziegennormalserum	hergestellt durch das Anatomische Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover

## 2.2.4 Versuchstiere

### 2.2.4.1 Spendertiere zur Blutgewinnung

Bei den Tieren, denen Blut zur Zellgewinnung entnommen wurde, handelte es sich um ausschließlich weibliche Tiere der Rasse Holstein-Friesian. Das Alter lag zwischen 1,5 und 7 Jahren. Alle verwendeten Tiere waren klinisch gesund und stammten entweder aus der Klinik für Rinder oder dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Blutproben wurden durch Punktion der Vena jugularis, unter sterilen Bedingungen, nach Stauung des Gefäßes mit einer Staukette nach Witte (2.2.1) gewonnen. Für die Gewinnung von Bluteukozyten wurde das Vacutainersystem mit heparinisierendem (EDTA-Kalium) Vacutainern (2.2.1) eingesetzt.

### 2.2.4.2 Organgewinnung von unbekanntem Rindern auf dem Schlachthof

Vom Schlachthof Gleidingen wurden CL-tragende Ovarien von HF-Rindern entnommen und in Medium 199 (M199; siehe 2.2.6.4) bei 38°C zur Klinik für Rinder gebracht. Generell waren die Herkunft, der Gesundheitsstatus und der Zyklustag der auf dem Schlachthof getöteten Rinder unbekannt. Adspektorisch wurden nur in der Blütephase befindende CL ausgewählt (Ireland et al., 1980; Jaroszewski und Hansel, 2000). Um trüchtige Tiere ab dem 15 Tag p.c. zu identifizieren oder sichtbare vorhandene krankhafte Veränderungen des Uterus feststellen zu können, wurde bei allen ausgewählten Tieren der Uterus eröffnet. Aufgrund der geringen Größe der Blastozyste in den ersten Lebensstagen, von 222 µm bis 4 cm (Rüsse und Sinowatz, 1998), konnte eine Trächtigkeit an den Tagen 1 bis 14 p.c. nicht ausgeschlossen werden. Bei makroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen der Uterusschleimhaut und/oder des Uterusinhaltes wurde auf eine Entnahme der Ovarien verzichtet.

Dabei wurden zwischen zwei unterschiedlichen Blüte-CL-Typen unterschieden. Befand sich keine Frucht im Uterus wurde davon ausgegangen, dass es sich um ein Tier im Zyklus handelt, daher wurde das Blüte-CL in diesem Falle als CL cyclicum bezeichnet. Konnte nach Eröffnung des Uterus eine Trächtigkeit nachgewiesen werden, so wurde der Blütegelbkörper als CL graviditatis bezeichnet. Für den Transport wurde M199 mit einer 2-fachen Penicillin/Streptomycin-Konzentration versehen (2.2.6.4).

### 2.2.4.3 Organgewinnung im Tiermodell an den Tagen 10 bis 12 post ovulationem

Als Probanden wurden 29 HF-Färsen zur Untersuchung der lutealen Regression ausgewählt. Alle Färsen waren klinisch gesund und stammten aus der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Tiere wurden ovarsynchronisiert, indem folgende intramuskuläre Injektionen vorgenommen wurden: 2,5 ml Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH; 10,5 µg Buserelin, siehe 2.2.1), sieben Tage später 2 ml PGF<sub>2α</sub> (150 mg Cloprostenol, siehe 2.2.1) und zwei Tage später 2,5 ml GnRH. Um den endokrinen Status der Tiere zu beurteilen, wurde mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays (Prakash et al., 1987) am Tag 10 p.ov. die P<sub>4</sub>-Konzentration aus Blutproben der Vena jugularis bestimmt (2.3.9).

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt: Die Ovarien aller Tiere wurden um den Zeitpunkt der Ovulation ultrasonographisch untersucht (2.1), um den genauen Ovulationszeitpunkt festzulegen. Anschließend wurden die Ovarien an den Tagen 5 und 10 zur Überwachung der CL-Entwicklung sonographisch untersucht. Tiere mit zwei CL oder einem Hohlraum im CL wurden aus der Studie ausgeschlossen. Am Tag 10 p.ov. wurden die Tiere in 6 Gruppen, á 5 Tiere, eingeteilt. Eine Gruppe diente dabei als Kontrolle, wobei hier ohne vorherige PGF<sub>2α</sub>-Injektion das CL tragende Ovar chirurgisch entnommen wurde. Tiere der weiteren Gruppen wurden 5 min, 15 min, 30 min, 120 min und 720 min post injectionem (p.i.) von 5 ml des PGF<sub>2α</sub>-Analogons (25 mg Dinoprost, 2.2.1) ovarektomiert. Die Gruppe der Färsen, welche 720 min nach PGF<sub>2α</sub>-Injektion ovarektomiert wurde, bestand aus 4 Tieren.

Die Ovarektomie erfolgte transvaginal über das Scheidendach am stehenden Tier. Vor Beginn der Operation wurde eine epidurale Anästhesie mit 5 ml 2%igem Procainhydrochlorid (2.2.1) zur Schmerzausschaltung des Operationsgebietes eingesetzt. Nach Desinfektion der Scheide mit einer 2%igen Desinfektionslösung (2.2.1) wurde anschließend dorsal der Portio vaginalis mit einer Skalpellschneide ein 3 cm langer Schnitt in die Scheidenschleimhaut durchgeführt, stumpf mit den Fingern der Zugang zur Bauchhöhle soweit vergrößert, bis mit der Hand die Ovarien ertasten konnte. Zum Absetzen des CL-tragenden Ovars, wurde ein Effeminator (2.2.1) eingesetzt, welcher nach einer 10 minütigen Komprimierung eine Verklebung der Ovargefäße sicherstellte, um Nachblutungen auszuschließen. Nach der Entnahme des Ovars wurde die Operationswunde nicht vernäht, da sich die Wundränder innerhalb kurzer Zeit von selbst verschlossen. Zur Schmerzlinderung wurde nach der Operation 3 mg/kg des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Romefen 10% (2.2.1) an zwei aufeinander folgenden Tagen intramuskulär appliziert.

### **2.2.5 Antikörper**

Im Folgenden wurden die Antikörper aufgelistet, welche für die Herstellung von Referenzzellen, die immunhistochemische Markierung von Leukozyten und für den quantitativen P<sub>4</sub>-Nachweis eingesetzt wurden.

**Tab. 1 Primäre mono- und polyklonale Antikörper.**

Bezeichnung	Spezifität	Donor/ Isotyp	Verdünnung	Referenz / Herkunft
<b>AK zur Referenzzellherstellung</b>				
Bo1	bovines MHC-I	Maus, IgG1	1:1	(Schuberth et al., 1991)
Anti-Maus IgG, IgM <sup>1</sup>	schwere und leichte Ketten	Ziege, IgG	1:40	Dianova, Hamburg
<b>AK zum Leukozytennachweis</b>				
3W-585	bovines CD45	Maus, IgG3	unverdünnt	(Naessens und Hopkins, 1996)
Davis-6BA640A	keine (Negativkontrolle)	Maus, IgG3	unverdünnt	(Naessens und Hopkins, 1996)
<b>EIA-Coating-AK</b>				
Ziege anti Ratte, IgG <sup>2</sup>	schwere und leichte Ketten	Ziege, IgG	1:100	(Meyer et al., 1989)
<b>EIA-Nachweis-AK</b>				
P-1922, Klon 2H4	Progesteron	Ratte	1:8000	Sigma-Aldrich, Steinheim

AK: Antikörper; EIA: kompetitiver Doppelantikörper-Enzymimmunoassay . <sup>1</sup> Sekundärantikörper für die Herstellung von Referenzzellen. Affinitätschromatographisch gereinigt, Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC) konjugiert, gegen Human-, Rinder- und Pferdeserumproteine absorbiert. <sup>2</sup> Primärantikörper für die Beschichtung von 96-well-Platten für den P<sub>4</sub>-EIA, bei hoher Stringenz (10<sup>-13</sup>) affinitätschromatographisch gereinigt.

## 2.2.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

### 2.2.6.1 Lösungen und Puffer für die histologische Bearbeitung

#### Neutral gepuffertes Formol nach Lillie

NaHPO <sub>4</sub>	3,48	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (dehydriert)	6,5	g
Aqua bidest. ad 1000 ml		
pH-Wert: 7,0		

Beide Chemikalien wurden einzeln gelöst. Dann wurde die Phosphatpufferstammlösung wie folgt zum Formaldehyd gegeben.

37% Formaldehyd	100	ml
Phosphatpufferstammlösung	900	ml

#### Tris EDTA-Citrat-Puffer (TEC-Puffer)

Tris-Base (MW 121,1)	2,5	g
EDTA	5,0	g
Tri-Natriumcitrat	3,2	g
Aqua dest. ad 800 ml		
Einstellung auf pH7,8		
Aqua dest. ad 1000 ml		

#### Hämalaun nach Delafield

Hämatoxylin	4,0	g
Ethanol (100%)	25	ml
10% Ammoniumaluminiumsulfat	400	ml

Es folgte eine Inkubationszeit von 4 Tagen.

Glycerin	100	ml
Methanol	100	ml

Für Oxidationsreaktionen war eine anschließende Lagerung der Lösung über Monate nötig.



### 2.2.6.2 Lösungen und Puffer für den kompetitiven Doppelantikörper-Enzymimmunoassay

#### Coatingpuffer

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x 10H <sub>2</sub> O	2,145 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,465 g
Aqua bidest. ad 500 ml	
pH-Wert: 9,6	
Wurde vor Verbrauch frisch angesetzt.	

#### Assaypuffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,78 g
NaCl	2,125 g
BSA	0,25 g
Aqua bidest. ad 250 ml	
pH-Wert: 7,2	
Lagerung bei +4°C für 7 Tage.	

#### Waschlösung

Tween 80	0,25 g
Aqua bidest. ad 500 ml	
Lagerung bei Raumtemperatur (RT).	

#### Substratlösung A

Zu Beginn wurde eine Tablette Urea-Hydrogen-Peroxid (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 10 ml Aqua bidest. gelöst.

CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O.H <sub>2</sub> O-Lösung	2,5 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	4,5 g
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2,354 g
Kathon CG	25,0 µl
Aqua bidest.	250,0 ml
pH-Wert: 5,0	

Die Lagerung erfolgte Licht geschützt für 2 Monate, bei 4°C.

### Substratlösung B

TMB	0,125	g
DMSO	10,0	ml
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2,354	g
Aqua bidest. ad 240 ml		
pH- Wert: 2,4		

Das im DMSO gelöste TMB wurde zu der Zitronensäurelösung gegeben. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt für 2 Monate bei 4°C.

### 2.2.6.3 Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz (MIF)-Puffer

bovines Serumalbumin	5,0	g
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	0,1	g
PBS ad 1000 ml		

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### 2.2.6.4 Gewebekulturmedium

Medium 199	15,0	g
NaHCO <sub>3</sub>	2,2	g
BSA	1,0	g
Penicillin	100,0	I.U./ml
Streptomycin	100,0	µg/ml
Aqua bidest. ad 1000 ml		

pH-Wert: 7,2 – 7,4. Vor Gebrauch wurde das Medium steril filtriert (Porengröße: 0,45µm).

### 2.2.6.5 Material für die Separation von Zellen

#### Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup>

Das Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> (2.2.3) ist eine isotone, wässrige Lösung aus Natriumdiatrizoat und einem hochmolekularen Zucker mit einem Zusatz des Röntgenkontrastmittels Isopaque. Bei 10°C besitzt das Separationsmedium eine Dichte von 1,077 g/ml. In dieser Arbeit wurde das Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> unverdünnt verwendet.

### **Percoll™**

Bei Percoll™ (2.2.3) handelt es sich um ein synthetisches Sol aus Polyvinyl-Pyrolidon-beschichteten Silikatpartikeln mit einem spezifischen Gewicht von 1,130 g/ml bei 20°C. Durch Zugabe von 0,9 g NaCl (2.2.3) pro Liter Percoll™ wurde die Isotonie erreicht (100 %-iges, isotones Percoll™).

### **Natriumchloridlösung, 0,9%**

NaCl	8,77	g
Aqua tridest. ad 1000 ml		

### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA)**

Die PBS-Trockensubstanz (2.2.3) wurde in Aqua tridest. gelöst. Es wurden folgende Bestandteile eingewogen:

NaCl	8,0	g
KCl	1,24	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	g
Aqua tridest. ad 1000 ml		

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### **Phosphatpuffer, doppelt konzentriert (2 x PBS)**

Zur Herstellung wurde die doppelte Menge an PBS-Trockensubstanz eingesetzt (2.2.3) und mit Aqua tridest. auf 1000 ml ergänzt.

### **Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz (MIF)**

bovines Serumalbumin	5,0	g
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	0,1	g
PBS ad 1000 ml		

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

## **2.2.6.6 Lösungen zum Fixieren und Quantifizieren von bovinen Zellen**

### **Paraformaldehydlösung zum Fixieren von Referenzzellen**

Paraformaldehyd	40	mg
PBS ad 1000 ml		

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### **Acridin-Orange-Ethidiumbromid-Lösung für die lichtmikroskopische Zellzählung**

Acridin-Orange	250	mg
Ethidiumbromid	250	mg

PBS ad 100 ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### **2.2.6.7 Lösungen für die Durchflusszytometrie**

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit steril filtriertem Aqua tridest. und 1 %-iger Natriumhypochlorid-Lösung (2.2.3) gespült.

#### **Trägerflüssigkeit**

Als Trägerflüssigkeit für die durchflusszytometrische Messung wurde steril filtriertes PBS mit 0,1 mg/ml NaN<sub>3</sub> (Natriumazid; 2.2.3) verwendet.

#### **Propidiumjodid-Stammlösung**

Die Stammlösung von 100 µg/ml Propidiumjodid, gelöst in Trägerflüssigkeit, wurde in aliquoten Teilen bei -20°C gelagert. Zum Anfärben toter Zellen wurden der Trägerflüssigkeit entsprechende Teile der Stammlösung zugesetzt, um eine Endkonzentration von 2 µg/ml zu erreichen.

### **2.2.6.8 Puffer und Lösungen für die DNA-Analyse**

#### **1x Tris Boric Acid EDTA (TBE)-Puffer, pH 8,4**

Der 10x TBE-Puffer (2.2.3) wurde mit Aqua tridest. verdünnt und bei RT gelagert.

#### **Tris EDTA-Puffer, pH 7,5**

Tris	10,0	mmol/l
EDTA	1,0	mmol/l

Gelöst in Aqua tridest. wurde der Puffer 20 min bei 135°C und 2,8 bar autoklaviert, aliquotiert und bei RT gelagert.

#### **Blaumarker**

Glycerol	30%
Bromphenolblau	1%

Gelöst in 1x TBE Puffer, Lagerung bei 4°C.

### **2.2.6.9 Zusätze, Medien und Nährböden für Bakterienkulturen**

#### **Ampicillin**

Herstellung einer Stammlösung (100 mg/ml) in Aqua tridest., Lagerung bei -20 °C.

#### **Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)**

Herstellung einer Stammlösung (100 mg/ml) in Aqua tridest., Lagerung bei -20 °C.

#### **5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid (x-Gal)**

Herstellung einer Stammlösung (100 mg/ml) in DMF (2.2.3), Lagerung bei -20 °C.

#### **Lennox L-broth (LB)-Medium**

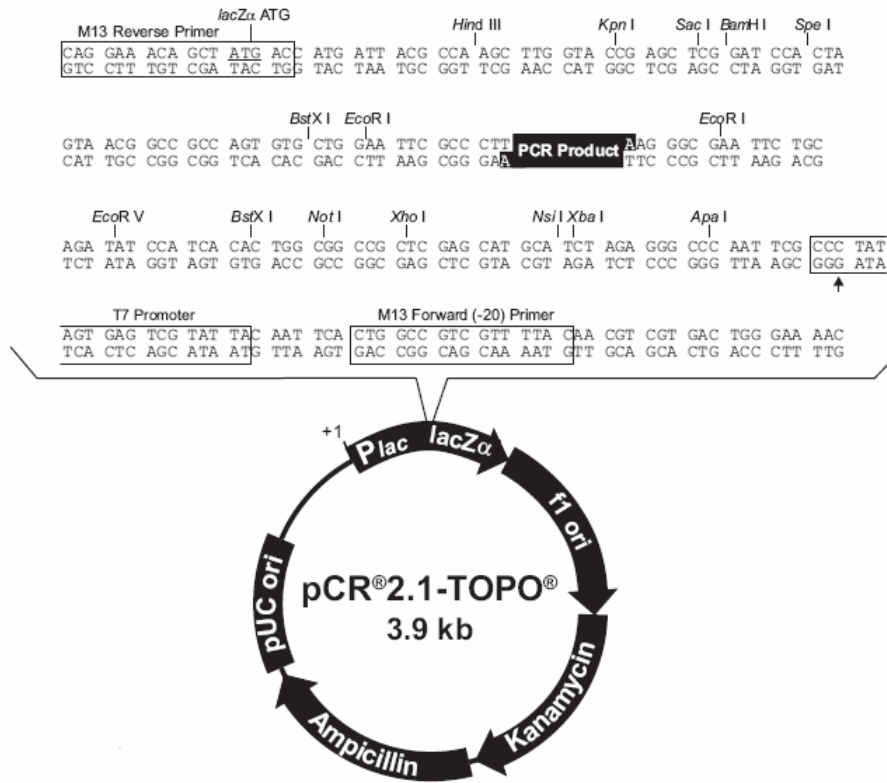
Jeweils 20 g Broth (2.2.3) wurden in 1 l Aqua dest., gelöst und für 20 min bei 135°C und 2,8 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf ~55 °C erfolgte die Zugabe von Ampicillin (2.2.3) in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml. Das Medium wurde bei 4°C einen Monat gelagert.

#### **Lennox L-broth (LB)-Agar**

Es wurden 32 g LB-Agar (2.2.3) in 1 l Aqua dest. gelöst und für 20 min bei 135°C und 2,8 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf ~55 °C wurden 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 80  $\mu$ g/ml X-gal und 40  $\mu$ g/ml IPTG zugegeben und das Gemisch unter sterilen Bedingungen zu je 20 ml in Petrischalen gegossen. Anschließend wurden die Platten an einem sterilen Arbeitsplatz für 15 min bei RT ausgehärtet. Die Agarplatten wurden für einen Monat bei 4°C gelagert.

### **2.2.7 Plasmid für die Herstellung von Standardreihen**

Für die Klonierung von Gensequenzen in chemisch kompetente *E.coli* wurde das im TOPO TA Cloning-Kit enthaltene Plasmid pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> verwendet (Abb. 1).



**Abb. 1: Plasmid für die Herstellung von externen Standardreihen für die quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR).** Plasmid für die Klonierung von Gensequenzen in *E.coli*. Schematisch dargestellt wurde die Ligationsstelle für das PCR-Produkt, für Antibiotika-Resistenzen und für die Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

Die Oligonukleotid-Primer wurden aufgrund von bereits veröffentlichten Sequenzen ausgewählt, oder im Fall von CCL20 selbst erstellt. Bezogen wurden alle Primer von der Firma MWG aus Ebersberg. Die optimale Konzentration der Primer im StepOnePlus-PCR System wurde durch eine vom Hersteller beschriebene Primer-Optimierung (2.3.6) ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Primer, die eingesetzte Konzentration sowie die Länge des Amplikons und die Referenzen sind in der f Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2: Primer Sequenzen und Konzentrationen für die qRT-PCR.**

Gen	Vorwärts- (for) und Rückwärts- (rev) Primer (5' → 3') und Konzentrationen (nmol/l)	Länge des Amplikons	Referenz
CCL5	for CCT GCT GCT TTG CCT ATA TCT (300) rev AGC ACT TGC TGC TGG TGT AG (300)	78	(Widdison et al., 2008)
CCL20	for GAT GTC AGT GCT ATT GCT CCA C (300) rev GCC AGC TGC TGT GTG AAG C (300)	123	Novel design, Acc. no. <sup>a</sup> NM_174263
CXCL1	for CGC CTG TGG TCA ACG AAC T (300) rev CAC CTT CAC GCT CTGGAT GTT (300)	83	(Taubert und Hermosilla, 2008)
CXCL8	for CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA (900) rev GGCCCACTCTCAATAACTCTC (50)	170	(Yang et al., 2008)
TNF- $\alpha$	for CTTCTGCCTGCTGCACTTCG (300) rev GAGTTGATGTCGGCTACAACG (300)	156	(Yang et al., 2008)

<sup>a</sup> Acc. No: Accession-Nummer der Nukleotid-Sequenz der NCBI Gen-Datenbank, welche für die Erstellung der Primer benutzt wurde.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Gewinnung und Bearbeitung von Corpora lutea-Gewebe

Die auf dem Schlachthof gewonnen Ovarien (2.2.4.2) wurden sofort nach Entnahme unter sterilen Bedingungen weiter bearbeitet. Dazu wurde jedes CL unter der Sterilbank aus dem Ovar frei präpariert. Corpora-lutea-Gewebestücke aus den zentralen und den peripheren Bereichen (Shirasuna et al., 2008) wurden mit einer Stanze präpariert ( $\emptyset$  4 x 6 mm) und für die Fixierung der mRNA in 750  $\mu$ l RNA later<sup>®</sup> Lösung in einem RNase-freiem Kryoröhrchen für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die RNA-later<sup>®</sup>-Lösung entfernt und das CL-Stück in einem neuen Kryoröhrchen bei -95°C, bis zur Extraktion der messenger RNA (mRNA), tiefgefroren. Für die histologische Bearbeitung wurden zusätzlich CL-Stücke, welche von Schlachthoftieren stammen in Einbettungskapseln gelegt und für 24 Stunden in 3,7% Formol bei 4°C fixiert. Die anschließend folgende Einbettung des Gewebes in Paraffin wurde unter 2.3.8.1 beschrieben.

### **2.3.2 Gewinnung von Corpora lutea-Gewebekulturüberständen zum indirekten Nachweis chemoattraktiver Substanzen**

Für den indirekten Nachweis von chemoattraktiven Substanzen in CL-Gewebeüberständen von frisch geschlachteten, zyklischen und trächtigen HF-Rindern durch den Transmigrationsassay, wurden CL-Gewebestücke in M199 inkubiert.

Für die Kultivierung wurden 24-well-Platten eingesetzt, wobei jedes Well 1,5 ml M199 enthielt. Nach einer Vorlaufphase von einer Stunde, in der sich die Sekretion der Chemokine/Zytokine, sowie P<sub>4</sub> einpendelt, erfolgte ein Austausch des Nährmediums.

Generell wurde für die Inkubation von jedem CL aus den zentralen und den peripheren Bereichen jedes CL je ein 4 x 6 mm großes Gewebestück mit einer Stanze entnommen. Die Inkubation der Stücke erfolgte für 8 bis 16 Stunden in einem Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub>-Spannung. Der so gewonnene Zellüberstand wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C tiefgefroren.

### **2.3.3 Stimulation von Corpora lutea-Gewebestücken mit PGF<sub>2α</sub> oder TNF-α für den direkten Nachweis von ausgewählten Chemokinen und Zytokinen**

Zum Nachweis einer durch PGF<sub>2α</sub> oder TNF-α veränderbaren mRNA-Genexpression der CL-Gewebestücke wurden bei diesem Versuch Ovarien von frisch geschlachteten HF-Rindern entnommen, unter der Sterilbank in Stücke gleicher Größe geschnitten (2.3.1) und wie unter 2.3.2 beschriebenen im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf einer Stunde wurde das Medium ausgetauscht und die jeweiligen Testsubstanzen, welche in M199 gelöst waren, zugesetzt [PGF<sub>2α</sub>, 10<sup>-5</sup> mol/l; rekombinantes bovines TNF-α: 100 ng/ml]. Individuelle Ansätze erfolgten in Dublikaten. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min und 120 min wurden die CL-Gewebestücke für den Nachweis von CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL8 und TNF-α bis zur Extraktion der mRNA wie unter 2.3.1 behandelt.

### **2.3.4 Gewinnung von Granulozyten**

Das frisch gewonnene heparinisierte Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und in 50 ml Röhrchen auf Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> (2.2.3) geschichtet. Die anschließende Zentrifugation (30 min, 4°C) wurde bei 1000 x g ohne Bremse durchgeführt.

Während dieser Zentrifugation trennten sich die einzelnen Zellpopulationen aufgrund ihrer spezifischen Dichte auf. Zwischen dem Plasma und dem Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup>



befand sich die Interphase mit mononukleären Zellen (MNC: lymphoide Zellen und Monozyten) sowie Anteilen der Thrombozytenfraktion. Unterhalb des Lymphozytenseparationsmediums<sup>®</sup> lagen die gepackten Erythrozyten und die polymorphkernigen Granulozyten. Das Plasma, die Interphase und das Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> wurden mit einer weitlumigen Pipette abgesaugt und verworfen.

Aus der verbleibenden Phase mit den polymorphkernigen Granulozyten wurden die Erythrozyten durch zweimalige hypotone Lyse entfernt: Nach Zugabe von 20 ml Aqua tridest. erfolgte eine Inkubation für 20 sek (erste Lyse) unter ständigem Schwenken. Um die Lyse zu stoppen, schloss sich die Zugabe der gleichen Menge an zweifach konzentriertem PBS an. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 500 x g bei 4°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellpellets durch Rütteln der Röhrchen gelöst und unter Zugabe von 10 ml Aqua tridest ein zweites Mal wie oben beschrieben hypoton lysiert. Die Zellen wurden zweimal mit 20 ml PBS gewaschen (250 x g, 100 x g, 4°C, 10 min). Das Zellsediment wurde in Kulturmedium (RPMI; 2.2.3) aufgenommen, die Zellen gezählt und mit dem Kulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Durch dieses Verfahren wurden Granulozytenpopulationen mit 90 bis 95 %-iger Reinheit separiert. Lag der Anteil kontaminierender MNC an den kernhaltigen Zellen bei >10 %, wurde die Zellsuspension nicht weiter verwendet.

### **2.3.5 Molekularbiologische Verfahren**

#### **2.3.5.1 Aufbereitung von mRNA aus Corpora lutea-Gewebestücken für die quantitative RT-PCR**

Der Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auf der Genexpression der Chemokine CXCL1, CXCL8, CCL5 und CCL20 sowie des Zytokins TNF- $\alpha$  wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation in vivo und nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in vitro untersucht.

#### **Extraktion der RNA**

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den Zellkulturen wurde der RNAqueous<sup>®</sup>-Kit (2.2.3) verwendet, von dem alle im Folgenden beschriebenen Reagenzien stammen.

Die CL Stücke wurden zunächst durch ein steriles Skalpell halbiert und ein Teil mittels einer Feinwaage gewogen. Dabei betrug das Gewicht eines Gewebestückes im Mittel 25-50 mg.

Dieses wurde dann in ein separates Eppendorf-Gefäß überführt. Alle CL-Stücke wurden während der Einwaage auf Eis gelagert, die nicht verwendeten CL-Stücke wurden sofort nach Beendigung des Arbeitsschrittes wieder bei  $-95^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Zu den ausgewogenen CL-Stücken wurde anschließend das 10-fache Volumen Lyse-Puffer hinzu pipettiert und mit einer Eppi-Pistille homogenisiert. Danach wurde das äquivalente Volumen an 64 % Ethanol zum Lyse-Puffer pipettiert und der Inhalt durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf das im Kit enthaltene Filter-System gegeben und für 1 min bei  $16.464 \times g$  zentrifugiert. Dabei wurden selektiv RNA-Moleküle mit einer Länge von über 200 Basen an der Glasfaser-Membran des Filters adsorbiert, während Proteine und Salze den Filter passierten und in das darunter befindliche Sammelröhrchen gelangten. Das beigemengte Ethanol begünstigte diesen Vorgang.

Um kontaminierendes Material aus dem Filter zu entfernen, wurde dieser mit Waschlösungen dreimal gewaschen. Dabei wurden jeweils  $700 \mu\text{l}$  der Waschlösung # 1 und zweimal  $500 \mu\text{l}$  der Waschlösung # 2/3 über das Filter-System gegeben und jeweils für 1 min bei  $16.464 \times g$  zentrifugiert.

Der bei den einzelnen Schritten erzeugte Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugationsvorgang verworfen. Nach dem letzten Wasch-Schritt wurde das Filter-System einmal leer zentrifugiert, um Ethanol-haltige Rückstände der Waschlösungen vollständig zu entfernen.

Zum Schluss wurde das Filter-System in ein neues 2-ml-Sammelröhrchen eingebracht und die im Filter befindliche RNA mittels Elution in zwei Schritten gewonnen. Dazu wurden  $50 \mu\text{l}$  Elutions-Lösung, welche zuvor auf  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzt wurde, direkt auf die Glasfaser-Membran pipettiert. Daran schloss sich ein Zentrifugationsschritt für 30 sec bei  $16.464 \times g$  an. Mit einer Menge von  $30 \mu\text{l}$  Elutions-Lösung wurde dieser Schritt wiederholt.

Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde direkt nach der letzten Zentrifugation auf Eis gelagert. Die Reinheit und Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch überprüft. Abschließend wurde die mRNA entweder sofort in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben oder bei  $-95^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Synthese von cDNA durch Reverse Transkription**

In der Reversen-Transkriptase-Reaktion wurde die aus dem Gewebe gewonnene RNA durch das Enzym Superscript™ II Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Um ausschließlich die für die Genexpressionsanalyse relevante mRNA in cDNA umzuschrei-

ben, wurden Oligo-(dt)<sub>12-18</sub>-Primer (2.2.3) verwendet, die sich an das Poly-A-Ende der mRNA Moleküle anlagerten und damit als Startregion für die Reverse Transkriptase dienten.

In einem 200 µl Reaktionsgefäß wurden 10 µl der RNA, 1 µl Oligo-(dt)<sub>12-18</sub>-Primer und 1 µl Trinukleotide gemischt. Die Komponenten wurden für 5 min bei 65°C im PCR Thermocycler "T-Gradient" zum Auffalten von Sekundärstrukturen der RNA inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und jeweils 7 µl des in der Zwischenzeit hergestellten Mastermix (Tab. 3) hinzugefügt.

Es folgte eine zweite Inkubation bei 42°C für 2 min, um das Temperaturoptimum für die Reverse Transkriptase zu erreichen. Durch Zugabe von 1 µl (200 U) Superscript™ II Reverse Transkriptase in den Reaktionsansatz und nachfolgender Inkubation bei 42°C für 50 min erfolgte die Reverse Transkriptase Reaktion.

Zum Stoppen der Reaktion und um eine Interaktion der bei der Umschreibung verwendeten Enzyme mit denen der nachfolgenden PCR zu vermeiden, wurde abschließend eine Enzym-Denaturierung bei 70°C für 15 min durchgeführt. Die so gewonnene einzelsträngige cDNA wurde für 14 Tage im Kühlschrank oder für mehrere Monate bei -20°C gelagert.

**Tab. 3: Mastermix für die Umschreibung von mRNA in cDNA.**

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5 x First-Strand-Buffer (250 mmol/l Tris-HCl, 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl <sub>2</sub> )	4,0 µl	
RNase Inhibitor (RNaseOUT™ )	1,0 µl	40 IU
Reduktionsmittel (DTT, Dithiothriol)	2,0 µl	0,1 mol/l

Alle Substanzen wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

### Überprüfung der Reinheit und Konzentration der cDNA und RNA.

Die Reinheit und die Konzentration der cDNA und RNA-Proben wurde im Eppendorf-Biophotometer (2.1) über die Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt.

Zur Messung im Photometer wurden die Proben 1:50 in TE-Puffer (2.2.6.8) verdünnt und in UltraVetten (8,5 mm; siehe 2.2.2) pipettiert. Die Reinheit der cDNA-Proben wurde über den Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm beurteilt. Als akzeptabel galten Quo-

tienten von 1,6 bis 2,0. Der Idealwert lag bei 1,8. Bei höheren Werten musste eine Kontamination der cDNA mit RNA vermutet werden. Niedrigere Quotienten wiesen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

Die Konzentration (C) in  $\mu\text{g/ml}$  wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) nach folgender Formel berechnet:

$$C[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50$$

### **2.3.5.2 Herstellung externer Standardreihen für die quantitative RT-PCR**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression durch eine absolute Quantifizierung der in der qRT-PCR (2.3.6) gemessenen Produkte vorgenommen.

Dazu wurde von jeder Zielsequenz ein externer Standard, ein so genanntes Messplasmid hergestellt. Es wurden Genabschnitte der jeweiligen Zielkomponenten mit spezifischen Primern amplifiziert und in einen Vektor (Plasmid) kloniert. Mit dem rekombinanten Plasmid wurde ein chemisch kompetenter *E.-coli*-Stamm (2.2.3) transformiert, in dem das Plasmid vervielfältigt wurde. Nach Extraktion aus den Bakterien wurden Länge und Sequenz des klonierten Genabschnitts verifiziert. Standardreihen der linearisierten Messplasmide wurden parallel zu den Proben in der qRT-PCR gemessen und zur Berechnung der Kopienzahl der jeweiligen Gene herangezogen.

### **Gewinnung der Zielsequenzen**

Die für die Klonierung erforderlichen Sequenzen der zu untersuchenden Komponenten wurden aus der cDNA boviner Zellen erhalten. Dazu wurden bovine MNC und bovine Makrophagen verwendet. Die Produktion von Zytokinen und Chemokinen wurde durch die Stimulation der Zellen mit Concanavalin A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Lipopolysaccharid ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und Staphylokokken Superantigen A [ $1 \text{ ng/ml}$ ] angeregt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h wurde die RNA der MNC (wie unter 2.3.5 beschrieben) extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

### **Amplifikation der cDNA mittels konventioneller RT-PCR**

Die Amplifikation der Zielsequenzen für die nachfolgende Klonierung erfolgte mittels konventioneller PCR in einem PCR-Thermocycler „T-Gradient“ (2.1). Für jede Zielsequenz wurde eine PCR-Reaktion mit  $5 \mu\text{l}$  cDNA und einem Mastermix (Tab. 4) in einem sterilen  $200 \mu\text{l}$  PCR-Röhrchen angesetzt. Zu Beginn der PCR wurde die cDNA für 3 min bei  $94^\circ\text{C}$  vollstän-

dig denaturiert. Danach erfolgten 30 Zyklen, die sich aus einem Denaturierungsschritt für 45 sec bei 94 °C, der Anlagerung der Primer für 30 sec bei 58 °C und der Verlängerung des Produkts für 1 min, 30 sec bei 72 °C zusammensetzten. Abschließend erfolgte die finale Extension für 10 min bei 72 °C, um sicherzustellen, dass der für die nachfolgende Klonierung erforderliche Adeninüberhang am 3`Ende des Amplikons durch die *Taq*-Polymerase (Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*; siehe 2.2.3) synthetisiert wurde. Die Proben wurden unmittelbar nach Ablauf der PCR für die Klonierung verwendet.

**Tab. 4: Mastermix für den PCR-Thermocycler „T-Gradient“.**

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Rxn Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	5 µl	1x
10 mmol/l dNTP Mix <sup>1</sup>	1 µl	0,2 mmol/l
50 mM MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1,5 µl	1,5 mmol/l
Primer Mix (jeweils 10 µmol/l)	2,5 µl	0,5 µmol/l
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <sup>1</sup>	0,25 µl	1 U
RNAse/DNAse-freies Wasser <sup>2</sup>	34,75 µl	

Die Substanzen wurden von den Firmen Invitrogen<sup>1</sup> und Sigma Aldrich<sup>2</sup> bezogen.

### Klonierung der Zielsequenz in den Vektor

Zur weiteren Vervielfältigung der Zielsequenz wurde diese in ein Plasmid kloniert, das nachfolgend zur Transformation von Bakterien genutzt wurde. Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle, unabhängig von der chromosomalen DNA, vermehrt werden. In dieser Arbeit wurde das Plasmid pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> mit einer Länge von 3931 Nukleotiden verwendet. Es verfügt sowohl über ein Gen für Ampicillinresistenz als auch über ein lacZ-Gen an der Ligationsstelle. Bei der TOPO<sup>®</sup> Cloning Reaktion wurden 3 µl des frischen PCR-Produktes, 1 µl Salzlösung und 1 µl Wasser (RNAse-/DNAse-frei) mit 1 µl TOPO<sup>®</sup> Vektor für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit umgehend für die Transformation chemisch kompetenter *E.-coli*-Bakterien verwendet.

### Transformation chemisch kompetenter *E.-coli*-Bakterien

Nach der Ligation erfolgte die Transformation des Plasmids in chemisch kompetente *E.-coli*-Bakterien. Das Einbringen des Vektors wurde mittels Hitzeschocktransformation vorgenom-

men. Dazu wurden 2 µl des frischen Ligationsansatzes mit 50 µl der Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Öffnung der Zellwand und Aufnahme der Plasmide durch Hitzeschock bei 42°C im Heizblock für 30 sec. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C. Medium (Reagenz des TOPO TA Cloning® Kit) wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

In dieser Zeit konnten die transformierten Bakterien, die das Gen für die Ausbildung einer Ampicillinresistenz mit dem Vektor erhalten hatten, die Antibiotika-Resistenz ausbilden, bevor sie auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte (2.2.6.9) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Nur diejenigen Bakterien, die erfolgreich mit dem Plasmid transformiert wurden, konnten sich zu Kolonien auf dem Ampicillin-haltigen Agar entwickeln.

Um zusätzlich eine Aussage darüber treffen zu können, ob das transformierte Plasmid rekombinant war, also die Zielsequenz enthielt, besaß der Vektor ein lacZ-Gen, das für das Enzym β-Galaktosidase kodiert. Innerhalb dieses Genes lag der Ligationsbereich des Vektors, so dass bei einer erfolgreichen Ligation dieses Gen nicht mehr funktionsfähig war.

Dem Festagar wurden x-Gal, ein chromogenes Substrat für β-Galaktosidase, das bei Umsetzung blau erscheint sowie IPTG, ein Galaktose-Derivat, das als künstlicher Induktor des Laktose Operons fungiert und nicht in den Metabolismus der Bakterien eingeht, beigesetzt. So konnten die Bakterienkolonien mit erfolgreich ligierten Plasmid das x-Gal nicht umsetzen und erschienen weiß, während die Kolonien mit intaktem lacZ-Gen durch IPTG Galaktosidaseaktivität entwickelten und durch die Umsetzung von x-Gal eine blaue Färbung aufwiesen. Dies ermöglicht die Vorselektion der gewünschten Bakterienkolonien, die dann direkt isoliert und in LB-Flüssigmedium vermehrt wurden.

### **Extraktion der Plasmide**

Zur Untersuchung des Vorhandenseins rekombinanter Plasmide in den Bakterien wurden einzelne Kolonien in 3 ml Ampicillin-haltiges Medium überführt und für 12-16 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Jeweils 1 ml der Suspension wurde bei 4°C bis zum Abschluss der Untersuchungen aufbewahrt, um ggf. für die Herstellung eines Glycerolstocks zur Verfügung zu stehen. Die verbleibenden 2 ml der Bakterien suspension wurden für die Plasmidextraktion mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (2.2.3) verwendet, aus dem alle im Folgenden beschriebenen Komponenten stammen.

Die Methode basiert auf einer Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen (Birnboim und Doly, 1979) und der anschließenden Adsorption der DNA auf einer Silica-Membran in einem System aus einer Mini-Säule und einem Auffangbehälter. Die Bakterien wurden dafür zunächst für 10 min bei 8.400 x g pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 250 µl Puffer P2 hinzugefügt und durch mehrmaliges Schwenken durchmischt. Zur Kontrolle war dem Puffer P1 Lyse-Blau-Reagenz zugesetzt, welches in P1 präzipitert und sich bei Mischung mit P2 löst und blau erscheint. Die Proben wurden solange geschwenkt bis sie eine gleichmäßige blaue Färbung aufwiesen. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 wurde die Probe unter mehrmaligem Schwenken farblos. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14.196 x g. Der Überstand wurde dann in ein im Kit enthaltenes Säulen-System pipettiert und nochmals 1 min bei 14.196 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Das Säulen-System wurde anschließend einmal mit 500 µl Puffer PB (1 min, 14.196 x g) und ein zweites mal mit 750 µl Puffer PE (1 min, 14.196 x g) gewaschen, der Durchlauf wurde jedes Mal verworfen. Zur Entfernung von Waschpufferresten wurde die Probe einmal leer zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein frisches Eppendorf-Gefäß gesetzt und mit 50 µl Puffer EB beschickt. Nach einer Inkubation von 1 min wurde das Plasmid bei 14.196 x g über 1 min eluiert.

Das Vorhandensein der klonierten Sequenz in den extrahierten Plasmiden wurde umgehend in der konventionellen PCR und mittels anschließender Agarosegelelektrophorese (s.u.) überprüft. Bakterienkolonien, die das gewünschte rekombinante Plasmid enthielten, wurden für die Anlage eines Glycerolstocks (850 µl Bakteriensuspension + 50 µl Glycerol) in Kryoröhrchen verwendet. Die Bakterienstocks wurden bei -95°C eingefroren.

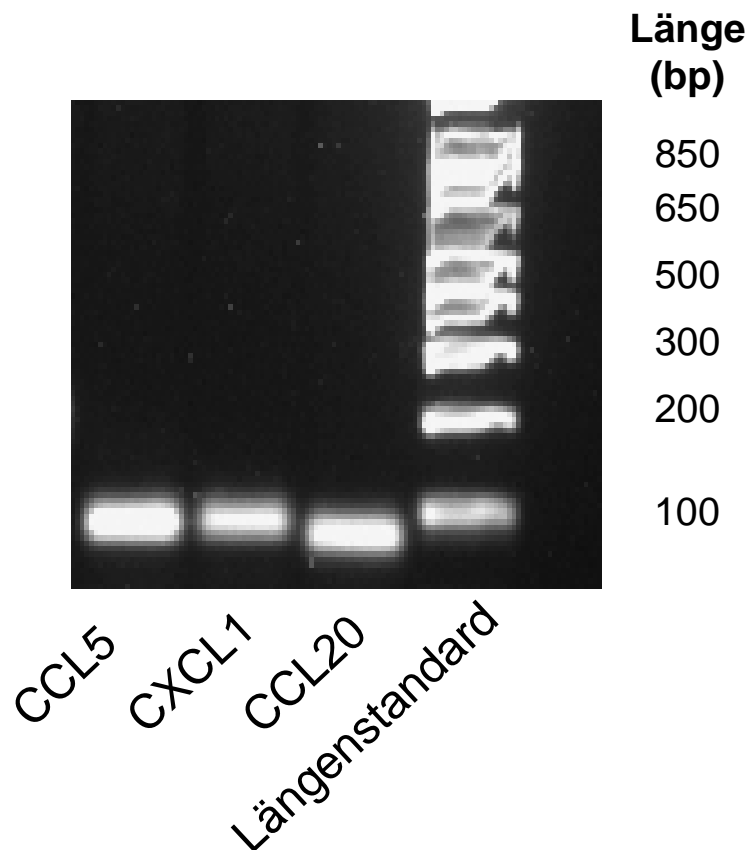
Zur Überprüfung der Vollständigkeit der klonierten Sequenz wurden 600-700 ng der Plasmid-DNA aller ausgewählten Chemokine und TNF- $\alpha$  mit 5 pmol M13 Vorwärtsprimer aus dem TOPO Cloning Kit zur Sequenzierung (SEQLAB, Göttingen) eingeschickt. Alle klonierten Sequenzen enthielten die erforderlichen Sequenzen.

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Farbstoff Gel Star (2.2.3) sichtbar gemacht. Anhand eines mitgelaufenen Größenstandards wurde geprüft, ob die Größen der Amplifikate mit denen der klonierten Zielsequenzen übereinstimmen. Im elektrischen Feld wanderten die DNA-Fragmente abhängig ihrer Größe, der Stromstärke und der Spannung, den Pufferbedingungen und der Agarosekonzentration im Gel unterschiedlich schnell und weit. Je kleiner die aufzutrennenden Fragmente waren, desto schneller bewegen sie sich im elektrischen Feld. Der dem Gel zugesetzte Farbstoff interkaliert mit der doppelsträngigen DNA, wodurch diese im Ultraviolett-Licht sichtbar wurden.

Das Agarosegel wurde wie unten beschreiben hergestellt und in die Gelelektrophoresekammer, in die ein Kamm für die Probenfächer gesteckt war, gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm gezogen. Auf einem Stück Parafilm wurden 10 µl der DNA-Probe mit 4 µl Blaumarker gemischt und dann in die entsprechende Probenfächer des Gels gegeben. Der Blaumarker ermöglichte zum einen die Kontrolle der Lauffront während der Gelelektrophorese, zum anderen wurde durch das in ihm enthaltene Glycerin die Probe beschwert und sank besser in die Probenfächer ab. In eine Fächer des Gels wurden 3 µl eines 1 Kb-DNA-Längenstandards zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente pipettiert. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in 1x TBE-Puffer bei einer Spannung von 85 Volt über 45 min durchgeführt. Anschließend wurden im ultravioletten Licht die Banden kontrolliert und mit einem Gel-Imager fotografiert (Abb. 2).





**Abb. 2: Amplifizierte DNA-Fragmente nach Farbstoff-Markierung.** Dargestellt wurden die Banden der Chemokine CCL5, CXCL1 und CCL20 nach Agarose-Gelelektrophorese. Anhand des DNA Längenstandards (2.2.3) wurde die Länge der Fragmente auf  $\leq 100$  Basenpaare bestimmt.

### Linearisierung der Messplasmide

Aufgrund der physikalisch schlechteren Bindung der Primer an das ringförmige Messplasmid wurde die dsDNA linearisiert. Es wurden nur Restriktionsenzyme gewählt, deren Schnittstellen sich nicht in den Zielsequenzen befanden, um eine Fragmentierung der gewünschten Gene zu vermeiden. Verwendet wurde für die Linearisierung von Messplasmiden mit CXCL1, CCL5 und CCL20 das Restriktionsenzym *Hind* III (2.2.3), welches zwischen den Basen 5`-A↓AGCTT-3` und 3`TTCGA↑A-5`schneidet. Für TNF- $\alpha$  und CXCL8-enthaltende Messplasmide wurde das Restriktionsenzym *Sca* I (2.2.3) verwendet (Schnittstellen: 5`-AGT↓ACT-3` und 3`-TCA↑TGA-5`). *Hind* III wurde aus *Haemophilus influenzae* isoliert, *Sca* I aus *Streptomyces caespitosus*. Zusammen mit dem 10-fach konzentrierten Puffer „REact<sup>®</sup> 2“ (2.2.3) schneiden die Restriktionsenzyme 1  $\mu$ g der dsDNA pro Stunde bei 37°C.

Nach der Linearisierung wurde das Amplikon mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (2.2.3) aufgereinigt. Das Kit entfernt über ein System von Wasch- und Trennsäulen enzymatische Rückstände und adsorbiert die DNA unter alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} \geq 7,5$ ) an eine Silica-Membran. Alle Zentrifugationsschritte (1 min,  $14.196 \times g$ ) wurden bei RT durchgeführt. Alle im Folgenden benannten Reagenzien sind Bestandteile des QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit.

Zunächst wurde die Probe in einem Eppendorf-Gefäß im Verhältnis 1:6 mit Puffer PBI gemischt. Das Einhalten des pH-Werts von  $\geq 7,5$  wurde durch die gelbe Farbe der Lösung angezeigt. Die Probe wurde auf ein mitgeliefertes Säulen-System gegeben und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule einmal mit  $750 \mu\text{l}$  Puffer PE gewaschen und einmal leer zentrifugiert. Der Durchlauf wurde jedes Mal verworfen. Für die Elution der DNA wurde die Säule in ein frisches Eppendorf-Gefäß gesetzt, mit  $50 \mu\text{l}$  Puffer EB bestückt und zentrifugiert. Von den aufgereinigten Messplasmiden wurden nach der Prüfung der Reinheit umgehend Verdünnungsreihen hergestellt.

### **Berechnung der Kopienzahl**

Für die Herstellung von externen Standardreihen wurde die Anzahl der Kopien pro  $\mu\text{l}$  bestimmt. Durch die Messung der optischen Dichte bei  $260 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{260}$ ) im Eppendorf-Biophotometer wurde die Konzentration der doppelsträngigen Plasmid-DNA entsprechend der unten beschriebenen Formel berechnet. Mittels dieser Information und der bekannten Länge der Zielsequenz war es möglich, die genaue Kopienzahl mit folgender Formel zu errechnen

$$\text{MW} = P \times 660 \text{ g/mol}$$

$$S[\text{Kopien}/\mu\text{l}] = \frac{6 \times 10^{23} [\text{Kopien/mol}] \times \text{DNA}[\text{g}/\mu\text{l}]}{\text{MW}[\text{g/mol}]}$$

MW = Molekulargewicht des PCR-Produkts

P = PCR-Produktlänge in Basenpaaren

S = Standardkonzentration

DNA = im Photometer gemessene DNA Konzentration

660 g/mol = Durchschnittliches molekulares Gewicht der Basen

Aus der Stocklösung mit der berechneten Anzahl von Kopien pro  $\mu\text{l}$  wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt ( $10^9$  –  $100$  Kopien/ $\mu\text{l}$ ), die anschließend in der qRT-PCR geprüft wurde.

Die Standardreihe wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dreimaligem Auftauen wurden die Verdünnungen verworfen und neu angesetzt.

### **2.3.6 Quantitative Real Time-PCR**

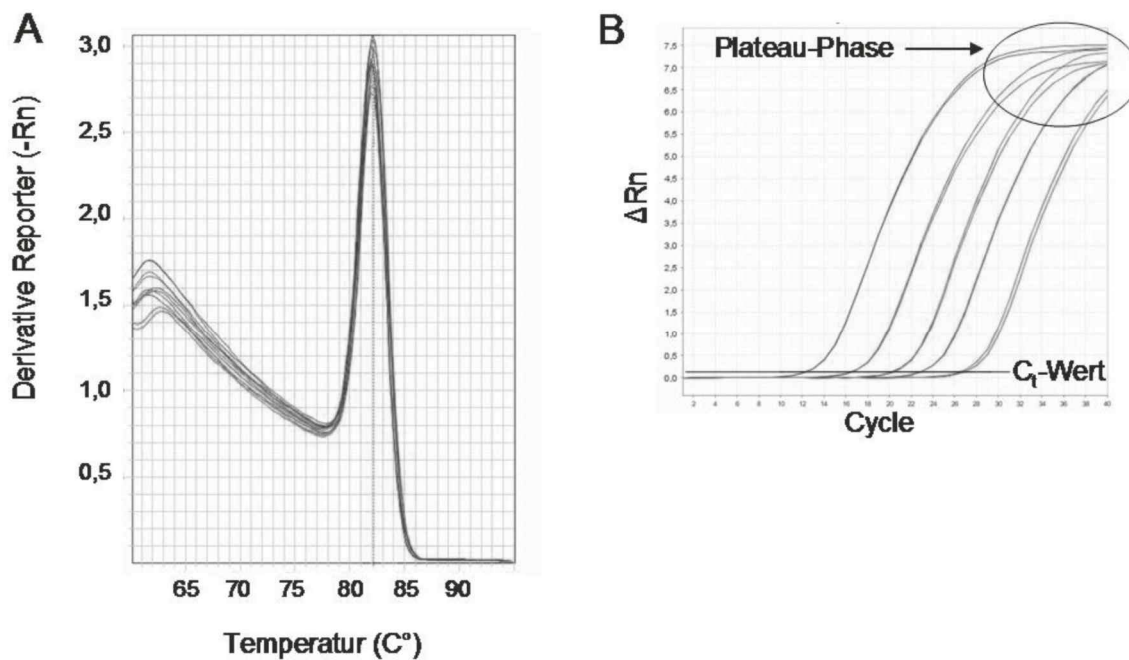
#### **Prinzip der quantitativen Real Time-PCR**

Bei der qRT-PCR findet eine Quantifizierung der PCR-Produkte in „Echtzeit“, das heißt während der Amplifikationszyklen statt. In den Reaktionsansätzen befindet sich der Farbstoff SYBR Green (2.2.3), der nach der Anlagerung an die kleine Windung doppelsträngiger DNA grün fluoresziert. Die Fluoreszenz steht dabei in direktem Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA und wurde über die gesamte Laufzeit durch die StepOne<sup>TM</sup> Software Version 2.0 aufgezeichnet.

Wie eine konventionelle PCR besteht auch die qRT-PCR aus der Wiederholung der drei Reaktionsschritte: 1) Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA, 2) Anlagerung der Primer und 3) Verlängerung des Produkts. Der Ablauf der drei Reaktionsschritte wurde als Zyklus bezeichnet. Eine vollständige PCR umfasst 40 bis 50 Zyklen.

In den frühen Zyklen der PCR kommt es lediglich zu einem basalen Fluoreszenzsignal, das auch als Hintergrundsignal bezeichnet wird. In Abhängigkeit von der initialen Menge an DNA im Reaktionsansatz steigt nach einer bestimmten Zyklenanzahl die Fluoreszenz des PCR-Produkts exponentiell an. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz aus dem Hintergrundsignal in eine exponentielle Phase übergeht, wird als Cycle threshold ( $C_t$ ) bezeichnet und korreliert direkt mit der ursprünglichen Kopienzahl der Proben. Die exponentielle Phase geht im weiteren Verlauf der PCR, aufgrund von Inhibition durch Reaktionsprodukte und Enzymlimitierung, zunächst in eine lineare Phase und letztendlich in eine Plateauphase über (Abb. 3).

Da SYBR Green unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, wurde nach den Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Proben schrittweise denaturiert. Abhängig der Größe der Amplifikationsprodukte zerfallen diese zu einem bestimmten Zeitpunkt und es findet ein schlagartiger Abfall der Fluoreszenz statt (Abb. 3). Befanden sich verschiedene Produkte im Reaktionsansatz, wurde dies durch eine mehrgipfelige Schmelzkurve sichtbar.



**Abb. 3: Schmelzkurve und Amplifikations-Plot einer qRT-PCR.** Dargestellt wurden A) die Schmelzkurve von CXCL8 in Abhängigkeit von der Temperatur und B) der Anstieg des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der PCR-Zyklenanzahl einer Standardverdünnungsreihe von CXCL8 (Amplifikations-Plot).

### Primeroptimierung

Die optimale Konzentration von Vorwärts- und Rückwärts-Primern ist je nach Primer und Gerät unterschiedlich. Daher wurden vor der Messung der Proben die optimalen Primerkonzentrationen für die zu untersuchenden Gene ermittelt. Entsprechend der Matrix aus Abb. 4 wurde für jede Konzentration ein Duplikat aus der Standardreihe (1.000 Kopien/ $\mu$ l, Positivkontrolle) und ein Duplikat DNase/RNase-freies Wasser (Negativkontrolle) eingesetzt. Ausgewählt wurde diejenige Kombination von Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Konzentration, bei der eine höchstmögliche Sensitivität bei niedriger oder fehlender Amplifikation in der Negativkontrolle vorlag.

		Rückwärts-Primer (nmol/l)		
		50	300	900
Vorwärts-Primer (nmol/l)	300			
	900			

**Abb. 4: Matrix für die Primeroptimierung.** Dargestellt wurden die Kombinationen der einzelnen Konzentrationen von Vorwärts- und Rückwärts-Primern (nmol/l).

### Messung unbekannter Proben

In der qRT-PCR wurde die Beeinflussung der Genexpression der Chemokine CXCL1, CXCL8, CCL5 und CCL20 und des Zytokins TNF- $\alpha$  im bovinen Lutealgewebe nach Tötung des Rindes im Schlachthof (2.2.4.2), sowie nach anschließender Inkubation in M199 mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und TNF- $\alpha$  untersucht (2.3.3). Zusätzlich wurde vor Entnahme der CL am Tag 10 p.ov. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  injiziert (2.2.4.3) und anschließend die Expression der Chemokine und TNF- $\alpha$  gemessen. Für die Durchführung wurde der SYBR Green<sup>®</sup> PCR Master Mix verwendet.

Die Proben wurden, wie in 2.3.5 beschrieben extrahiert, in cDNA umgeschrieben und auf eine Konzentration von 200 ng/ $\mu$ l eingestellt. Für jede Messung wurden mindestens fünf Punkte (10<sup>2</sup> bis 10<sup>6</sup>) der Standardreihe und eine Negativ-Kontrolle eingesetzt. In eine Micro Amp<sup>™</sup> Fast 96-well PCR-Platte wurden pro Vertiefung jeweils 1  $\mu$ l cDNA und 24  $\mu$ l des entsprechenden Mastermix (Abb. 4) pipettiert. Alle Ansätze wurden in Duplikaten angelegt.

Zu Beginn der PCR wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung der DNA einmalig für 10 min auf 95°C erhitzt. Danach erfolgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung der Proben bei 95°C über 15 sec und der Anlagerung der Primer und der Verlängerung des Produkts bei 60°C über 1 min. Nach Ablauf der Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Proben von 60°C in Schritten von 0,3°C unter ständiger Aufzeichnung der Fluoreszenz auf 95°C erhitzt.

**Tab. 5: Mastermix für CXCL1, CCL5 und CCL20 Volumina in  $\mu\text{l}$  pro Reaktion.**

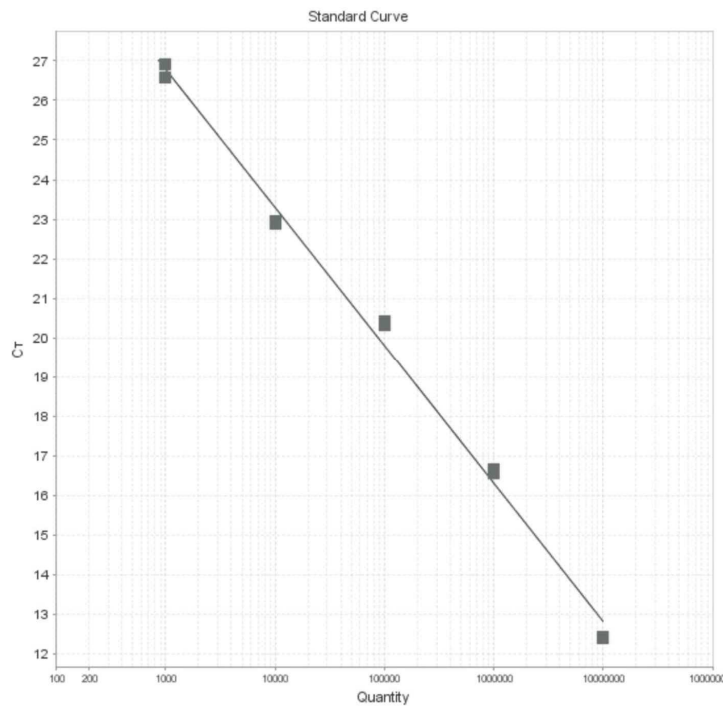
Reagenz	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
SYBR Green <sup>®</sup> PCR Master Mix	12,5
Wasser (RNase-DNase-frei)	8,5
Vorwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1,5
Rückwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1,5

**Tab. 6: Mastermix für CXCL8 und TNF- $\alpha$  Volumina in  $\mu\text{l}$  pro Reaktion.**

Reagenz	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
SYBR Green <sup>®</sup> PCR Master Mix	12,5
Wasser (RNase-DNase-frei)	9,75
Vorwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1,5
Rückwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	0,25

### Auswertung

Die StepOne<sup>™</sup> Software zeichnete die Fluoreszenz von SYBR Green<sup>®</sup> auf und legte für die einzelnen Proben die  $C_t$ -Werte fest. Für die eingesetzten Punkte des externen Standards mit bekannter Kopienzahl wurden ebenso die  $C_t$ -Werte festgelegt. Durch die logarithmische Darstellung der ermittelten  $C_t$ -Werte gegen die Kopienzahl der Standardpunkte entstand eine Standardkurve (Regressionsgerade), anhand derer die in den Proben enthaltene Kopienzahl der zu bestimmenden Gene abgeleitet wurde.



**Abb. 3: Standardkurve der Messplasmide von CXCL1 in einer Verdünnung von  $10^{-6}$  bis  $10^{-2}$**

Zur Validierung der PCR wurden die Parameter Steigung der Regressionsgeraden, Effizienz, Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) und Güte der Schmelzkurve herangezogen. Aus der von der Software berechneten Steigung der Gerade lässt sich die Effizienz der Amplifikation ermitteln. Bei einer Steigung von -3,32 liegt eine 100%-ige Effizienz der Amplifikation vor, d. h. das Produkt verdoppelt sich in jedem Zyklus. Steigungen von  $< -3,1$  oder  $> -3,6$  (entspricht einer Effizienz von 90-110%) gelten als auswertbar.

Ist die Amplifikation nicht ausreichend effizient, so können die Ausgangsmengen nicht exakt berechnet werden. Zusätzlich wurde von der Software das Bestimmtheitsmaß berechnet. So wurde der lineare Zusammenhang zwischen  $C_t$ -Werten und eingesetzter Kopienzahl überprüft, dabei sollte  $R^2$ -Werte  $> 0,985$  annehmen. Bei der Analyse der Schmelzkurve durfte lediglich ein einzelner Peak auftreten, um sicherzustellen, dass nur ein Produkt amplifiziert wurde. Nur wenn die genannten Parameter den vorgegebenen Kriterien entsprachen, wurden die von der Software nach der Regressionsgerade berechneten Kopienzahlen der unbekanntenen Proben für die weitere Auswertung verwendet.

## **2.3.7 Zellbiologische Verfahren**

### **2.3.7.1 Durchflusszytometrie**

Bei dieser Methode wurden Einzelzellen in einem Probenführungssystem an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Gestreutes Licht einer speziellen Wellenlänge (hier 488 nm) wurde in Richtung des Strahls als so genanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder im 90° Winkel dazu, als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), erfasst. Durch die Vorwärtsstreuung wurden die Größe des Partikels und dessen Refraktionsindex, durch die Seitwärtsstreuung die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) charakterisiert. Die Signale wurden aufgefangen und an den angeschlossenen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe dieses Computers wurden die Geräteeinstellungen kontrolliert, Messereignisse erfasst und gespeichert (Ormerod et al., 1990; Radbruch, 1992).

Bei dem für diese Versuche verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um ein FACScan<sup>®</sup>-Gerät mit einem Argonlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt. Das Gerät erfasst mit entsprechenden Detektoren Fluoreszenzlicht-Emissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen (FL-1 = Grünfluoreszenz: 515-545 nm; FL-2 = Orangefluoreszenz: 564-606 nm; FL-3 = Rotfluoreszenz: > 650 nm). Jedes Messereignis wurde damit durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3) charakterisiert.

Mit Hilfe der Software WinMDI Version 2.8 (Purdue University Cytometry Laboratories, IN, USA), erfolgte die computergestützte Auswertung der Daten. Da die Werte einzelner Parameter stark von den Einstellungen für FSC, SSC und Fluoreszenzdetektoren abhängen, wurden nur solche Messungen miteinander verglichen, die mit identischen Geräteeinstellungen erfasst wurden. Zur Definition einzelner Untergruppen der Messereignisse („Events“) wurden nach der Messung softwaregestützt elektronische „Fenster“ (sog. „Gates“) gesetzt und zum Teil mehrere Fenster logisch miteinander verknüpft.

### **2.3.7.2 Quantifizierung vitaler Zellen mittels Referenzzellmethode**

Die Zahl vitaler Granulozyten in den unteren und oberen Kompartimenten der Transmigrationskammer wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Den Zellsuspensionen wurde eine bekannte Anzahl von Zellen zugesetzt. Diese Referenzzellen unterschieden sich in mindestens einem Parameter von den zu messenden Zellen, wurden aber mit den gleichen Geräteeinstellungen am Durchflusszytometer erfasst. Setzt man die Zahl der gemessenen, als Referenzzel-

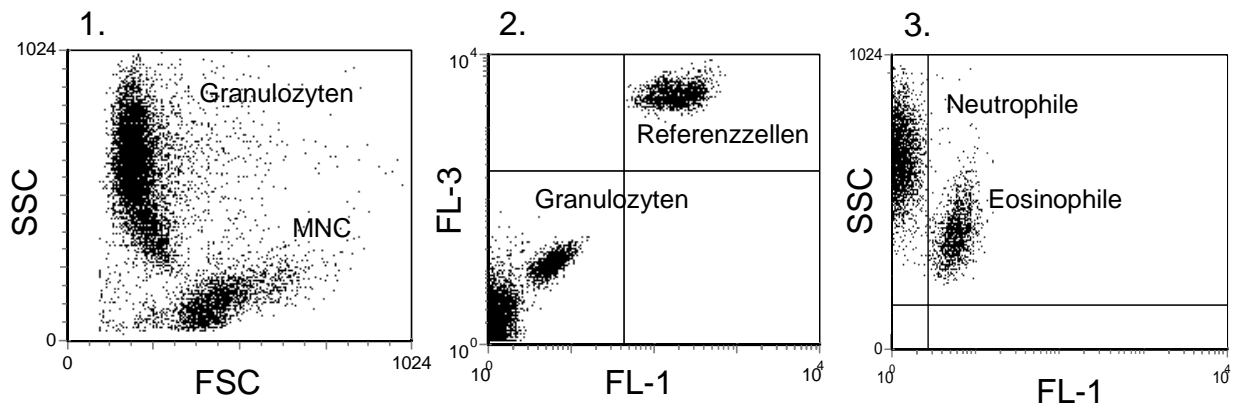


len identifizierten Events mit denen als vitale Zellen identifizierten gemessenen Events ins Verhältnis, so wurde auf den absoluten Gehalt vitaler Zellen geschlossen.

### **Herstellung von Referenzzellen**

Zur Färbung wurden jeweils  $2 \times 10^7$  frisch separierte bovine mononukleäre Zellen des Blutes in ein 15 ml Röhrchen (1.2.2) gegeben und bei  $80 \times g$  für 5 min sowie  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und mit demselben Volumen des unverdünnten monoklonalen Antikörpers Bo1 (Tab. 1) für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 5 ml MIF-Puffer (2.2.6.3) und ein Zentrifugationsschritt (7 min  $80 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen und das resuspendierte Zellpellet wurde mit 100  $\mu\text{l}$  des 1:40 verdünnten FITC-konjugierten Ziege-Anti-Maus Antikörpers (Tab. 1) versetzt und 20 min unter Lichtabschluss bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 50 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Fixierung wurden die Zellen in 30 ml einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung (2.2.6.7) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 24 h bei  $4^\circ\text{C}$  unter Lichtabschluss wurden sie für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, dekantiert und ein zweites Mal in PBS gewaschen. Dieses nun gewonnene Zellpellet wurde in der Propidiumjodid (PJ)-haltigen Trägerflüssigkeit aufgenommen (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PJ) und auf  $4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Konzentration wurde vor dem Einsatz kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Referenzzellen waren charakterisiert durch ihre Morphologie (mononukleäre Zellen) sowie ihre Rotfluoreszenz (FL-3) und ihre Grünfluoreszenz (FL-1, siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Erfassung vitaler, migrierter Granulozyten und von Referenzzellen im Dotplot.** 1: Granulozyten und mononukleäre Zellen (MNC) nach Größe (FSC) und Komplexität der Zellen (SSC) getrennt. 2: Vitale Granulozyten (FL-1/ FL-3 negativ) und FITC-, sowie PJ-markierte Referenzzellen (FL-1/ FL-3 positiv). 3: Trennung von Neutrophilen und eosinophilen Granulozyten durch die beim Rind typische, grüne Eigenfluoreszenz von Eosinophilen (FL-1 positiv).

### Quantifizierung vitaler Zellen am Durchflusszytometer

Zellsuspensionen nach der *in-vitro*-Transmigration (2.3.7.3) wurden in ein Durchflusszytometerröhrchen überführt, in dem 100 µl Trägerflüssigkeit mit PJ (4 µg/ml) vorgelegt war. Dazu wurden 50 µl oder 200 µl Referenzsuspension (5x10<sup>4</sup> Zellen, 2x10<sup>5</sup> Zellen) pipettiert. Angestrebt wurde ein Verhältnis von Referenzzellen zu Immunzellen von ca. 1:1 bis 1:3. Waren höhere oder niedrigere Zahlen der Immunzellen zu erwarten, wurde die Zahl eingesetzter Referenzzellen entsprechend angepasst. Nach durchflusszytometrischer Erfassung des Zellgemisches (10.000 Ereignisse) wurde die Zahl der Ereignisse für Referenzzellen (FL-1/FL-3 positiv) und für vitale Zellen (FL-1/FL-3 negativ) erfasst (Abb. 5). Beides erfolgte nach einem Gating auf morphologisch identifizierbare Zellen im FSC/SSC-Dotplot. Die absolute Zahl vitaler Zellen errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{vitale Zellen} = \frac{\text{gemessene Ereignisse (vitale Zellen)} \times \text{eingesetzte Zahl Referenzzellen}}{\text{gemessene Ereignisse Referenzzellen}}$$

### 2.3.7.3 Transmigrationsassay mit Corpora lutea-Gewebekulturüberständen

Für den indirekten Nachweis von chemoattraktiv wirkenden Substanzen in CL-Gewebeüberständen von zyklischen und trächtigen HF-Rindern (2.2.4.2) wurden 315 µl des CL-Gewebeüberstandes im Doppelansatz in die „blinden“ Vertiefungen des unteren Kammerteils (2.2.2) gegeben. Als positive Kontrolle des Migrationsverhaltens der Granulozyten

(2.3.4) wurden 315 µl Medium RPMI 1640 (2.2.3) mit einem Zusatz von 0,1 µg/ml rhCXCL8 (rekombinantes humanes Interleukin-8 (2.2.3) gegeben. Beide Medien wurden mit 100 µl 100%igem isotonen Percoll<sup>®</sup> (2.2.3) unterschichtet. Dadurch wurde die Adhärenz der gewanderten Zellen am Boden der Vertiefungen vermindert.

Die zehn Vertiefungen des unteren Kammerteils wurden nun mit einer Polycarbonatmembran bedeckt. Dabei war es wichtig, dass sich unter der Membran keine Luftblasen ansammelten, da an diesen Stellen eine Migration von Zellen unterblieb. Erreicht wurde das durch ein exaktes Einhalten des Flüssigkeitsvolumens von 415 µl in der unteren Vertiefung. Auf die Membran wurde die Silikondichtung und darüber der obere Kammerteil platziert und mittels Schraubenmuttern fixiert. In die Vertiefungen des oberen Kammerteils wurden abschließend jeweils 100 µl Zellsuspension mit  $2 \times 10^6$  Granulozyten (2.3.4) gegeben. Die Inkubation der Kammern erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über zwei Stunden.

Nach der Inkubation wurden die Zellsuspensionen der oberen Vertiefungen (= nicht gewanderte Zellen) sorgfältig abpipettiert und zur durchflusszytometrischen Auswertung in zuvor mit 100 µl Trägerflüssigkeit und 50 µl Referenzzellen (2.3.7.2) befüllte Durchflusszytometer-Röhrchen überführt. Dabei war auf Unversehrtheit der Polycarbonatmembran zu achten. Nach Entfernung der Zellsuspension in den oberen Vertiefungen wurde mit einer Pipettenspitze die Polycarbonatmembran durchstoßen und die Zellsuspension der „blinden“ Vertiefung in Durchflusszytometer-Röhrchen mit Trägerflüssigkeit und Referenzzellen überführt.

## **2.3.8 Histologische Nachweise**

### **2.3.8.1 Einbettung und Anfertigung von Corpora lutea-Gewebeschnitten**

Nachdem die Gewebestücke (2.3.1) fixiert worden waren, wurden die Einbettungskapseln in einem Gewebereinbettungsautomaten entwässert: Es folgte mindestens eine Stunde in frischem Formalin nachfixiert wurden, erfolgte die Spülung mit Leitungswasser. Mit 70 %-igem, 85 %-igem und 96 %-igem Alkohol schloss sich die Dehydrierung an. Anschließend wurden sie durch die Intermedien Isopropanol und Essigsäure-n-Butylester wieder vom Alkohol befreit und für die Paraffineinbettung vorbereitet. Danach wurden die Präparate in Metallschalen mit 60°C warmem Paraffin ausgegossen und bei -5°C auf einer Kühlplatte zum Erstarren gebracht. Somit wurden etwa 3 – 4 µm dicke Schnitte mit einem Rotationsmikrotom hergestellt. Die Schnitte für die histologischen Färbungen wurden nach Streckung im Wasserbad bei ca. 55°C auf Glasobjektträger, aufgezogen. Für die immunhistologischen Reaktionen

wurden adhäsive Objektträger (HistoBond®) verwendet, da diese eine besonders gute Haftung der Schnitte gewährleisten. Danach wurden die Schnitte für 12 Stunden zum Trocknen und zur Entfernung des überschüssigen Paraffins in einen Wärmeschrank bei 60°C aufbewahrt.

### 2.3.8.2 Histologische Färbungen

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-(HE) und die im Folgenden beschriebene Pappenheim-Färbung wurden Glasobjektträger ohne spezielle Beschichtung verwendet (2.2.2). Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine dichromatische Färbung, die sich aus dem basischen Kernfarbstoff Hämatoxylin und dem sauren Zytoplasmfarbstoff Eosin zusammensetzt.

#### HE-Färbungsprotokoll

1. filtriertes Hämalaun nach Delafield	8	min
2. 0,1 % HCl-Alkohol: ganz kurz tauchen		
3. unter fließend Leitungswasser spülen	15	min
4. Eosin (1 % in Aqua dest.)		
+ 3-4 Tropfen 100 % Essigsäure	5	min

#### Entwässerung

Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 96 %) und Isopropanol mit einer Inkubationszeit von jeweils 2 min. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 mal für jeweils 5 min in Xylol inkubiert und anschließend mit Eukitt® eingedeckt.

#### Pappenheim Färbungsprotokoll

Zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten, deren Granula sich durch die Pappenheimfärbung leuchtend rot darstellt, wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

May-Grünwald-Lösung	4	min
Leitungswasser		kurz spülen
Giemsa 3 % in Aqua dest.	5	min
Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Eukitt®.		

### 2.3.8.3 Immunhistochemischer Nachweis

#### Prinzip der EnVision®-Technik zum Nachweis von Antikörpern

Bei der EnVision®-Technik wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Dabei bindet der Primarantikörper am Schnitt am entsprechenden Antigen. An den Primarantikörper bindet der Sekundarantikörper, der auf einem Dextran-Polymer mit dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Das Enzym HRP setzt das Substrat DAB (Diaminobenzidin, 2.2.3) in ein braunes, unlösliches Präzipitat um. Durch diese Braunfärbung wurde das Vorhandensein des Primarantikörpers und damit des entsprechenden Antigens indirekt nachgewiesen. Im EnVision® Detectionssystem (2.2.3) sind der HRP-markierte Sekundarantikörper sowie die DAB-Lösung enthalten.

Der immunhistochemische Nachweis von Leukozyten im CL wurde an Paraffinschnitten (2.3.8.1) durchgeführt, welche auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen worden waren. Sie unterliefen folgender Behandlung:

#### Entparaffinierung

1. 2 mal Xylol	10	min
2. Isopropanol	2	min
3. 96 % Alkohol	2	min
4. 196 ml 80 % Alkohol + 4 ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30	min

Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde hinzugefügt, um endogene Peroxidase zu inaktivieren, da der verwendete Farbstoff später durch eine an anti-Maus IgG-gekoppelte Peroxidase oxidiert wurde.

5. 70 % Alkohol	2	min
6. 3 mal PBS	5	min

#### Aufbereitung mittels Tris EDTA-Citrat-Puffer (TEC-Puffer)

Die Aufbereitung mit dem TEC-Puffer (2.2.6.1) erfolgte, um das Präparat auf die Kopplung an den Antikörper vorzubereiten. Die durch die Fixierung entstandene Vernetzung der Proteine wurde aufgelockert, so dass der Antikörper besser an diese binden konnte. Zuerst wurden 60 ml TEC-Puffer + 540 ml Aqua dest. auf 96 – 98°C unter ständigem Rühren erhitzt. Im Anschluss wurden die Objektträger hineingestellt und erneut auf 96 – 98°C unter ständigem Rühren für einen Zeitraum von 30 min erhitzt.

### **Antikörperreaktion**

Hierfür wurden die Präparate in eine feuchte Kammer gelegt, die mit nassen (Aqua dest.) Zellstofftüchern ausgelegt war. Folgende Substanzen wurden mittels einer Pipette in der genannten Reihenfolge auf das Objekt gegeben, um dann über einen bestimmten Zeitraum in der feuchten Kammer mit dem Objekt reagieren zu können.

Als erstes wurde 0,5 ml Ziegennormalserum in 2 ml PBS gelöst, auf den Gewebeschnitt aufgetragen und für mind. 20 min in der feuchten Kammer inkubiert. Ziegennormalserum fungiert als sog. „Blockserum“ und bindet elektrostatisch freie Proteingruppen, wodurch falsche Bindungen durch die spezifischen Antikörper verhindert werden. Im Anschluss wurde das Ziegennormalserum abgeklopft und der monoklonale Antikörper anti-CD45 (Tab. 1) unverdünnt aufgetragen und über Nacht in der feuchten Kammer im Kühlschrank auf dem Gewebeschnitt belassen. Zur Entfernung des Antikörpers wurden die Gewebeschnitte am nächsten Tag 3 mal für 5 min in PBS gespült. Anschließend wurde der im EnVision<sup>®</sup> enthaltene Anti-Maus-IgG-Antikörper, an welchem die Peroxidase gekoppelt ist, auf den Gewebeschnitt pipettiert und für 45 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einer anschließenden Spülung in PBS (3 mal für 5 min) wurden die Schnitte mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) für 5 min inkubiert. Um das Substrat DAB nach Ablauf der Inkubationszeit wieder zu entfernen, wurden die Schnitte ein weiteres Mal in PBS (2 mal für 10 min) gespült.

### **Entwässerung**

Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 96 %) und Isopropanol mit einer Inkubationszeit von jeweils 2 min. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 mal für jeweils 5 min in Xylol inkubiert und anschließend mit Eukitt<sup>®</sup> direkt aus dem Xylol heraus ohne vorheriges Abtrocknen der Schnitte eingedeckt.

### **Negativkontrollen**

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden im Zuge der Antikörperreaktionen mit dem EnVision<sup>®</sup> Detectionssystem zusätzliche Präparate mitgeführt. Auf diese wurde anstelle des Antikörpers nur das Verdünnungsmedium PBS + 1 % bovines Serumalbumin gegeben. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu prüfen, wurde ein irrelevanter, nicht-reaktiver Kontrollantikörper (Tab. 1) zur Färbung von Kontrollpräparaten eingesetzt.

#### **2.3.8.4 Dokumentation der histologischen und histochemischen Befunde**

Die histologischen und histochemischen Präparate wurden mit Hilfe einer digitalen Mikroskopkamera in Kombination mit der Software NIS-Elements basic research (Nikon, Version 2.3) fotografisch festgehalten.

#### **2.3.9 Bestimmung des P<sub>4</sub>-Gehaltes durch den kompetitiven Doppelantikörper-Enzymimmunoassay**

Um die Aktivität der Lutealzellen in den Gewebekulturen (2.3.2) nachzuweisen, wurde der P<sub>4</sub>-Gehalt mittels eines kompetitiven Doppelantikörper-Enzymimmunoassays (EIA) nach Inkubation in den Zellkulturüberständen nachgewiesen.

Des Weiteren wurde zur Messung des P<sub>4</sub>-Gehaltes mittels des EIA Blutproben aus der Vena jugularis entnommen. Dies geschah bei 24 HF-Färsen am Tag 10 p.ov. und nach PGF<sub>2α</sub>-Injektion, kurz vor Entnahme des CL-tragenden Ovars (2.2.4.3). Bei 5 Färsen, welche keine PGF<sub>2α</sub>-Injektion erhielten (Kontrolle), wurde zur Bestimmung des P<sub>4</sub>-Gehaltes am Tag 10 p.ov. zwei Blutproben im Abstand von ca. 20 min entnommen.

Die hier eingesetzte EIA-Technik nach (Prakash et al., 1987) verwendet zwei Antikörper. Der erste Antikörper (Ziege-anti-Ratte-IgG, siehe Tab. 1) wurde an die Unterseite der 96-well Flachboden-Mikrotiterplatte gebunden. Im nächsten Schritt wurde ein zweiter Antikörper zugegeben (Tab. 1), welcher spezifisch P<sub>4</sub> erkennt. Nach Zugabe einer definierten Menge HRP-markierten P<sub>4</sub>-Antigen, des umsetzenden Enzyms und der zu messenden Probe, konkurrierten nun beide Antigene um die Bindungsstellen am spezifischen Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von mind. 12 Stunden wurde nach Entfernung des ungebundenen HRP-markierten P<sub>4</sub> Antigens die Substratlösung A und B (2.2.6.2) zugegeben und durch das gebundene HRP-markierte P<sub>4</sub>-Antigen in einer blauen Farbreaktion umgesetzt. Je mehr HRP-markiertes P<sub>4</sub> gebunden wurde, desto mehr Substrat wurde umgesetzt und desto weniger P<sub>4</sub> enthielt die Probe. Nach Stoppen der Reaktion mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.2.3) wurde die Menge an umgesetztem Substrat anhand der optischen Dichte bei 450 nm bestimmt. Folglich nimmt die Farbreaktion (gemessene Enzymaktivität) mit steigender Antigen-Konzentration ab.

## 2.4 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Programme SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary/North Carolina, USA, 1988) und StatView Version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) durchgeführt. Alle Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. In der deskriptiven Statistik wurden normalverteilte Daten durch den Mittelwert (MW), den Standardfehler (SEM), die Standardabweichung (s) sowie den Variationskoeffizienten (CV) beschrieben. Nicht normalverteilte Daten mit rechtsschiefer Verteilung wurden normalisiert, indem sie in den logarithmischen Wert der 10. Potenz umgerechnet wurden. Anschließend wurde ein weiteres Mal die Normalverteilung der logarithmierten Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet. Um zu prüfen, ob sich abhängige Stichproben zwei Klassen eines qualitativen Merkmals bezüglich eines quantitativen Merkmals unterscheiden, wurden die Mittelwerte mittels t-Test verglichen. Um Zusammenhänge zwischen quantitativen, normalverteilten Daten zu erfassen wurden Korrelationsanalysen nach Pearson durchgeführt. Die Beurteilung der Signifikanzen der Korrelationskoeffizienten (r) wurde anhand der Beschreibung von Petrie und Watson (2006) vorgenommen. Beziehungen zwischen zwei Parametern bzw. Unterschiede zwischen Parameterklassen oder abhängigen Stichproben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p < 0,05$ ) wurden als signifikant und jene mit  $p \geq 0,05$  als nicht signifikant bezeichnet.



### 3 Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen in wieweit immunologisch wirksame Substanzen des bovinen CL, wie Chemokine und Zytokine, den hormonellen Zyklus des Rindes beeinflussen. Die Ergebnisse gliedern sich in drei Abschnitte:

Im **ersten Abschnitt** sollten Substanzen im bovinen CL identifiziert werden, welche chemoattraktiv auf Granulozyten wirken oder eine pro-inflammatorische Wirkung aufweisen. Um evtl. vorhandene Unterschiede während der Blütephase des CL cyclicum im Vergleich zum CL graviditatis herauszustellen, wurde die Genexpression der ausgewählten Chemokine und TNF- $\alpha$  gemessen, die chemoattraktive Wirkung von löslichen Substanzen aus CL-Gewebekulturüberständen und die Anzahl von Leukozyten und Eosinophilen bestimmt.

Im **zweiten Abschnitt** wurde im Tiermodell und in der Gewebekultur geprüft, ob die identifizierten Substanzen an der PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induzierten Luteolyse beteiligt sind. Im **dritten Abschnitt** wurde in vitro untersucht, ob das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  zu einer Änderung der Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  im CL-Gewebe führt.

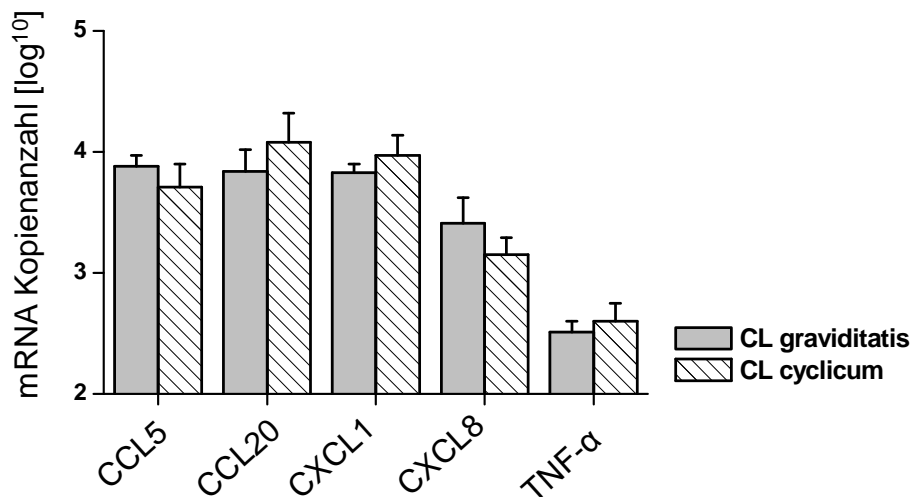
Generell wurde bei der Entnahme von CL-Gewebe die aufgrund von morphologischen und funktionellen Unterschieden in der Gefäßstruktur beschriebene Einteilung von (Shirasuna et al., 2008) in CL-„Peripherie“ und CL-„Zentrum“ übernommen, um Unterschiede zwischen diesen Lokalisationen im CL bestimmen zu können.

#### 3.1 Identifikation von immunologisch wirksamen Substanzen im bovinen Corpus luteum graviditatis und Corpus luteum cyclicum

Ob und in welcher Form immunologisch wirksame Substanzen, wie Chemokine und Zytokine, an der ausbleibenden Regression des CL während der Trächtigkeit beteiligt sind, wurde im Folgenden untersucht. Um Organmaterial für die Bestimmung von immunologisch wirksamen Substanzen während der Blütephase im CL cyclicum und im CL graviditatis zu gewinnen, wurden die CL tragenden Ovarien von frisch geschlachteten HF-Rindern entnommen (2.2.4.2). Mit Hilfe der qRT-PCR wurden Chemokine bestimmt, welche chemoattraktiv auf neutrophile (CXCL1 und CXCL8), oder auf eosinophile Granulozyten (CCL5) wirken. Des Weiteren wurde die Genexpression von CCL20 und TNF- $\alpha$  bestimmt, welche als typische proinflammatorische Mediatoren beim Rind bekannt sind.

### 3.1.1 Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$ im bovinen Corpus luteum graviditatis und cyclicum

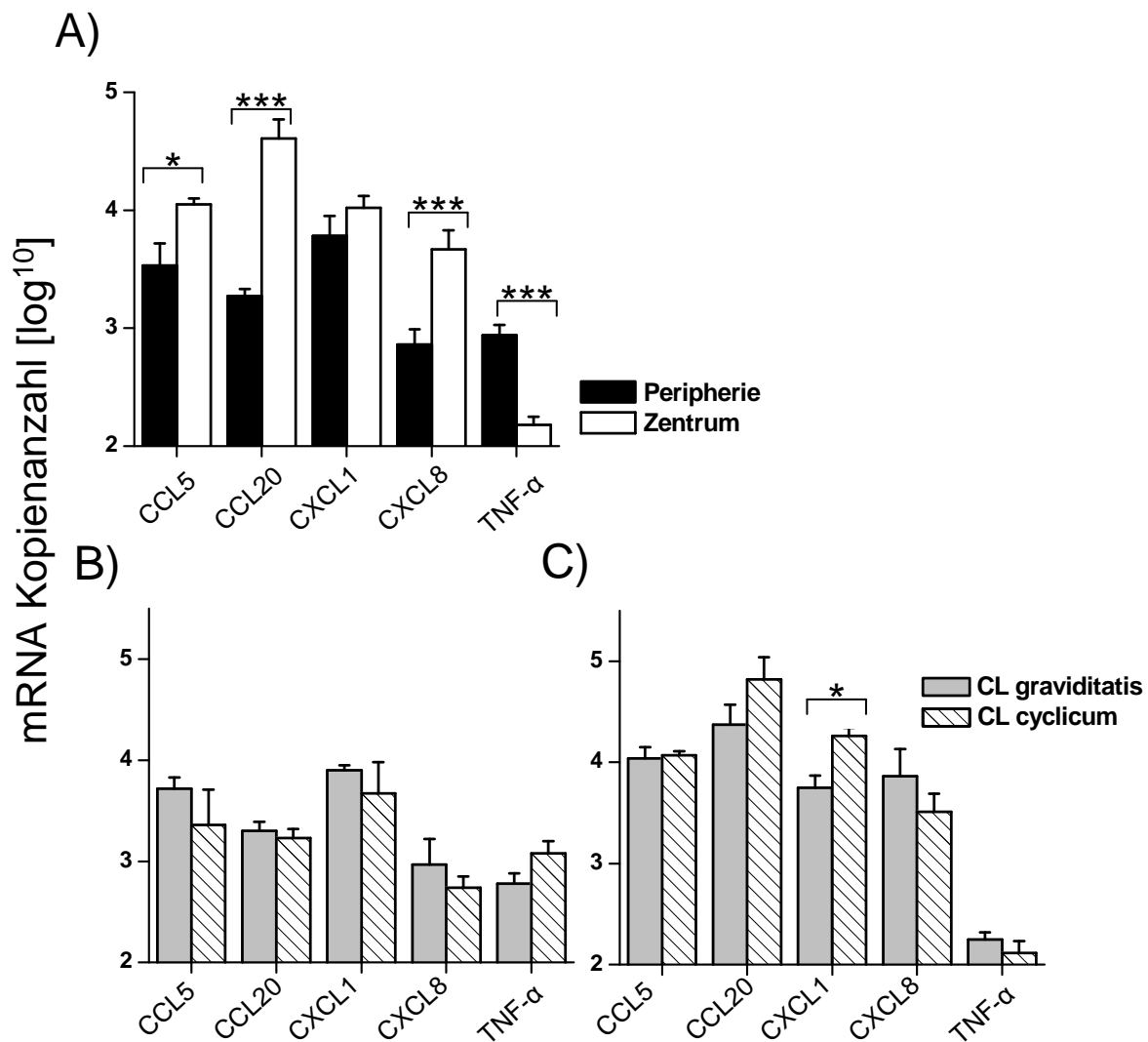
Mit Hilfe der qRT-PCR wurden die Chemokine CXCL1, CXCL8, CCL5, CCL20 sowie TNF- $\alpha$  in Blüte-CL bestimmt. Die Genexpressionsraten von CL graviditatis und CL cyclicum wurden miteinander verglichen. Dabei wurde die Lokalisation der Gewebeentnahme im CL (Peripherie /Zentrum) nicht berücksichtigt.



**Abb. 6: Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  von CL graviditatis (n=7) und CL cyclicum (n=8).** Die Genexpression wurde durch qRT-PCR erfasst (Mittelwerte + SEM aller Proben aus dem Zentrum und der Peripherie).

In 14 von 15 CL Proben aus der CL-Peripherie konnte eine Genexpression der ausgewählten Chemokine und TNF- $\alpha$  gemessen werden. In einem CL cyclicum (Peripherie) wurde keine Genexpression der Chemokine CCL20 und CXCL8 festgestellt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte in allen Proben aus dem CL Zentrum eine Genexpression der ausgewählten Chemokinen und TNF- $\alpha$  gemessen werden. Insgesamt erwiesen sich die Unterschiede der Genexpressionen zwischen CL graviditatis und CL cyclica als geringfügig und nicht signifikant (Abb. 6).

Um festzustellen ob sich die CL-Peripherie vom CL-Zentrum in der Höhe der Genexpression unterscheidet, wurde die mRNA-Kopienzahl getrennt nach diesen beiden Lokalisationen und ohne Berücksichtigung des CL-Typ analysiert (Abb. 7A). Anschließend wurde in Abhängigkeit von der CL-Lokalisation untersucht, ob sich die Genexpressionsraten zwischen CL graviditatis und CL cyclica unterscheiden (Abb. 7B, C).



**Abb. 7: Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  im Corpus luteum in Abhängigkeit von der Lokalisation.** A) CL Peripherie (n=15), CL Zentrum (n=15); ohne Berücksichtigung des CL-Typs. B) CL-Peripherie getrennt nach CL graviditatis (n=7) und CL cyclicum (n=8). C) CL-Zentrum getrennt nach CL graviditatis (n=7) und CL cyclicum (n=8). Die Genexpression wurde durch qRT-PCR (Mittelwerte + SEM) erfasst. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Betrachtet man Zentrum und Peripherie unabhängig vom CL-Typ (Abb. 7A), so unterscheiden sich die Lokalisationen im CL signifikant bezüglich der Genexpressionsstärken für die meisten der untersuchten Chemokine und TNF- $\alpha$ . Im Zentrum wurde CCL5 ( $p < 0,05$ ), CCL20 ( $p < 0,001$ ) und CXCL8 ( $p < 0,001$ ) signifikant stärker als in peripheren Bereichen exprimiert.

Interessanterweise erwies sich die TNF- $\alpha$ -Genexpression in der CL-Peripherie signifikant höher ( $p < 0,001$ ) als im CL-Zentrum. Die Genexpression von CXCL1 erwies sich als weitestgehend identisch zwischen Peripherie und Zentrum der CL.

Nach Unterteilung der Proben in Abhängigkeit von der Lokalisation im CL (Abb. 7B, C) und dem CL-Typ, wurden jedoch kaum signifikante Unterschiede der Genexpression sichtbar. So erwiesen sich die Unterschiede zwischen CL cyclicum und CL graviditatis bei Proben aus der Peripherie als geringfügig und nicht signifikant. Bei den Proben aus dem CL Zentrum lag allein bei CXCL1 die Genexpression des CL cyclicum signifikant höher ( $p < 0,01$ ) als im CL graviditatis.

Mit der Untersuchung der Genexpression von ausgewählten Chemokinen und TNF- $\alpha$  in Blüte-CL konnte gezeigt werden, dass in Bezug auf den CL-Typ (CL cyclicum/CL graviditatis) keine signifikanten Unterschiede bestanden.

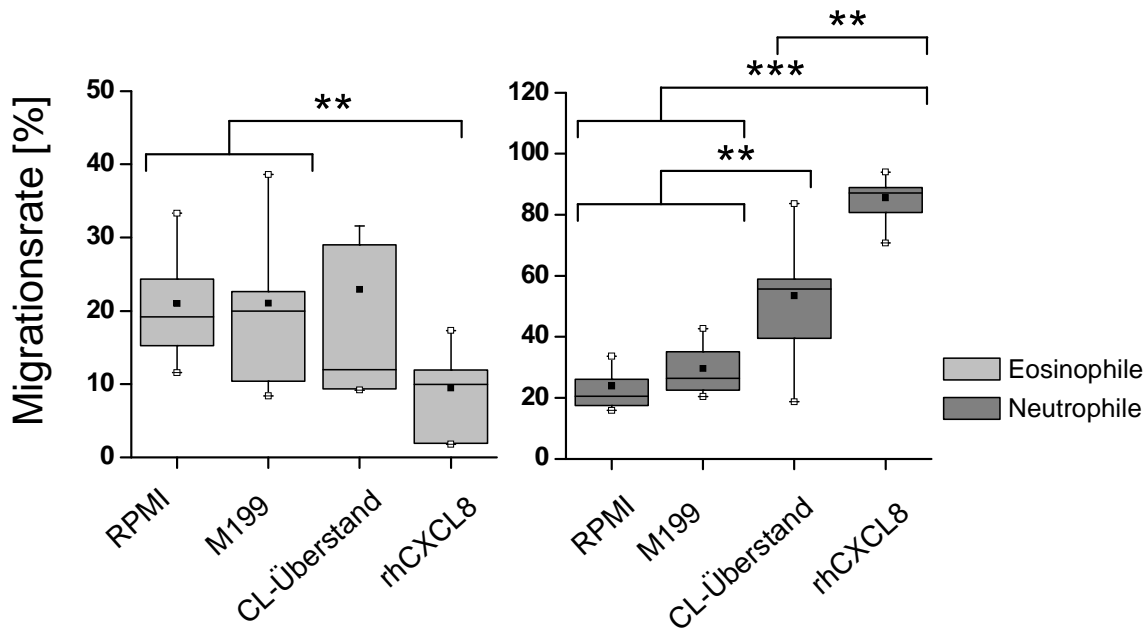
Im Gegensatz dazu wurden bei der Unterteilung der Proben nach der Lokalisation der Gewebeatnahme im CL (Zentrum/ Peripherie) signifikante Unterschiede festgestellt. So lagen im Zentrum die Genexpressionsraten von CCL5, CCL20 und CXCL8 im Mittel signifikant höher als in der Peripherie. Bei TNF- $\alpha$  wurden hingegen signifikant höhere Genexpressionsraten in der Peripherie im Vergleich zum Zentrum festgestellt. Einzig CXCL1 zeigte kaum Unterschiede in der Genexpressionsrate in Bezug auf die Lokalisation im CL.

Nach Unterscheidung der Genexpressionsraten in den CL-Typ und unter Berücksichtigung der CL-Lokalisation wurden in der Peripherie keine signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen CL cyclicum und CL graviditatis festgestellt. Im Zentrum unterschied sich allein die Genexpression von CXCL1 im CL cyclicum vom CL graviditatis signifikant ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.2 Beeinflussung des Migrationsvermögens von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten durch CL Kulturgewebeüberstände**

Durch die qRT-PCR (2.3.6) konnte die Genexpression von Chemokinen nachgewiesen werden, die sowohl für eosinophile Granulozyten (CCL5) als auch für neutrophile Granulozyten (CXCL1, CXCL8) chemotaktisch wirken.

Um auf funktioneller Ebene zu untersuchen, ob eine Sekretion von löslichen, chemoattraktiven Substanzen durch das CL stattfindet, wurden im Folgenden Transmigrationsassays mit CL-Gewebekulturüberständen als chemoattraktive Substanzen durchgeführt (2.3.7.3).



**Abb. 8: Prozentuale Migrationsraten von Eosinophilen und Neutrophilen in Abhängigkeit von unterschiedlichen chemotaktischen Reizen.** Die Ergebnisse wurden als Boxplots dargestellt. Die CL-Überstände (n=8) wurden aus dem CL-Zentrum gewonnen (CL cyclicum: n=4, CL graviditatis: n=4). Für die Transmigrationsassays wurden separierte Granulozyten von insgesamt 5 verschiedenen HF-Rindern an unterschiedlichen Versuchstagen verwendet. (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Von den Eosinophilen wanderten im Mittel 22,9 % der eingesetzten Zellen in Richtung des CL-Überstandes. Überstände von CL-Gewebestücken führten zwar zu leicht höheren Migrationsraten Eosinophiler (Abb. 8), jedoch erwiesen sich diese im Mittel als nicht signifikant gegenüber den Mediumkontrollen (RPMI und M199). Im Vergleich zu den Kontrollmedien wurden signifikant niedrigere Migrationsraten eosinophiler Granulozyten (im Mittel 9,4 %) nach Chemoattraktion durch rhCXCL8 gemessen ( $p < 0,01$ ; Abb. 8).

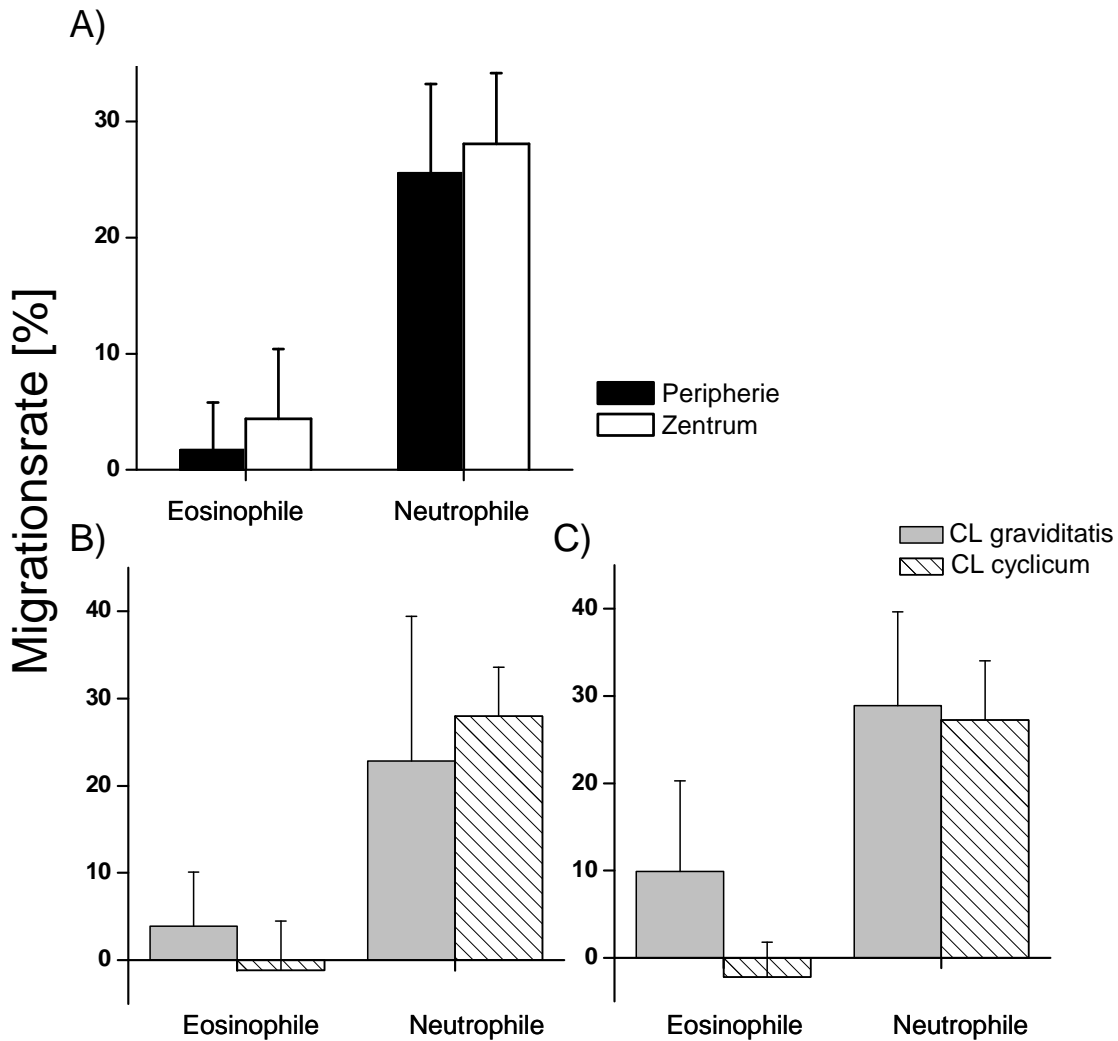
Der Variationskoeffizient der Migrationsraten Eosinophiler lag nach rhCXCL8-induzierter Migration bei 64 % und nach CL-Überstand-induzierter Migration bei 76 %. Deutlich niedriger lagen die Variationskoeffizienten nach RPMI- (32 %) und M199-induzierter Migration (45 %).

Die Kontrollmedien-induzierten Migrationsraten Neutrophiler lagen im Mittel signifikant niedriger (RPMI: 23,9 %;  $p < 0,001$ ; M199: 29,6 %;  $p < 0,001$ ) als die Migrationsraten nach rhCXCL8 induzierter Migration (85,6 %; siehe Abb. 8). Auch die CL-Überstand-induzierten

Migrationsraten waren signifikant niedriger als die rhCXCL8-induzierten ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich zu den Kontrollmedien führten die CL-Überstände zu signifikant höheren Migrationsraten (53,5 %;  $p < 0,01$ ) als die Kontrollmedien (Abb. 8). Die Variationskoeffizienten der CL-Überstand- und Kontrollmedien-induzierten Migrationsraten Neutrophiler (CL-Überstand: 35 %; RPMI: 28 %; M199: 26 %) lagen deutlich höher als nach rhCXCL8-induzierter Migration (8 %).

Sowohl für Eosinophile als auch für Neutrophile ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Migrationsraten, wenn die Assays mit CL-Kulturüberständen aus der CL-Peripherie oder des CL-Zentrums durchgeführt wurden (Abb. 9A).

Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede nach Vergleich der Migrations-induzierenden Potenz von CL-graviditatis- und CL-cyclicum-Kulturüberständen für beide Zellpopulationen nachgewiesen (Abb. 9B, C), gleich ob die Überstände aus CL-Peripherie (Abb. 9B) oder CL-Zentrum-Proben (Abb. 9C) gewonnen wurden.

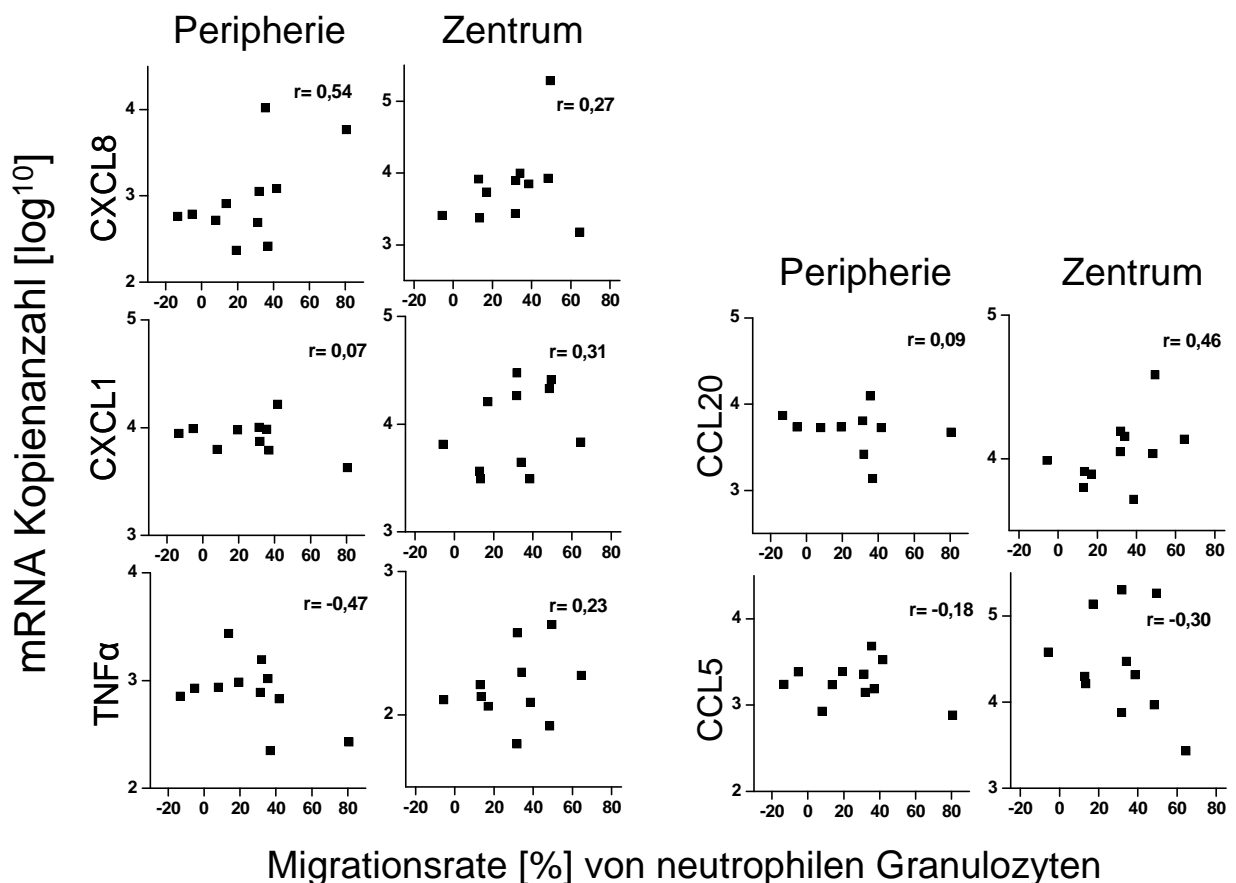


**Abb. 9: Migrationsraten von Eosinophilen und Neutrophilen nach Transmigrationsassays mit CL-Überständen.** A) die von unterschiedlichen CL-Lokalisationen (Peripherie: n=11/ Zentrum: n=12) ohne Berücksichtigung des CL-Typs gewonnen wurden (Mittelwerte + SEM). B) CL-Peripherie getrennt nach CL graviditatis (n=5) und CL cyclicum (n=6), C) CL-Zentrum getrennt nach CL graviditatis (n=6) und CL cyclicum (n=5). Für die Darstellung der spezifischen Migrationsraten wurden die Migrationsraten der Mediumkontrolle (M199) jeweils abgezogen (Der negative Mittelwert der Transmigrationsraten Eosinophiler nach Einsatz von Überständen aus CL cyclicum ergab sich aus z.T. höheren Spontanmigrationsraten in den Kontrollassays mit dem M199).

Insgesamt erwiesen sich die CL-Kulturüberstände als chemoattraktiv für neutrophile Granulozyten, ohne dass sich CL cyclicum und CL graviditatis oder CL-Zentrum und CL-Peripherie hierin unterschieden. Für eosinophile Granulozyten ergaben sich nicht signifikante Hinweise für eine geringere Migration bei Inkubation mit CL cyclicum Gewebekulturüberständen im Vergleich zu CL graviditatis (Abb. 9B, C).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Transmigrationsraten beider Granulozytenpopulationen mit der Chemokin/TNF- $\alpha$  Genexpression korrelieren.

Im Allgemeinen erwiesen sich die Migrationsraten und Genexpression als schwach korreliert ( $r < 0,5$ ). Die CXCL8-Genexpression in der CL-Peripherie war mit den Migrationsraten neutrophiler Granulozyten positiv korreliert ( $r > 0,5$ ; Abb. 10). Die Expression von CXCL1 im CL-Zentrum (ein klassisches Neutrophilen-Chemokin) korrelierte hingegen schwächer mit den Migrationsraten der Zellen ( $r > 0,3$ ; Abb. 10). Keine der Korrelationen erwies sich als signifikant.



**Abb. 10: Korrelationen zwischen der Migrationsrate neutrophiler Granulozyten und der Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  im CL-Zentrum und der CL-Peripherie (je  $n=11$ ).** Die Migrationsraten wurden nach Abzug der entsprechenden Mediumkontrollwerte (M199) ermittelt. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR erfasst. (r: Korrelationskoeffizient nach Pearson).

Die Migrationsraten eosinophiler Granulozyten waren in keinem Fall mit der Chemokin-Genexpression deutlich positiv korreliert. Als auffällig erwies sich die hoch signifikant nega-



tive Korrelation mit der Genexpression von TNF- $\alpha$  in der CL-Peripherie ( $r=-0,76$ ;  $p < 0,01$ ) und die ebenso negativen Korrelationen mit der Genexpression des Eosinophilenchemoattraktiven Chemokins CCL5 (Abb. 11). Bis auf TNF- $\alpha$  in der CL-Peripherie war keine der Korrelationen signifikant.

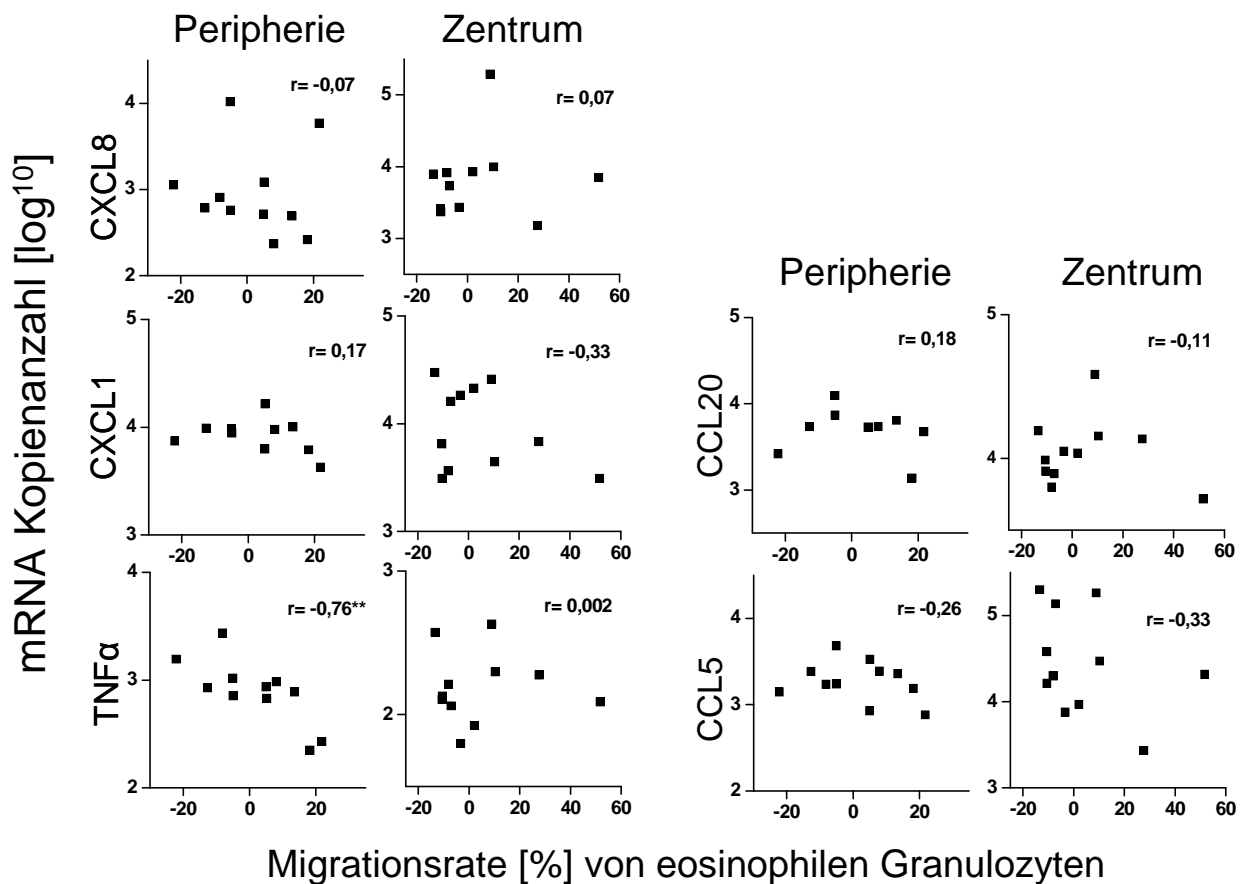


Abb. 11: Korrelation zwischen der Migrationsrate eosinophiler Granulozyten und der Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  im CL-Zentrum und der CL-Peripherie (je  $n=11$ ). Die Migrationsraten wurden nach Abzug der Mediumkontrollwerte (M199) ermittelt. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR erfasst. (r: Korrelationskoeffizient nach Pearson; \*\*,  $p < 0,01$ ).

### 3.1.3 Progesteronkonzentrationen in Kulturüberständen von Corpora lutea-Gewebekulturen

Die Erfassung der P<sub>4</sub>-Sekretion durch Lutealzellen in CL-Gewebekulturen in vitro diente zum Nachweis der Funktionalität. Alle untersuchten CL-Proben ( $n=12$ ) sezernierten P<sub>4</sub>. Allerdings unterlagen die P<sub>4</sub>-Konzentrationen einer starken inter-individuellen Schwankung. So lagen die

Variationskoeffizienten (CV) der Blüte-CL Kulturüberstände, unabhängig vom CL-Typ bei > 50%. Mit einem CV von 90% wurden besonders große Schwankungen der P<sub>4</sub>-Gehalte in CL-graviditatis-Kulturüberständen des CL-Zentrums gemessen (Tab. 7).

**Tab. 7: Progesteronkonzentration [ng/ml] der CL-Gewebekulturüberstände in Abhängigkeit von der CL-Lokalisation.**

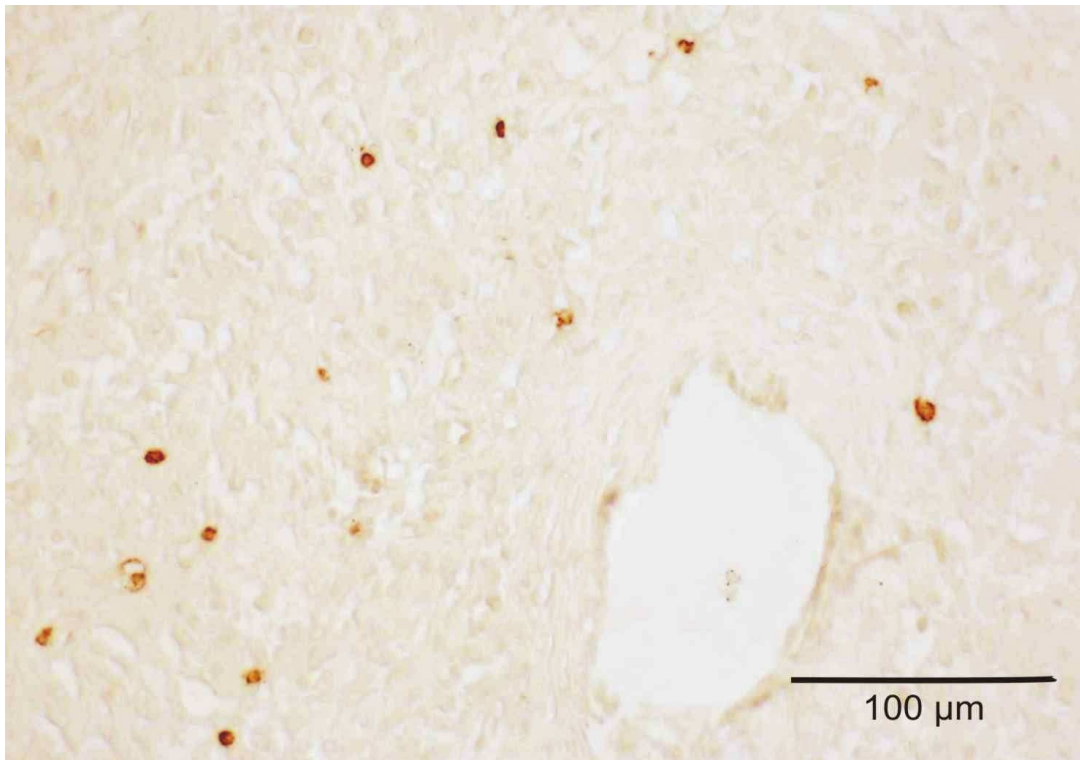
	CL cyclicum		CL graviditatis		gesamt	
	MW ± s	CV	MW ± s	CV	MW ± s	CV
<b>CL-Peripherie</b>	183 ± 98	50 %	117 ± 50	40 %	149 ± 82	60 %
<b>CL-Zentrum</b>	333 ± 196	60 %	245 ± 218	90 %	289 *± 203	70 %

Mittelwerte ± s (Standardabweichung) sowie Variationskoeffizienten (CV) des P<sub>4</sub>-Gehaltes in CL-Gewebekulturüberständen. Gewebefragmente aus dem CL-Zentrum und der CL-Peripherie (Blüte-CL: n=12: 6 CL cyclicum, 6 CL graviditatis) wurden 11 h bis 19 h in M199 kultiviert. (\*, p < 0,05).

Der P<sub>4</sub>-Gehalt in Überständen aus CL-Zentrum-Gewebekulturen lag im Mittel signifikant (p < 0,05) um etwa das Doppelte über den Gehalten von CL-Peripherie-Kulturüberständen. Die P<sub>4</sub>-Gehalte in Überständen von CL-Zentrum-Kulturen von CL cyclica, als auch CL graviditatis waren leicht höher als in Überständen aus der CL-Peripherie, ohne jedoch die Signifikanzschwelle zu überschreiten (Tab. 7).

### 3.1.4 Nachweis von Leukozyten im Corpus luteum

Der Nachweis und die Quantifizierung von Leukozyten im CL erfolgte immunhistochemisch nach Anfärbung aller Leukozyten mit einem CD45-spezifischen Primärantikörper (2.3.8.3; Abb. 12). Ziel war es, eine mögliche Korrelation zwischen der Zahl gewebständiger Leukozyten mit der Genexpression von Chemokinen/TNF-α (3.1.1) zu belegen.



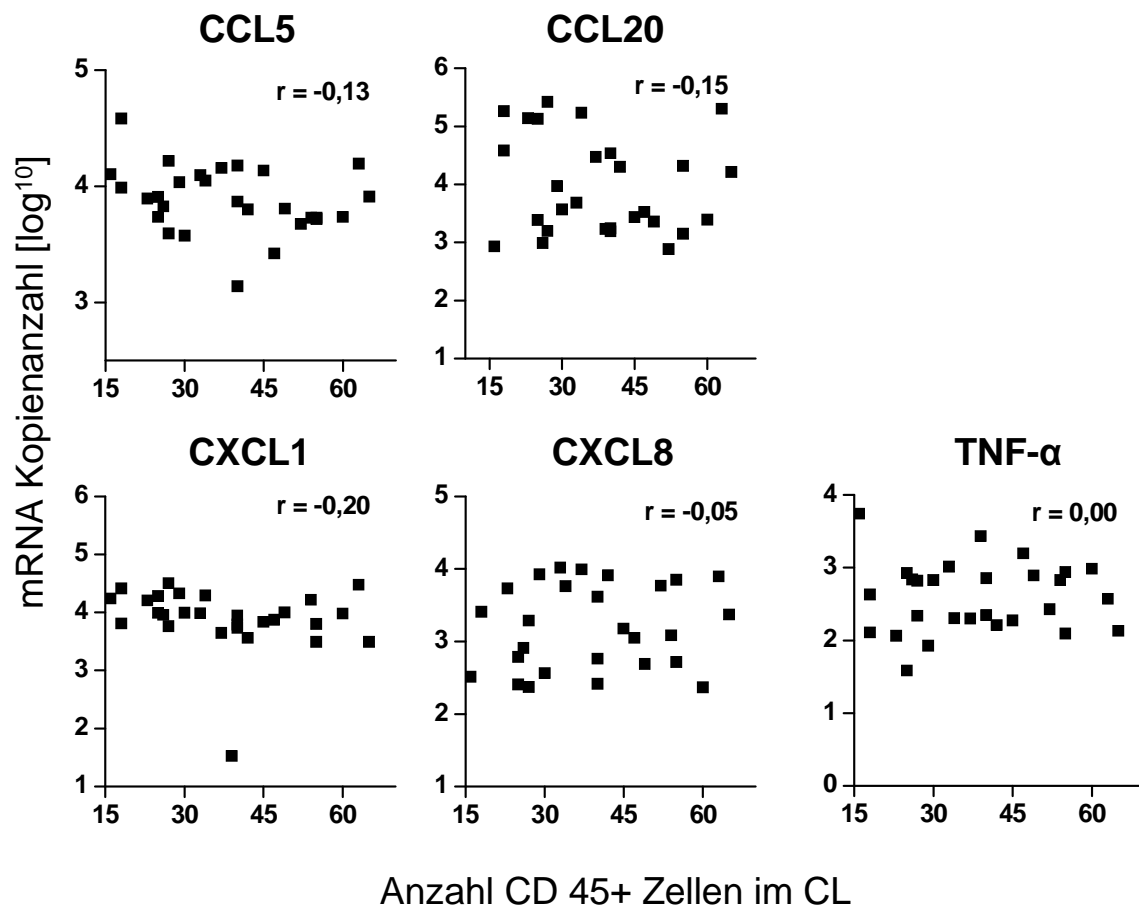
**Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis CD45-positiver Zellen in bovinem Lutealgewebe (DAB-Färbung, 400x Vergrößerung).** Leukozyten stellen sich als hell- bis dunkelbraun dar.

**Tab. 8: Anzahl von Leukozyten [CD45+ Zellen] im CL cyclicum und im CL graviditatis, abhängig vom Ort der Gewebeentnahme.**

CL graviditatis		CL cyclicum		gesamt	
Peripherie	Zentrum	Peripherie	Zentrum	Peripherie	Zentrum
36 ± 6	36 ± 6	42 ± 3,9	38 ± 6	40 ± 3	37 ± 4

CD45-positive Leukozyten wurden in 4 randomisiert ausgewählten Gesichtsfeldern (400x Vergrößerung entsprechen 11,8 mm<sup>2</sup>) mikroskopisch ausgezählt (Mittelwerte ± SEM; 15 CL: 8 Blüte CL, 7 CL graviditatis).

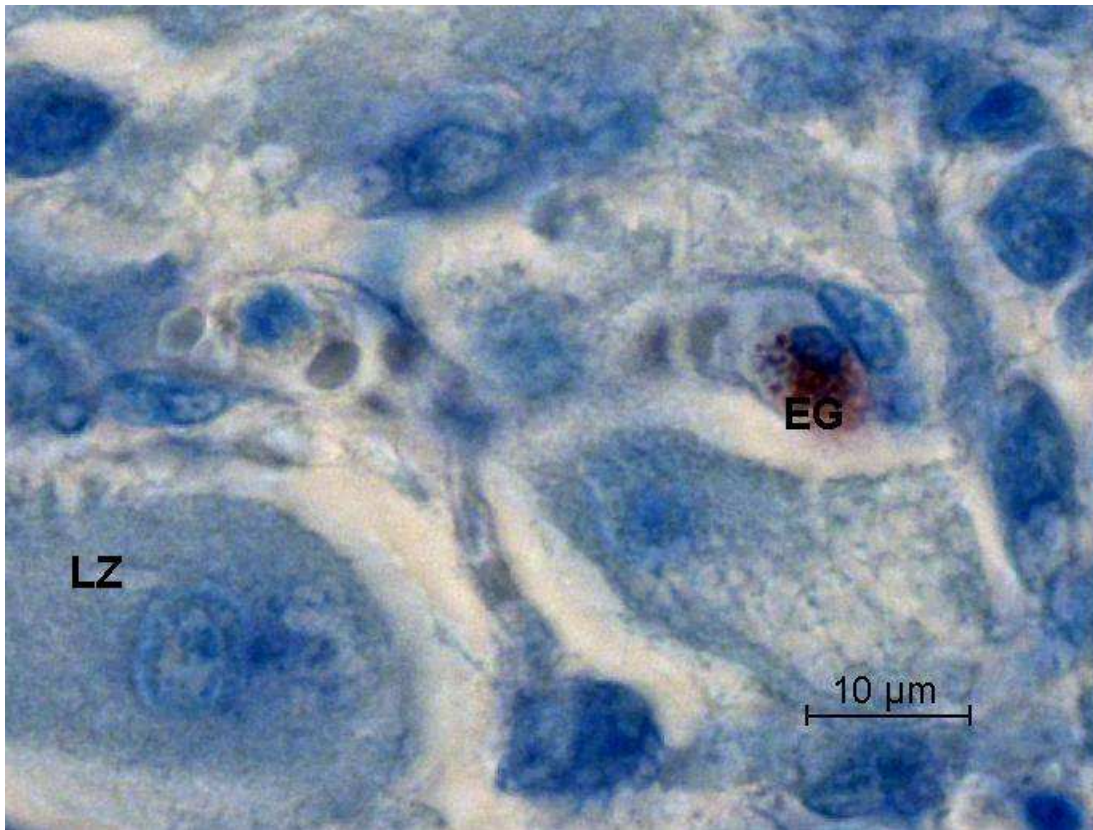
Im Mittel konnten pro 47,2 mm<sup>2</sup> 36 bis 42 Leukozyten gezählt werden (Tab. 8). Signifikante Unterschiede zwischen CL graviditatis und CL cyclica und zwischen CL-Zentrum und CL-Peripherie lagen nicht vor. Aufgrund der geringen Unterschiede in der Leukozytenzahl wurden die Daten des CL-Typ und der CL-Lokalisation gepoolt und geprüft, ob die Genexpression der untersuchten Chemokine und TNF- $\alpha$  mit der Anzahl an Leukozyten korrelieren.



**Abb. 13: Korrelation zwischen der Anzahl von Leukozyten / 47,2 mm<sup>2</sup> und der Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$ .** Die Ergebnisse wurden in Abhängigkeit vom CL-Typ und der CL-Lokalisation zusammengestellt (n=28). Die Genexpression wurde durch qRT-PCR erfasst. (r= Korrelationskoeffizient nach Pearson).

Für alle Chemokine und TNF- $\alpha$  zeigte sich sehr geringe Korrelationen ( $r = -0,2$  bis  $0$ ) zwischen der Zahl exprimierter mRNA-Moleküle und der Anzahl an Leukozyten im CL (Abb. 13). Keiner der Korrelationswerte war signifikant.

Der immunhistochemische Nachweis von CD45-positiven Zellen erfasste alle Leukozyten. Um die Zahl eosinophiler Granulozyten selektiv zu erfassen, wurden CL-Gewebeschnitte einer Pappenheimfärbung unterzogen (Abb. 14).



**Abb. 14: Pappenheimfärbung von Lutealgewebe bei 1000x Vergrößerung (Ölimmersion).** Rotfärbung der zytoplasmatischen Granula eines eosinophilen Granulozyten (EG). Alle weiteren Zellarten werden ausschließlich blau angefärbt. Lutealzelle (LZ) am linken Bildrand.

**Tab. 9: Anzahl von eosinophilen Granulozyten im CL in Abhängigkeit vom Ort der Gewebeentnahme.**

CL graviditatis		CL cyclicum		gesamt	
Peripherie	Zentrum	Peripherie	Zentrum	Peripherie	Zentrum
1 ± 0,4	0 ± 0,2	1 ± 0,7	1 ± 0,6	1 ± 0,4	1 ± 0,4

Mittelwerte ± SEM der Anzahl von eosinophilen Granulozyten von 15 CL (CL cyclicum: n=8; CL graviditatis: n=7). Auszählung von Zellen mit rot gefärbten Granula in 10 Gesichtsfeldern (1000x, Ölimmersion, 30 mm<sup>2</sup>).

Pro 30 mm<sup>2</sup> konnten zwischen 0 und 5 eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden. CL-Peripherie und CL-Zentrum, sowie CL cyclica und CL graviditatis unterschieden sich nicht bezüglich der Zahl Eosinophiler pro Flächeneinheit (Tab. 9)

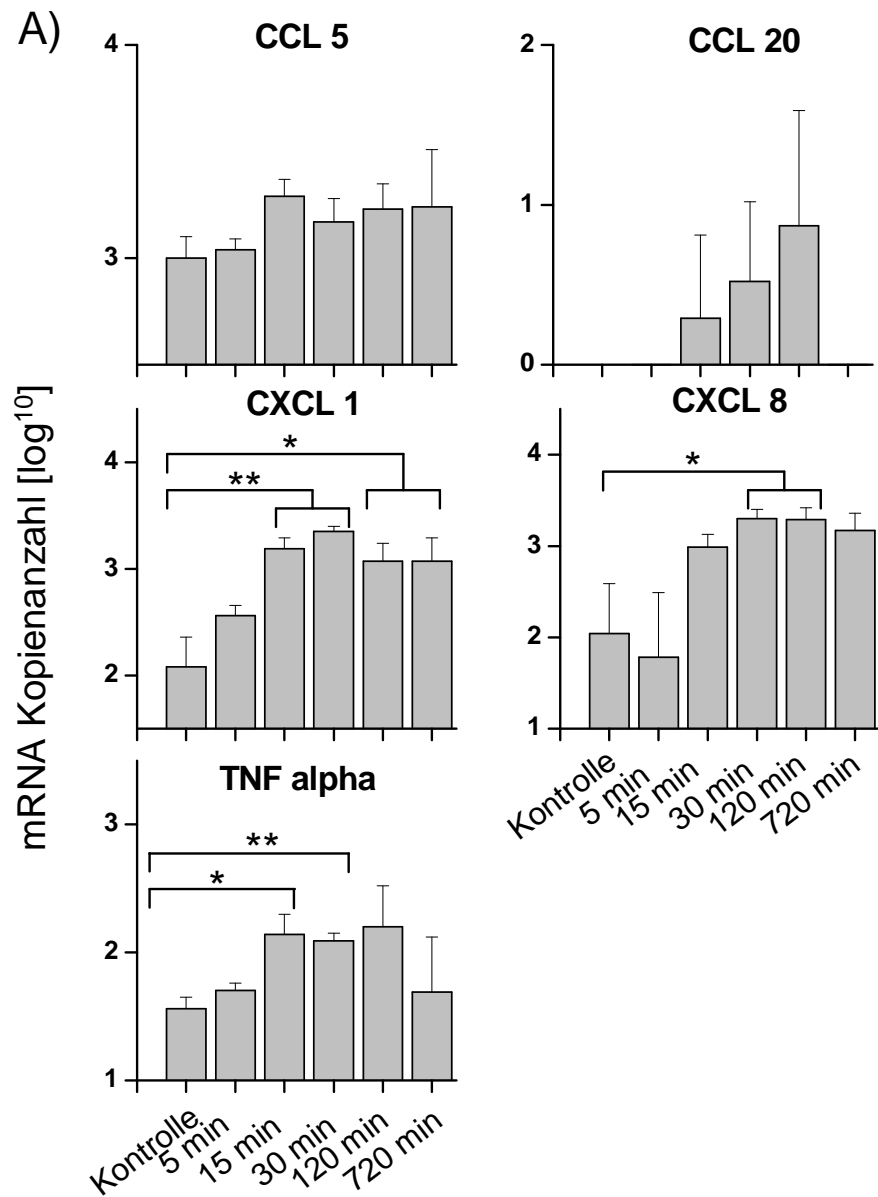
Aufgrund der niedrigen Zahl nachgewiesener eosinophiler Granulozyten wurde auf eine Korrelation mit der Chemokin/TNF- $\alpha$  Genexpression verzichtet.

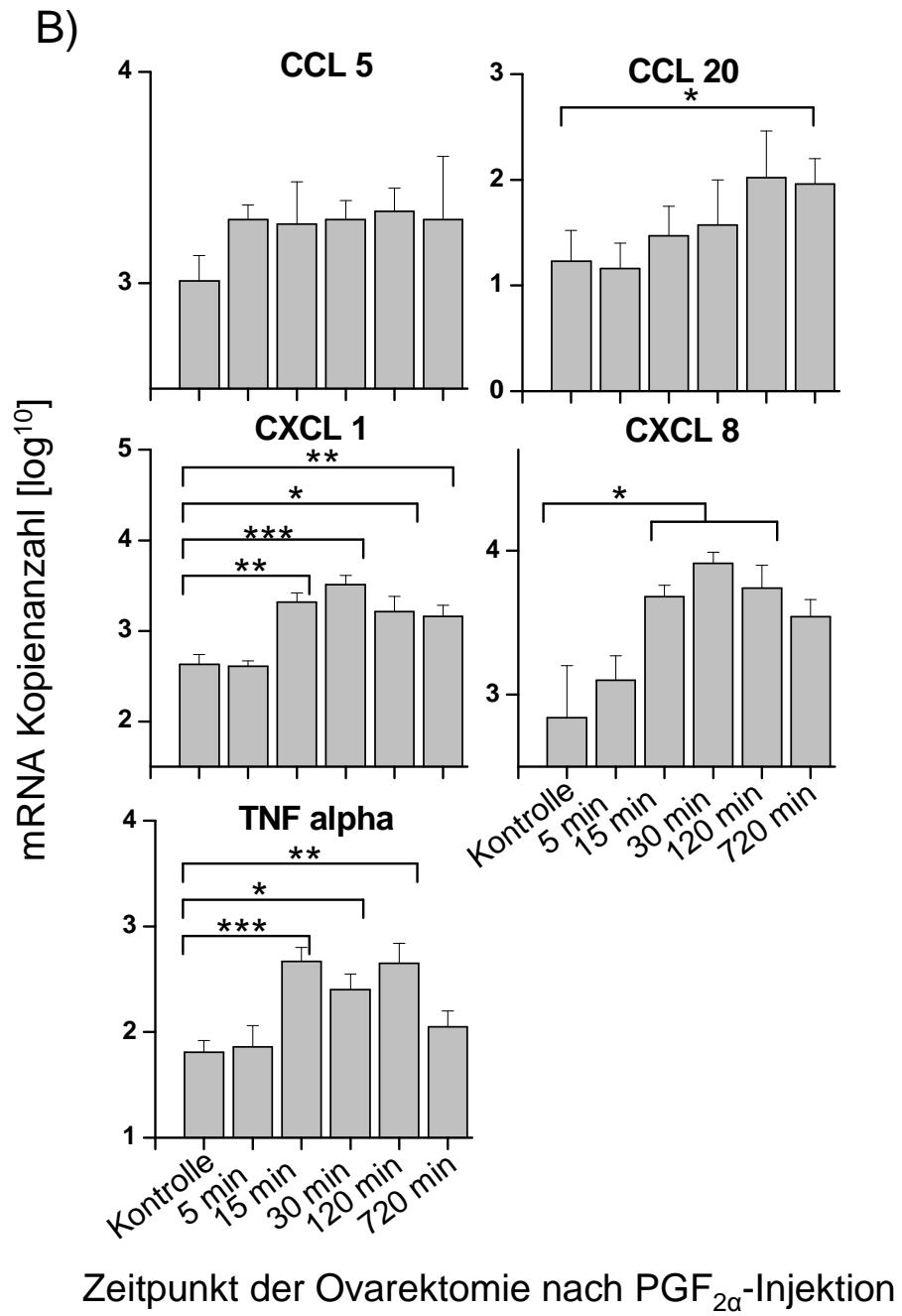
### **3.2 Einfluss einer luteolytisch wirksamen Dosis PGF<sub>2 $\alpha$</sub> auf die Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$ des Corpus luteum in der Blütephase**

In Kapitel 3.1.1 wurde die konstitutive Chemokin/TNF- $\alpha$  Genexpression im CL graviditatis und CL cyclicum nachgewiesen. Im Folgenden wurde untersucht, ob und wie sich dieses Genexpressionsmuster und die luteale P<sub>4</sub>-Sekretion durch die Gabe von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in vivo und in vitro verändert.

#### **3.2.1 Einfluss von PGF<sub>2 $\alpha$</sub> auf die Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$ des Corpus luteum von Tag 10 bis 12 p.ov. in vivo**

In diesem Versuchsabschnitt wurden nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter Luteolyse die CL-tragenden Ovarien zu unterschiedlichen Zeitpunkten operativ entfernt (2.2.4.3), um anschließend die luteale Genexpression ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  zu messen. Begleitend wurde bei allen HF-Färsen die P<sub>4</sub>-Plasmakonzentrationen vor PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion und zu den verschiedenen Zeitpunkten der Ovariectomie bestimmt (2.3.9). Im Folgenden sind die lutealen Genexpressionen (Abb. 15A, B), sowie die P<sub>4</sub>-Plasmakonzentrationen (Abb. 15C) dargestellt.







### C) Unterschiede zwischen der Genexpression von Chemokinen/TNF- $\alpha$ zwischen CL-Zentrum und CL Peripherie.

		Zeitpunkt der Ovariectomie nach PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -Injektion [min]				
Kontrolle		5	15	30	120	720
CCL5						
CCL20	n.a.					p < 0,05
CXCL1						
CXCL8			p < 0,01	p < 0,001		p < 0,05
TNF- $\alpha$						

**Abb. 15: Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  in der Peripherie (A) und im Zentrum (B) von CL an den Tagen 10 bis 12 p.ov. zu unterschiedlichen Zeiten nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation in vivo.** Es wurden je 5 Färsen als Kontrolle (keine PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation) und pro Zeitpunkt nach intramuskulärer PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion ovariectomiert (zum Zeitpunkt 720 min: 4 Färsen). C) Vergleich der Genexpression zwischen CL-Zentrum und CL-Peripherie (n.a.: nicht anwendbar). Die Genexpression wurde durch qRT-PCR (Mittelwerte + SEM) erfasst. (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001).

Sowohl in der CL-Peripherie als auch im CL-Zentrum wurde ein signifikanter Anstieg der Genexpression von CXCL1, CXCL8 und TNF- $\alpha$  erfasst (Abb. 15A, B). Dies erfolgte in der Regel bereits 15 min nach Applikation von PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Die CXCL1-Genexpression erwies sich sowohl im CL-Zentrum als auch in der Peripherie über den gesamten Zeitraum als signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, während sich die Genexpression von CXCL8 und TNF- $\alpha$  nach 120 min oder 720 min nicht mehr signifikant von derjenigen der Kontrollgruppe unterschied (Abb. 15A, B). Für TNF- $\alpha$  zeigte sich eine biphasische Induktion in den CL-Zentren mit Maxima der Genexpression bei 15 min und 120 min nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation.

Die Genexpression von CCL5 wurde durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  weder im CL-Zentrum noch in der Peripherie signifikant beeinflusst. Eine Besonderheit wies das Chemokin CCL20 auf. Es erwies sich als nicht exprimiert in der Peripherie von Kontroll-CL, 5 min und 720 min wohl aber im CL-Zentrum (Abb. 15A, B). Im CL-Zentrum konnte sehr spät nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe (720 min) eine signifikante Genexpressionssteigerung erfasst werden (p < 0,05), während in der CL-Peripherie eine De-novo-Genexpression ab 15 min p.i. zu verzeichnen war.

Während sich die Genexpression in den Kontroll-CL zwischen Zentrum und Peripherie nicht unterschied, ergaben sich wesentlichen Unterschiede zwischen CL-Peripherie und CL-Zentrum für die Genexpression von CXCL8 (Abb. 15C). Bereits 15 min nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation konnte eine signifikant stärkere Genexpression im CL-Zentrum nachgewiesen werden (p < 0,01). Diese Unterschiede waren ebenso 30 min (p < 0,01) und 720 min

( $p < 0,05$ ) nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe signifikant. Eine signifikant stärkere Genexpression wurde bei CCL20 im CL-Zentrum ( $p < 0,05$ ), verglichen mit der CL-Peripherie, 720 min nach der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation beobachtet (Abb. 15C).

Um den zeitlichen Verlauf der funktionellen Luteolyse verfolgen zu können, wurde die  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration vor  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion und zu den verschiedenen Zeitpunkten der Ovarrektomie bei allen 29 HF-Färsen bestimmt (Tab. 10).

**Tab. 10:  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration [ng/ml] von Färsen am Tag 10 p.ov. und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion.**

Wirkungsdauer von $\text{PGF}_{2\alpha}$ [min]	Tag 10 p.ov.	nach $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion
5	$5,26 \pm 0,76$	$5,74 \pm 0,68$
15	$6,54 \pm 0,39$	$6,96 \pm 0,43$
30	$5,79 \pm 0,55$	$4,86 \pm 0,71$
120	$5,24 \pm 0,35$	$4,41 \pm 0,17$
720	$5,79 \pm 0,74$	$1,5^{**} \pm 0,3$
Kontrolle	$5,17 \pm 0,35$	$5,31 \pm 0,28$

Die Blutproben zur Bestimmung der  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration wurden von 5 Kontroll-Färsen (keine  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation) und von 5 Färsen pro Zeitpunkt nach intramuskulärer  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion (zum Zeitpunkt 720 min: 4 Färsen) entnommen (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Dies geschah jeweils kurz vor Entnahme des CL-tragenden Ovars (\*\*,  $p < 0,01$ ).

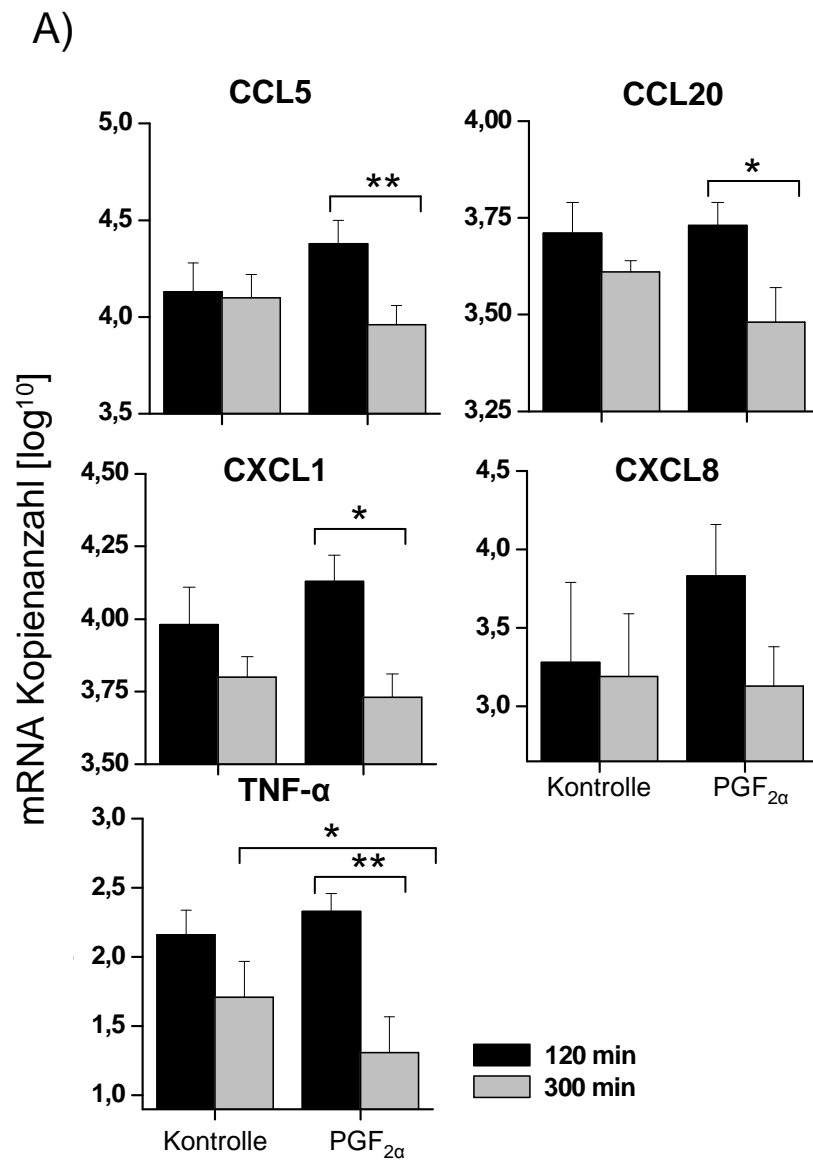
In Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion sank die  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration. Fünf min und 15 min nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion wurden keine Unterschiede der  $\text{P}_4$ -Plasmakonzentration im Vergleich zu den Werten vor der Injektion beobachtet. Bei den Gruppen, welche 30 min und 120 min nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion ovarrektomiert wurden, zeigte sich zum Zeitpunkt der Ovarentnahme bereits eine leicht niedrigere  $\text{P}_4$ -Konzentration als vor  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion. Signifikant niedriger lag die  $\text{P}_4$ -Konzentration 720 min nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion ( $p < 0,01$ ).

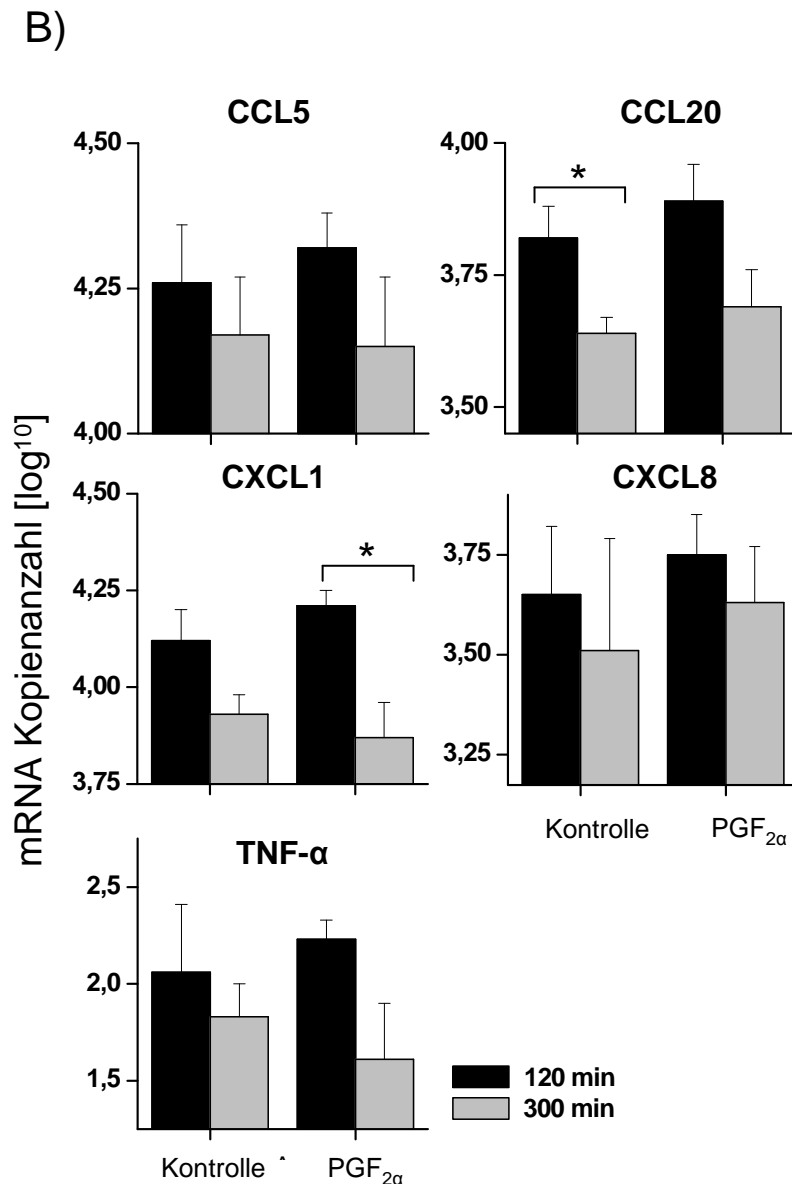
### 3.2.2 Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Genexpression von Chemokinen, $\text{TNF-}\alpha$ und die $\text{P}_4$ -Sekretion des Corpus luteum cyclicum in vitro

Nachdem festgestellt wurde, dass eine  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation in vivo die Genexpression von Chemokinen und  $\text{TNF-}\alpha$  im CL an den Tagen 10 bis 12 p.ov. moduliert, wurde geprüft ob in vitro durch Inkubation von Blüte-CL-Gewebekulturen mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vergleichbare Genexpressionsmodulationen zu verzeichnen sind. Hierfür wurden vom Schlachthof sechs Blüte-CL tragende Ovarien gewonnen, bei denen sich keine Frucht im Uterus befand (CL cyclica). Unter sterilen Bedingungen wurden aus diesen CL cyclica mit einer Stanze Stücke heraus geschnitten, und über einen Zeitraum von 120 min und 300 min mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  oder Kontrollmedium (M199) inkubiert. Anschließend wurden die Genexpressionen der Chemokine und  $\text{TNF-}\alpha$  quantifiziert (Abb. 16A, B).

Die leicht höheren Expressionswerte für die untersuchten Chemokine und  $\text{TNF-}\alpha$  nach Inkubation der Gewebestücke mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  für 120 min waren alle nicht signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle. Dies war ebenso und abhängig davon ob das CL-Zentrum oder die CL-Peripherie analysiert wurde (Abb. 16A, B). Nach 300 min Inkubation mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  war die Genexpression geringfügig niedriger als in den Kontrollansätzen. Signifikant war diese geringere Expression bei  $\text{TNF-}\alpha$  in der CL-Peripherie ( $p < 0,05$ ). Einzig im CL-Zentrum wurde CXCL8 und CCL20 etwas stärker exprimiert als M199 ohne  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Zusatz. Allerdings erwiesen die genannten Unterschiede als nicht signifikant (Abb. 16A, B).

Sowohl nach Inkubation mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , als auch nach alleiniger Inkubation mit M199, wurde bei allen Chemokinen und  $\text{TNF-}\alpha$  eine geringere Expression nach 300 min, im Vergleich zu 120 min Inkubation gemessen. Signifikant war dies bei Inkubation mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in der CL-Peripherie bei allen Chemokinen und  $\text{TNF-}\alpha$  bis auf CXCL8 (CCL5:  $p < 0,01$ ; CCL20:  $p < 0,05$ ; CXCL1:  $p < 0,05$ ;  $\text{TNF-}\alpha$ :  $p < 0,01$ ). Im CL-Zentrum wurde allein bei CXCL1 eine signifikant geringere Expression nach 300 min Inkubation gemessen (Abb. 16B,  $p < 0,05$ ). Auch bei alleiniger Inkubation mit M199 lagen alle Genexpressionen im Mittel nach 300 min Inkubation niedriger. Signifikant war dieser Unterschied allein bei CCL20 in im CL-Zentrum (Abb. 16B,  $p < 0,05$ ).





**Abb. 16: Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  nach Inkubation von CL-cyclica-Gewebe-kulturen mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in vitro (n=6 pro Zeitpunkt).** A) Genexpression in der CL-Peripherie. B) im CL-Zentrum. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR erfasst (Mittelwerte + SEM). Die Gewebe-kulturen wurden 120 min oder 300 min in Anwesenheit von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  [ $10^{-5}$  mol/l] in M199 oder M199 ohne Zusatz eines Stimulus (Kontrolle) inkubiert. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Zwischen der Genexpression aller Chemokine und TNF- $\alpha$  in der CL-Peripherie im Vergleich zum CL-Zentrum wurden nur geringe Unterschiede gemessen. Allein für CCL5 lag die Genexpression im CL-Zentrum signifikant höher als in der CL-Peripherie ( $p < 0,05$ ).

In der Summe zeigte die Inkubation mit PGF<sub>2α</sub> bis auf CXCL8 eine signifikante Reduzierung der Genexpression aller Chemokine und TNF-α in der CL-Peripherie nach 300 min im Vergleich zur Inkubation nach 120 min.

In vivo führte die Applikation von PGF<sub>2α</sub> zu einer signifikanten Senkung des P<sub>4</sub>-Blutplasmagehaltes nach 720 min (Tab. 10). Ob die Gabe von PGF<sub>2α</sub> auch die P<sub>4</sub>-Sekretion der Lutealzellen in der Gewebekultur beeinflusst, wurde im Folgenden untersucht (Tab. 11).

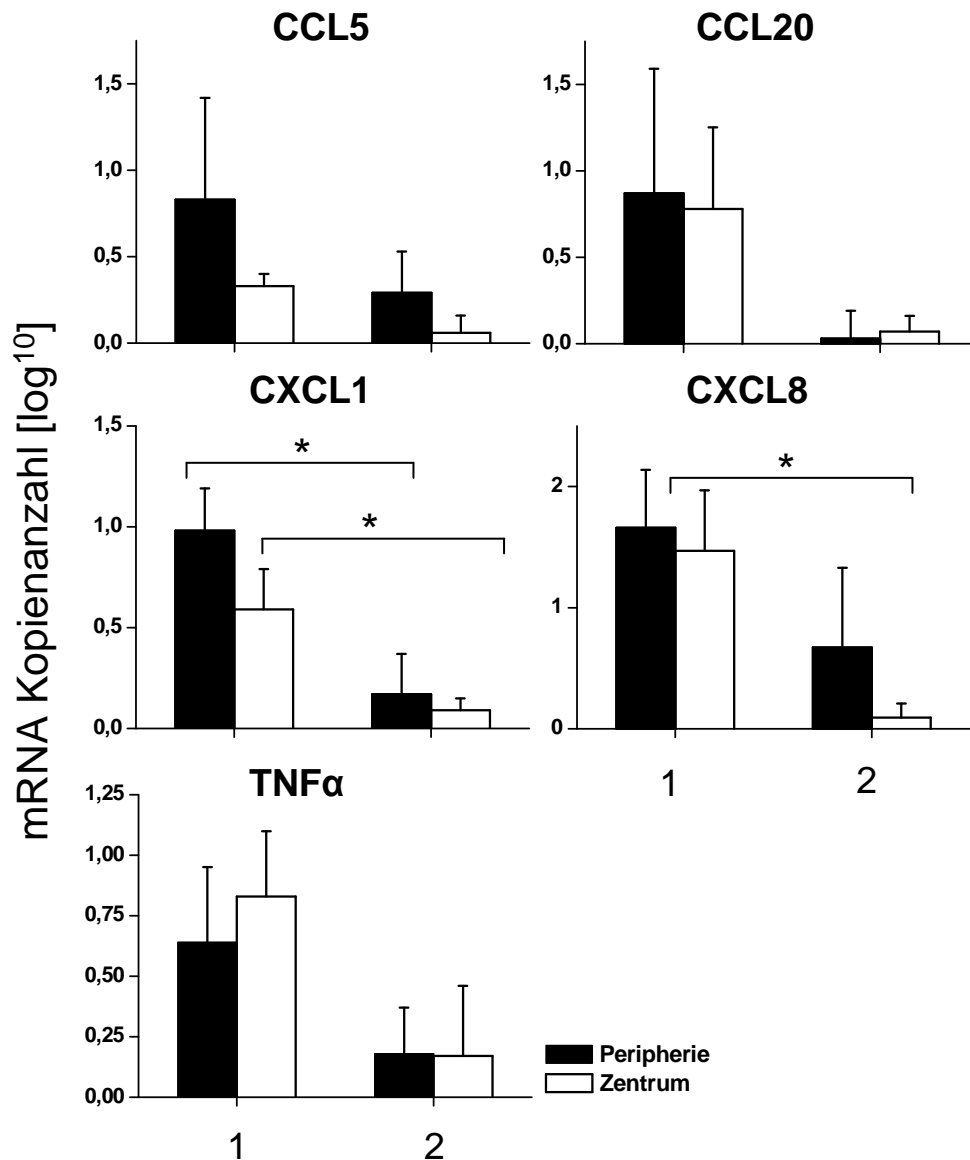
CL-Überstände aus Kulturen, die 300 min inkubiert wurden, enthielten signifikant mehr P<sub>4</sub> (p < 0,01) als Überstände von 120 min inkubierten Kulturen (Tab. 11). Die Inkubation von CL-Gewebekulturen mit PGF<sub>2α</sub> führte sowohl nach 120 min als nach 300 min zu keiner signifikanten Änderung der P<sub>4</sub>-Konzentration im CL-Gewebekulturüberstand. Auch unterschieden sich die P<sub>4</sub>-Gehalte von CL-Zentrum-Überständen geringfügig und nicht signifikant von denen der CL-Peripherie.

**Tab. 11: P<sub>4</sub>-Konzentration [ng/ml] in CL-Gewebekulturüberständen nach Inkubation in M199 (Kontrolle) oder PGF<sub>2α</sub> [10<sup>-5</sup>M], in Abhängigkeit vom Ort der Gewebeentnahme im CL.**

	Inkubationszeit [min]	Kontrolle	CV	PGF <sub>2α</sub> -Applikation	CV
<b>Peripherie</b>	120	172,9 ± 69,6	0,4	171,7 ± 128,6	0,75
	300	298,4** ± 104,2	0,35	342,90** ± 189,8	0,55
<b>Zentrum</b>	120	140,2 ± 73,6	0,52	156,2 ± 56,3	0,36
	300	346,2** ± 85,6	0,25	288,9** ± 110,48	0,38

Zentrale und periphere Bereiche von CL cyclica (jeweils n=6) wurden 120 min oder 300 min mit PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup> mol/l) inkubiert. (Mittelwerte ± SEM). Ansätze ohne PGF<sub>2α</sub> dienten als Kontrolle (\*\*, p < 0,01).

Im Folgenden wurde geprüft, inwiefern sich die Chemokin- und TNF-α Genexpression in den CL cyclica unterscheidet, je nachdem ob PGF<sub>2α</sub> in vivo appliziert wurde oder in vitro zu CL-Gewebekulturen zugesetzt wurde (Abb. 17).



**Abb. 17: Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  in Blüte-CL nach Applikation von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in vivo (1) und in vitro (2).** Verglichen wurde die Expression (Mittelwerte + SEM), die ex vivo 120 min nach intramuskulärer PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation erfasst wurden (1, Blüte CL zyklischer Färsen von den Tagen 10 bis 12 p.ov.; n=5) mit denen, die nach 120 min in vitro Inkubation von CL-Gewebekulturen (2, CL cyclica, n=6) mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  gemessen wurden. Vor der vergleichenden Darstellung wurden die Werte der Kontrollen (1: CL von den Tagen 10 bis 12 p.ov. von nicht mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  behandelten Färsen; 2: nicht mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  inkubierte CL-Gewebekulturen) von den Messwerten subtrahiert. (\*, p < 0,05).

Für alle ausgewählten Chemokine und TNF- $\alpha$  wurden geringfügig höhere mRNA-Kopienzahlen in den ex vivo analysierten CL ermittelt, als in den CL-Gewebekulturen. Dies

galt gleichermaßen für das CL-Zentrum wie auch für die Peripherie (Abb. 17). Signifikant waren die Unterschiede für die beiden Neutrophilen-chemotaktischen Chemokine CXCL1 und CXCL8. Für CXCL1 erwiesen sich sowohl die Werte für das CL-Zentrum, als auch die Werte für die CL-Peripherie im *in-vitro*-Versuch als signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ), während dies bei CXCL8 nur für die CL-Peripherie galt ( $p < 0,05$ ).

Verglich man die Genexpression in Abhängigkeit vom Ort der Gewebeentnahme im CL, so lag sie im *in-vivo*-Versuch bei allen ausgewählten Chemokinen in der CL-Peripherie höher als im CL-Zentrum. Im Gegensatz dazu war die Genexpression von TNF- $\alpha$  im *in-vivo*-Versuch im CL-Zentrum höher als in der CL-Peripherie (Abb. 17), während sich kein Unterschied zwischen diesen Lokalisationen in den *in vitro* kultivierten CL-Gewebekulturen zeigte.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Applikation von PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , sowohl *in vivo* und *in vitro*, zu einer signifikanten Modulation der Genexpression von Chemokinen führt. Zentrale und periphere Bereiche des CL zyklischer Rinder unterscheiden sich vor Allem *in vivo* deutlich und signifikant.

### **3.3 Einfluss von TNF- $\alpha$ auf die Genexpression ausgewählter Chemokine, TNF- $\alpha$ und die P<sub>4</sub>-Sekretion des Corpus luteum cyclicum *in vitro***

Infolge schwerer entzündlicher Prozesse kommt es bei Rindern ohne antibiotische Behandlung zu einem massiven Anstieg der TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration (Hoeben et al., 2000). Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  kann *in vivo* eine vorzeitige Luteolyse auslösen (Skarzynski et al., 2007), *in vitro* senkt es bei separierten Lutealzellkulturen in Kombination mit IFN $\gamma$  die P<sub>4</sub>-Synthese (Benyo und Pate, 1992).

Im Folgenden wurde analysiert, ob TNF- $\alpha$  bei Lutealzellen, welche im Gewebeverband belassen wurden, zu einer Änderung der P<sub>4</sub>- Sekretion führt und ob die Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  selbst beeinflusst wurde.



**Tab. 12: P<sub>4</sub>-Konzentrationen [ng/ml] in CL-cyclica Gewebekulturüberständen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  [100 ng/ml], in Abhängigkeit von der CL-Lokalisation.**

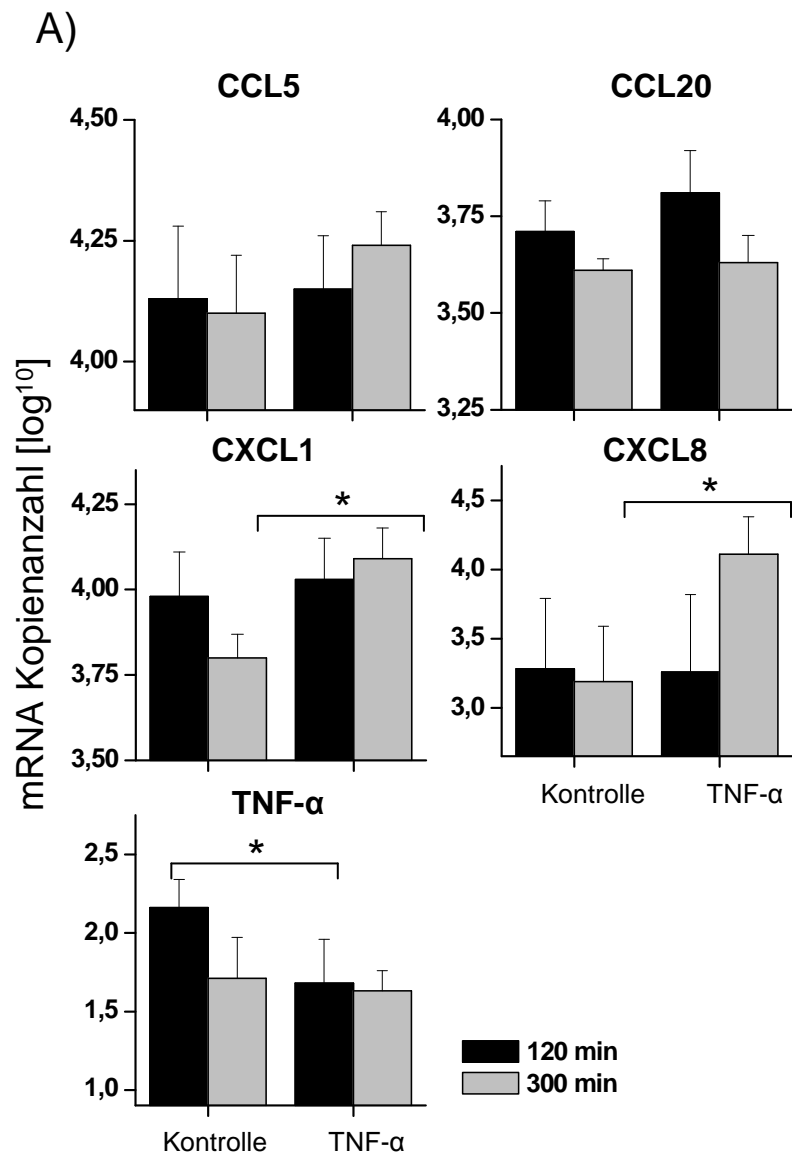
	Inkubationszeit [min]	TNF- $\alpha$ Applikation	Prozentuale Änderung der P <sub>4</sub> -Synthese <sup>a</sup>
<b>Peripherie</b>	120	138,45 $\pm$ 72,86	-19,9
	300	275,65** $\pm$ 121,30	-7,6
<b>Zentrum</b>	120	174,55 $\pm$ 80,33	24,5
	300	317,67* $\pm$ 71,01	-8,2

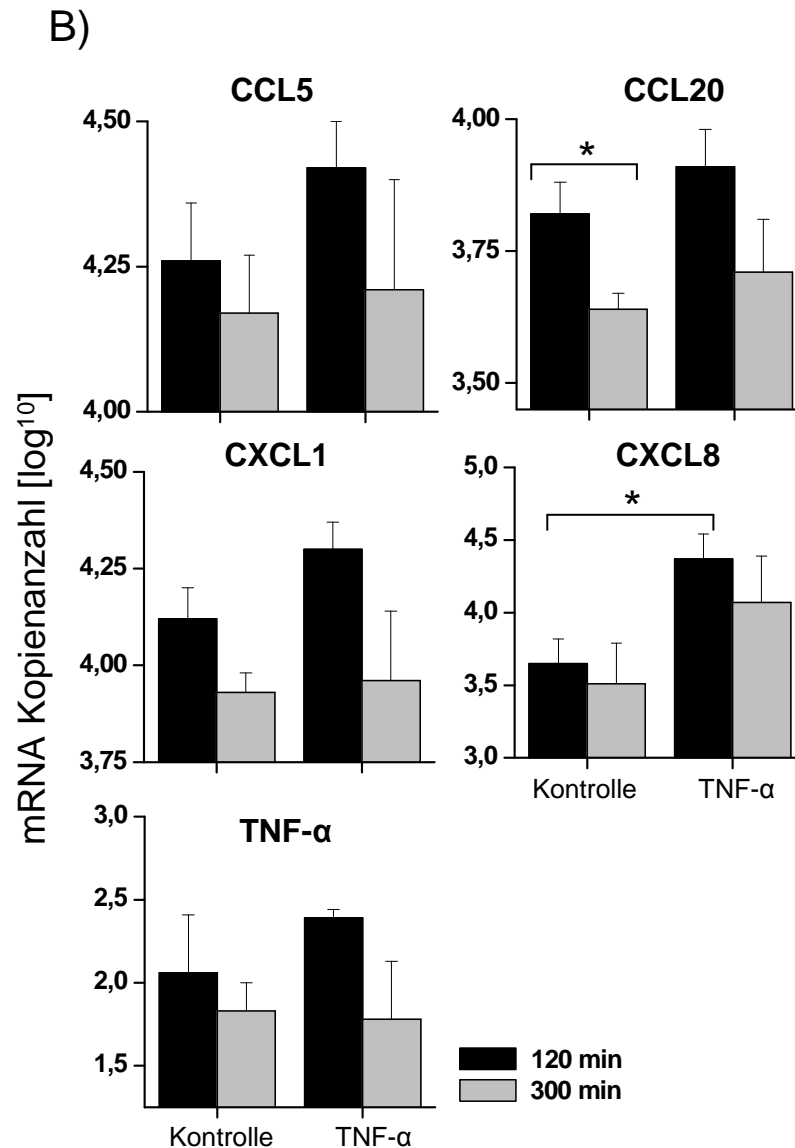
Gewebeproben aus dem Zentrum und der Peripherie von CL cyclica in der Blütephase (n=6) wurden 120 min oder 300 min in vitro kultiviert bevor die P<sub>4</sub>-Gehalte in den Kulturüberständen bestimmt wurden (Mittelwerte  $\pm$  s).<sup>a</sup>: Die prozentuale Änderung der P<sub>4</sub>-Synthese bezieht sich auf Kontrollwerte (alleinige Inkubation mit M199) des PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in vitro Versuches (siehe Tab. 11). Beide Versuche wurden am selben Tag mit identischen CL cyclica in der Blütephase durchgeführt. (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01).

Wurden CL-Proben für 300 min mit TNF- $\alpha$  inkubiert, so reduzierte dies die P<sub>4</sub>-Gehalte in den Überständen um -7,6 % in der Peripherie und -8,2 % im Zentrum (Tab. 12), im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 11). Nach kürzerer Inkubation für 120 min unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  konnte ein unterschiedliches Verhalten zwischen CL-Zentrum- und CL-Peripherie-Proben im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 11) beobachtet werden: in Überständen von CL-Zentrumproben konnte TNF- $\alpha$  vermittelt 24,5 % mehr P<sub>4</sub> nachgewiesen werden, während in CL-Peripherieproben -19,9 % weniger P<sub>4</sub> erfassbar war. Jedoch waren alle Unterschiede der P<sub>4</sub>-Konzentration nicht signifikant (Tab. 12).

Nach 300 min Inkubation mit TNF- $\alpha$  wurden in den Überständen signifikant höhere P<sub>4</sub>-Konzentrationen erfasst als nach 120 min (Peripherie: p < 0,01; Zentrum: p < 0,05; siehe Tab. 12). Jedoch stieg auch nach alleiniger Inkubation der CL-Gewebekulturen mit M199 die P<sub>4</sub>-Konzentration der Gewebekultur in Peripherie und Zentrum signifikant (p < 0,01) an (Tab. 11).

Als nächstes wurde geprüft, ob die Inkubation von Blüte-CL-Gewebekulturen mit TNF- $\alpha$  zu einer Änderung der Genexpression der Chemokine und TNF- $\alpha$  in Peripherie und Zentrum führte (Abb. 18A, B).





**Abb. 18: Genexpression von ausgewählten Chemokinen und TNF- $\alpha$  in CL-cyclica-Gewebekulturen.** Gewebefragmente aus der CL-Peripherie (A) und CL-Zentrums (B) wurden für 120 min und 300 min in Kulturmedium ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von TNF- $\alpha$  [100 ng/ml] inkubiert. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR erfasst (Mittelwerte + SEM, n=6). Die Kontrollen sind mit den Werten des PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -in vitro Versuches identisch (Abb. 16); beide Versuche wurden am selben Tag mit identischen CL-cyclica in der Blütephase durchgeführt. (\*,  $p < 0,05$ )

Nach 120 min Inkubation mit TNF- $\alpha$  kam es in der CL-Peripherie zu einem signifikanten Abfall der TNF- $\alpha$  Genexpression ( $p < 0,05$ ), während sich die Expression der Chemokine kaum von der Kontrolle unterschied (Abb. 18A). Im Gegensatz dazu wurde im CL-Zentrum nach 120 min ein geringfügiger Anstieg der Genexpression aller Chemokine und TNF- $\alpha$  festge-

stellt. Allein für CXCL8 war dieser Anstieg signifikant ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18B).

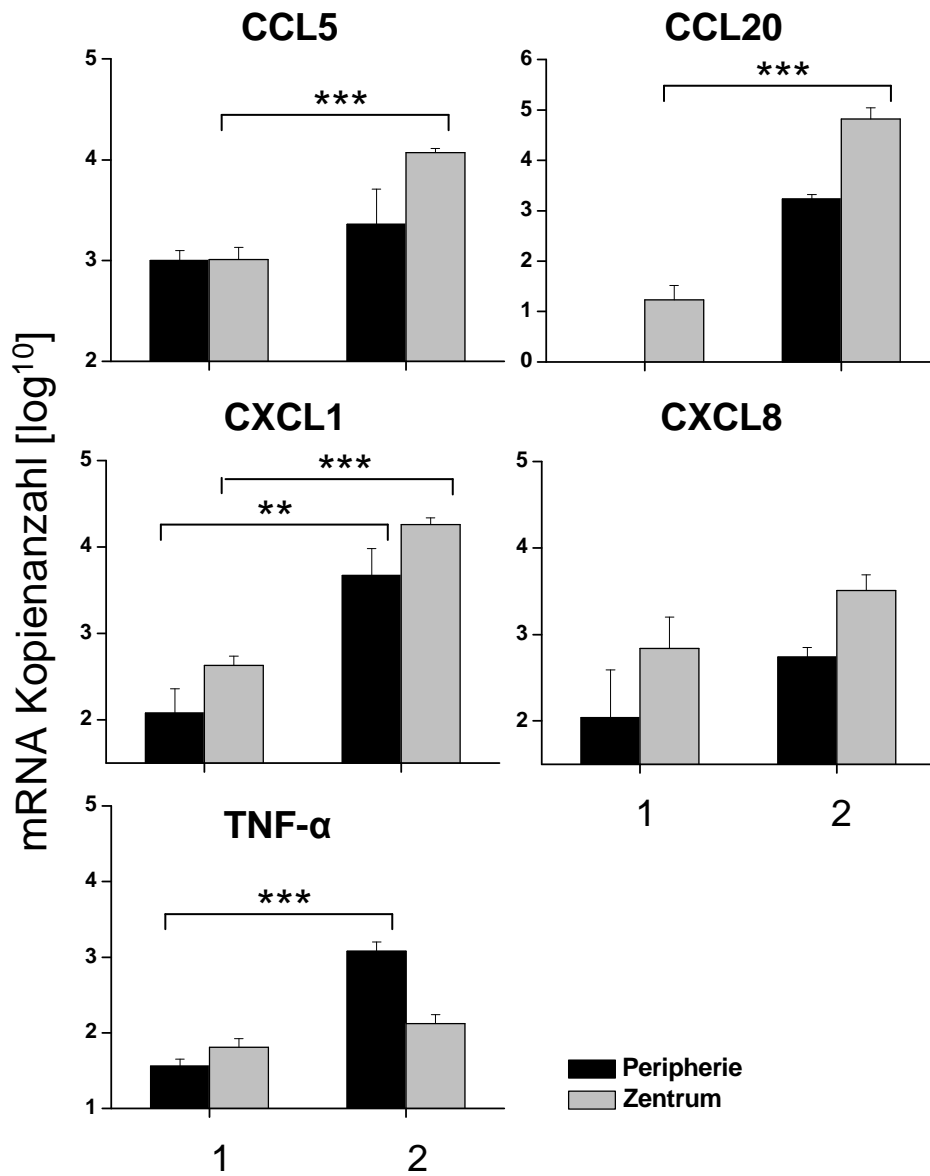
Die Genexpression nach 300 min Inkubation mit TNF- $\alpha$  in der CL-Peripherie stieg allein bei den für Neutrophile attraktiv wirksamen Chemokinen signifikant im Vergleich zur Kontrolle an (Abb. 18A, CXCL1 und CXCL8:  $p < 0,05$ ). Alle weiteren Chemokine und TNF- $\alpha$  zeigten nach 300 min Inkubation mit TNF- $\alpha$  geringe und nicht signifikante Änderungen der Genexpression (Abb. 18A, B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation von CL-Gewebefragmenten mit TNF- $\alpha$  ein signifikanter Anstieg der Neutrophilen-Chemokine CXCL1, CXCL8 und TNF- $\alpha$  induziert wird. Die P<sub>4</sub>-Sekretion der CL-Gewebeulturen blieb nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  unbeeinflusst.

### **3.4 Einfluss unterschiedlicher Methoden der Ovargewinnung auf die luteale Genexpression an den Tagen 10 bis 12 p.ov. und von Corpora lutea cyclica in der Blütephase**

Im Folgenden wurde untersucht, ob CL cyclica während der Blütephase, welche unbekanntem Rindern kurz nach der Schlachtung entnommen wurden, sich in ihrer Genexpression von CL welche an den Tagen 10 bis 12 p.ov. klinisch gesunden Färsen entnommen wurden, unterscheiden (Abb. 19).

Alle Chemokine und TNF- $\alpha$  wurden in CL cyclica unbekannter Herkunft stärker exprimiert als in CL von den Tagen 10 bis 12 p.ov. Signifikant waren die Unterschiede bei allen Chemokinen und TNF- $\alpha$ , bis auf CXCL8. So lagen bei CCL20 und CXCL1 sowohl in der CL-Peripherie als auch im CL-Zentrum die Expressionsraten bei CL cyclica unbekannter Herkunft signifikant höher (CCL20 Zentrum:  $p < 0,001$ ; CXCL1 Peripherie:  $p < 0,01$ ; Zentrum:  $p < 0,001$ ). Sowohl CCL5 im CL-Zentrum als auch TNF- $\alpha$  in der Peripherie waren signifikant stärker exprimiert ( $p < 0,001$ ; siehe Abb. 19).



**Abb. 19: Genexpressionsraten ausgewählter Chemokine und TNF- $\alpha$  von Blüte-CL.** 1) nach Entnahme der CL von Färsen an den Tagen 10 bis 12 p.ov. (n=5) und 2) nach Ovariectomie von frisch geschlachteten Rindern unbekannter Herkunft (CL cyclica: n=8). Die Genexpression wurde durch qRT-PCR ermittelt und als Mittelwerte + SEM dargestellt. (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

## 4 Diskussion

Eine in den letzten Jahrzehnten ständig sinkende Konzeptionsrate des Hochleistungsmilchrindes der Rasse Holstein-Friesian bedeutet eine enorme wirtschaftliche Belastung durch Ausfälle in der Milchproduktion. Eine wesentliche Ursache der ausbleibenden Trächtigkeit ist eine gestörte Ovarfunktion, welche durch Imbalancen in der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen verursacht werden kann. Eines der ersten Zytokine, welches am Beginn einer entzündlichen Reaktion vermehrt produziert wird und über die Blutbahn andere Organe erreicht, ist TNF- $\alpha$ . So steigt die Plasmakonzentration von TNF- $\alpha$  10 h nach einer durch *E. coli* verursachten Mastitis (Hoeben et al., 2000) oder 1,5 h nach einer Infusion mit LPS (Steiger et al., 1999) stark an. Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  hat eine negative Wirkung auf die P<sub>4</sub>-Synthese des CL und kann zu einer vorzeitigen Luteolyse führen (Skarzynski et al., 2007). Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche physiologische Regulation der lutealen P<sub>4</sub>-Synthese und der Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$ , sowie deren Modulation durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und TNF- $\alpha$  geprüft werden.

### 4.1 Möglichkeiten und Auswirkungen einer unterschiedlichen Ovargewinnung auf die Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$ , sowie die Leukozytenanzahl

Die Gewinnung von bovinen Corpora lutea wird in der Literatur durch verschiedene Verfahren beschrieben (Bauer et al., 2001; Neuvians et al., 2004). Der kostengünstigste und schnellste Weg der Probengewinnung ist die Entnahme von CL-tragenden Ovarien kurz nach Tötung unbekannter Rinder auf dem Schlachthof. In den letzten Jahren häufig praktizierte Methode der CL-Gewinnung ist die operative Entnahme des CL-tragenden Ovars bei klinisch gesunden, zyklischen Rindern an einem festgelegten Tag p.ov./p.ö.. Im Folgenden werden die einzelnen Methoden in Hinblick auf die Erstellung von reproduzierbaren Ergebnissen genauer beschrieben. Dabei sind zwei Kriterien bei der Untersuchung von CL für die Güte der Ergebnisse von größerer Relevanz.

Zum Einen ist der Zyklustag des Rindes von besonderer Bedeutung für die Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$ , sowie die Anzahl und Aktivität von Leukozytensubpopulationen im CL. So steigt bereits wenige Stunden nach Induktion der Luteolyse durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  die Genexpression der Chemokine CCL5 und MCP-1 (Kliem et al., 2007), sowie von TNF- $\alpha$  (Kliem et al., 2008; Neuvians et al., 2004) signifikant an. Auch die Phase vor und nach Ovulation ist geprägt von einer erhöhten Expression von Chemokinen, wie CCL5 (Aust et al., 1999).

Bei der Entnahme von CL-tragenden Ovarien auf dem Schlachthof konnte allein aufgrund adspektorischer Merkmale, das CL unterschiedlichen Zyklusstadien zugeordnet werden. Auch wurde bei der operativen CL-Gewinnung häufig keine palpatorische, oder besser ultrasonographische Untersuchung der Ovarien zur Bestimmung des Zyklustages durchgeführt. Der Beginn des Zyklus wurde dann anhand des Brunstverhaltens des Rindes festgelegt (post östrus). Da dieses Brunstverhalten jedoch interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägt ist und zusätzlich von der Frequenz und den Kriterien des Beobachters abhängt, resultiert hieraus eine Zeitspanne von ca. einem Tag, für Feststellung des Zyklusbeginns (Grunert und Berchtold, 1999). Im Gegensatz dazu lässt sich, wie in dieser Arbeit geschehen (2.2.4.3), eine exaktere Definition für den Anfang des Zyklus durch die in kurzen Zeitintervallen durchgeführte ultrasonographische Dokumentierung des dominanten Follikels vor und dessen Abwesenheit nach Ovulation durchführen (post ovulationem). Da die Ovulation 24 bis 36 Stunden nach Brunstbeginn stattfindet (Grunert und Berchtold, 1999), resultiert zwischen diesen beiden Untersuchungsmethoden eine maximale Schwankungsbreite für den Zyklusbeginn von 1,5 Tagen.

Zum Anderen nimmt der Gesundheitsstatus der Spendertiere großen Einfluss auf die physiologische Funktion der Ovarien. So kann sich Stress vor der Schlachtung negativ auf die Ovarfunktion ausüben. Demgemäß führen Faktoren wie der Transport, neue Umgebung und die Zusammenstellung unbekannter Tiere zu einem erhöhter Kortisolspiegel, welcher die LH-Sekretion unterdrücken und in Folge dessen die Ovulation verhindern (Stoebel und Moberg, 1982) kann.

#### **4.1.1 Ovarentnahme im Tiermodell**

Den eingangs beschriebenen Kriterien entspricht am Besten eine operative Entnahme der CL-tragenden Ovarien bei klinisch gesunden Färsen zu einem festgelegten Zeitraum p.ov., wie dies in dieser Studie durchgeführt wurde (2.2.4.3). Da nicht bekannt ist, ob es rassespezifische Unterschiede der Leukozytenpopulation oder der Expression von Zytokinen und Chemokinen des CL gibt, wurden nur Rinder einer Rasse (hauptsächlich HF) ausgewählt (Neuvians et al., 2004; Townson et al., 2002). Zusätzlich wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch die ausschließliche Wahl von HF-Färsen sichergestellt, dass bisher keine Laktation und damit keine Euter-Infektionen stattgefunden hatten.

#### 4.1.2 Ovarentnahme auf dem Schlachthof

Corpora lutea tragende Ovarien, welche kurz nach der Tötung von Rindern im Schlachthof entnommen wurden, konnten nur aufgrund adspektorischer Merkmale einem Zyklusstadium zugeordnet werden (2.2.4.2). Diese Einteilung ist jedoch relativ ungenau, da hier die CL allein anhand der Farbe und Größe eingeteilt werden konnten, welche in der Literatur unterschiedlich definiert wurden (Ireland et al., 1980; Rosiansky-Sultan et al., 2006). Infolge dessen konnten Veränderungen der Chemokin- und Zytokin-Genexpression wie sie zum Zeitpunkt der funktionellen Luteolyse auftreten (Kliem et al., 2008; Neuvians et al., 2004), nicht berücksichtigt werden.

Auch ist der Grund der Schlachtung nicht immer ersichtlich, sodass eine Modulation der Chemokin- und Zytokin-Genexpression, welche in Folge von Mastitiden und Uterusentzündungen auftreten können, unbemerkt bleiben. Diese Beeinflussung der Chemokin- und Zytokinexpression kann sich jedoch negativ auf die Ovarphysiologie auswirken. So beschrieben Hockett et al. (2005) das Ausbleiben der Ovulation bei einer durch *Streptococcus uberis* verursachten Mastitis bei 63% der erkrankten Kühe. Zudem stellten Sheldon und Dobson (2004) eine Unterdrückung der LH-Sekretion und eine daraus folgende verzögerte Ovulation durch eine postpartal entstandene Endometritis fest. Auch ist eine Verkürzung des Zyklus durch Inhibierung der lutealen P<sub>4</sub>-Synthese durch TNF- $\alpha$  möglich (Skarzynski et al., 2007), wenn TNF- $\alpha$  verstärkt in Folge einer Entzündung an den Blutkreislauf abgegeben wird (Hoeben et al., 2000).

Für die Bestimmung der Anzahl von Leukozyten und Eosinophilen wurden CL-tragende Ovarien von Schlachthofrindern unbekannter Herkunft entnommen (Bauer et al., 2001; Reibiger und Spanel-Borowski, 2000; Rohm et al., 2002), bei denen keine Eröffnung des Uterus vorgenommen wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der Untersuchung von Sheldon und Dobson (2004) Rinder mit einer sichtbaren Endometritis nach Eröffnung des Uterus ausgeschlossen. Außerdem wurden infolge der Untersuchung von Lawler et al. (1999) die CL von Kühen, welche ab dem 15 Tag p.c. (2.2.4.3) trächtig waren, in einer getrennten Gruppe untersucht. Aus diesen Gründen ist jedoch ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Untersuchungsergebnisse mit denen aus der Literatur nur bedingt möglich.

#### 4.1.3 Einteilung des Corpus luteum in Peripherie und Zentrum

Bislang beschrieben allein Shirasuna et al. (2008) eine Unterteilung des CL in Peripherie und Zentrum aufgrund von regionalen Unterschieden in der CL-Durchblutung. So stieg nach



PGF<sub>2α</sub>-Injektion die Genexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) in der Peripherie gegenüber dem Zentrum an, was eine erhöhte Durchblutung der Peripherie zur Folge hatte (Shirasuna et al., 2008). Ob sich die von Neuvians et al. (2004) für die Luteolyse beschriebenen, entzündlichen Prozesse im CL möglicherweise aufgrund von regionalen Unterschieden nicht auf das umliegende Gewebe auswirken, wurde bisher nicht untersucht. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit bei der Untersuchung des CL-Gewebes eine Unterscheidung in Peripherie und Zentrum vorgenommen.

## **4.2 Einfluss der Trächtigkeit auf die luteale Leukozytenzahl, die Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$ , sowie die Sekretion von chemoattraktiven Substanzen und P<sub>4</sub>**

Im ersten Abschnitt der hier vorliegenden Ergebnisse (3.1) wurden von einem Schlachthof stammende, sich in der Blütephase befindende CL von 8 zyklischen und 7 trächtigen HF-Rindern untersucht (2.2.4.2). Dabei wurde die Genexpression verschiedener Chemokine und TNF- $\alpha$ , die Sekretion von chemoattraktiven Substanzen und P<sub>4</sub>, sowie die Anzahl von Leukozyten und Eosinophilen bestimmt. Die Ergebnisse liefern aufgrund der nicht möglichen Bestimmung des Zyklustages und des Gesundheitsstatus der Rinder auf dem Schlachthof und einer geringer Probenanzahl nur möglicherweise vorhandene Tendenzen bei der Unterscheidung zwischen CL cyclica und CL graviditatis oder CL-Peripherie und CL-Zentrum. Aus diesem Grunde wurde z.T. eine Messung von viel versprechenden Ergebnissen unter standardisierten Bedingungen im Tiermodell wiederholt (3.2).

### **4.2.1 Vorkommen von Leukozyten im Corpus luteum**

Bei vielen Spezies, so auch beim Rind, migrieren Leukozytensubpopulationen verstärkt während morphologischen Veränderungen, wie der Ovulation (Rohm et al., 2002) und der Luteolyse (Bauer et al., 2001), in das CL ein. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass während der Trächtigkeit, in welcher über einen langen Zeitraum keine Umbauprozesse im CL stattfinden, eine geringe leukozytäre Besiedlung vorliegt. Aus diesem Grunde wurde die Anzahl an CD45-Leukozyten in CL cyclica und der CL graviditatis im Rahmen dieser Arbeit untersucht (3.1.4).

Einen Grund für die Annahme, dass sich in Anwesenheit eines Embryos/ Fetus die Anzahl an lutealen Leukozyten im Vergleich zum Zyklus auswirken könnte bietet Lawler et al. (1999).

So konnten die Autoren bei Stuten eine geringere Anzahl an Eosinophilen zwischen den Tagen 20 bis 50 p.c. im Vergleich zu den Tagen 12 bis 14 p.ov. nachweisen. Auch die Zahl der Lymphozyten und Makrophagen lag zu diesem Zeitpunkt niedriger als während des Zyklus (Lawler et al., 1999). Des Weiteren zählten Duncan et al. (1998) eine geringere Anzahl an Makrophagen im CL von Frauen denen zuvor hCG injiziert wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe.

Ob es beim Rind Unterschiede in der Leukozytenanzahl zwischen CL cyclica und CL graviditatis gibt ist unbekannt. In der hier vorliegenden Arbeit waren die Unterschiede der Anzahl an lutealen CD45-Leukozyten zwischen diesen beiden Gruppen nur geringfügig und nicht signifikant (3.1.4).

Um die Funktionalität der Lutealzellen, sowie eventuell vorhandene Unterschiede zwischen CL cyclica und CL graviditatis oder zwischen Peripherie und Zentrum in den CL-Gewebeulturen in vitro nachzuweisen, wurde die  $P_4$ -Konzentrationen im Überstand gemessen (3.1.3). Dabei wurde eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Sekretion von  $P_4$  in CL-Proben aus dem Zentrum im Vergleich zur Peripherie festgestellt (Tab. 7). Welche Ursache diese regional unterschiedliche Sekretion im Rahmen dieses Versuches hatte, ist unklar und wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Möglicherweise liegt der Anteil an  $P_4$ -sezernierenden Lutealzellen in den zentralen Bereichen des CL höher als in der Peripherie, jedoch gibt es auch hierzu keinen Beleg in der Literatur.

#### **4.2.2 Luteale Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$**

Trotzdem einige Zytokine und Chemokine beim Rind, wie TNF- $\alpha$ , CCL5 und MCP-1 bereits im CL während des Zyklus nachgewiesen und mit der Regulation lutealen  $P_4$ -Synthese in Verbindung gebracht werden (Kliem et al., 2007; Sakumoto und Okuda, 2004; Townson et al., 2002), bleiben eine Reihe von Fragen offen. So richtete sich der Fokus der Untersucher zumeist auf die zyklusabhängig, unterschiedliche Expression oder Sekretion von lutealen Chemokinen und Zytokinen. Weit weniger Studien untersuchten jedoch die Beteiligung von Zytokinen und Chemokinen der  $P_4$ -Synthese während der Trächtigkeit (Cherry et al., 2008). Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit Blüte-CL von zyklischen Rindern mit CL graviditatis verglichen. Des Weiteren wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Chemokinen, wie CXCL1 (Zeineh et al., 2003), CXCL8 (Engel, 2004) und CCL20 (Kawano et al., 2004) im Ovar entdeckt deren Vorkommen und Regulation im bovinen CL noch nicht bekannt ist.

#### 4.2.2.1 Luteale Expression von TNF- $\alpha$ und CCL20

In der hier vorliegenden Arbeit wurde kein Unterschied in der Genexpression von **TNF- $\alpha$**  zwischen CL cyclica und CL graviditatis festgestellt (3.1.1). Auch Cherry et al. (2008) stellten am Tag 60 p.c. keine Veränderung der TNF- $\alpha$ -Konzentration in isolierten lutealen Endothelzellen, im Vergleich zu den Tagen 9 bis 12 p.ov., bei der Kuh fest. Jedoch zeigten Bagavandoss et al. (1990) Änderungen der Stimulierbarkeit der TNF- $\alpha$ -Sekretion von CL graviditatis bei Kaninchen durch LPS in vitro. So führte LPS in CL vom ersten Tag post partum zu einer verstärkten TNF- $\alpha$ -Sekretion im Vergleich zum Tag 5 p.c. (Bagavandoss et al., 1990). In Folge dessen ist eine unterschiedliche Regulation von TNF- $\alpha$  beim Rind während der Trächtigkeit, im Vergleich zur Blütephase des CL, nicht auszuschließen. Möglich wäre jedoch auch eine speziesspezifisch unterschiedliche Regulation der TNF- $\alpha$  Sekretion oder eine Beeinflussung des Versuchsergebnisses durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau. So kann durch die Isolierung der Endothelzellen wie sie Cherry et al. (2008) vornahmten, eine geänderte Funktion der Zellen durch den Verlust von interzellulären Verbindungen zu Lutealzellen und Leukozyten ausgelöst werden. Beschrieben wurde dieses Phänomen durch Korzekwa et al. (2008) am Beispiel der unterschiedlichen Wirkung von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  auf separierte Lutealzellen oder Lutealzellen in Kombination mit Endothel- und Immunzellen. Die Autoren kamen dabei zu dem Schluss, dass für eine Nachahmung der physiologischen Verhältnisse in vitro, die Beibehaltung der lutealen Zellkontakte von ausschlaggebender Bedeutung ist (Korzekwa et al., 2008). Zusätzlich bergen CL-Proben vom Schlachthof das Risiko von Rindern zu stammen, bei welchen eine höhere TNF- $\alpha$  Genexpression bereits, im Rahmen einer funktionelle Luteolyse, durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  eingeleitet wurde. Aus diesen Gründen wurde anschließend im Rahmen dieser Arbeit die luteale Genexpression von TNF- $\alpha$  in CL-Proben gemessen, welche aus einem standardisierten Tierversuch stammten (3.2.1) und mit den Ergebnissen des Versuches mit CL cyclica vom Schlachthof (3.1.1) verglichen (3.4).

Auch das Chemokin **CCL20** wurde im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen sowohl in CL graviditatis als auch in CL cyclica exprimiert (Abb. 6). Da dies der erste Nachweis für das Vorkommen von CCL20 im bovinen Ovar ist, können die Ergebnisse kaum mit anderen Untersuchungen verglichen werden. Allein Kawano et al. (2004) dokumentierten eine durch die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 stimulierbare Expression von CCL20 in humanen Granulosazell-Kulturen. Auch wiesen die Autoren CCL20 kurz vor der Ovulation in der Flüssigkeit dominanter Follikel nach. Bei der Kuh wird eine Beteiligung von CCL20 an Entzündungsreaktionen, wie sie während einer Mastitis vorkommen vermutet (Meyer, 2008). Da möglicherweise die Ovulation (Espey, 1980) und die Luteolyse (Neuvians et al., 2004) weitere Entzündungsprozesse induzieren, könnte CCL20 vermehrt zu diesen

Zeitpunkten exprimiert werden. Aus diesem Grunde wurde aufbauend auf diese Ergebnisse die Expression von CCL20 nach PGF<sub>2α</sub>-induzierter Luteolyse untersucht (3.2.1). Um einen eventuell vorhandenen Einfluss der Bedingungen während der Probennahme (2.2.4.2) zu untersuchen, wurde zusätzlich die Expression von CCL20 in CL cyclica mit standardisierten CL-Proben von den Tagen 10 bis 12 p.ov. verglichen (3.4).

Interessanterweise war nach Unterteilung der CL-Proben anhand der Lokalisation, sowohl die Expression von TNF- $\alpha$ , als auch die von CCL20 signifikant unterschiedlich (Abb. 7A). So lag die Expression von TNF- $\alpha$  in der Peripherie signifikant höher ( $p < 0,001$ ), im Vergleich zum Zentrum. Für die Expression von CCL20 konnte das Gegenteil beobachtet werden. Hier war die Expression im Zentrum signifikant höher ( $p < 0,001$ ), als in der Peripherie. Ob diese gegensätzlichen Ergebnisse mit einer unterschiedlichen Durchblutung assoziiert sind, wie dies von Shirasuna et al. (2008) für die Peripherie nach PGF<sub>2α</sub>-induzierter Luteolyse beschrieben wurden, ist unklar. Da beide Substanzen vorrangig bei Entzündungsprozessen sezerniert werden, wäre auch eine lokal unterschiedliche Modulation der Entzündung im CL vorstellbar. So bemerkten bereits Neuvians et al. (2004), dass bei dem von ihnen vermuteten, entzündungsähnlichem Prozess während der Luteolyse das umliegende Gewebe nicht beeinflusst wird. So könnten die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten, regional unterschiedlichen Expressionen von TNF- $\alpha$  und CCL20, mit der Modulation von entzündungsähnlichen Prozessen im CL assoziiert sein. Aus diesem Grunde wurde in der hier vorliegenden Studie zusätzlich die Expression der beiden Substanzen während der PGF<sub>2α</sub>-induzierter Luteolyse, getrennt nach der Lokalisation untersucht (Abb. 15).

#### **4.2.2.2 Luteale Expression von CXCL1 und CXCL8 und Nachweis der Sekretion von löslichen, für Neutrophile chemoattraktiven Substanzen**

In dieser Arbeit wurde erstmals die Genexpression der Chemokine CXCL1 und CXCL8 im bovinen CL cyclicum und CL graviditatis nachgewiesen. In der Literatur wurde im Gegensatz dazu CXCL1 und CXCL8 nur während des Zyklus (Assou et al., 2006) und zusätzlich CXCL1 im Rahmen pathologischer Veränderungen des Ovars (Lee et al., 2006) beschrieben. Bei allen CL-Proben konnte (bis auf CXCL8 bei einem CL cyclicum) die Expression der Chemokine nachgewiesen werden. Die erhobenen Ergebnisse ließen allerdings keine signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen CL graviditatis und CL cyclicum erkennen (Abb. 6).

Die Unterteilung der Proben nach Lokalisation im CL lieferte für CXCL1 und CXCL8 gegensätzliche Ergebnisse. So lag die Expression von CXCL8 im CL-Zentrum signifikant höher

( $p < 0,001$ ), als in der Peripherie (Abb. 7A). Wurden dagegen die CL-Proben nach Lokalisation und CL-Typ unterschieden, lag im Vergleich zu Peripherie die Expression von CXCL1 im Zentrum von CL cyclica signifikant ( $p < 0,05$ ) höher (Abb. 7C). Sowohl CXCL1 (Lee et al., 2006) als auch CXCL8 (Koch et al., 1992) werden mit der Angiogenese in Verbindung gebracht. Ob ihre unterschiedliche Expression jedoch mit einer regional sich ändernden Durchblutung des CL assoziiert ist, wie sie Shirasuna et al. (2008) nach Auslösung der Luteolyse durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  beschrieben, kann nur vermutet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine zusätzliche Messung dieser Chemokine nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierter Luteolyse durchgeführt (3.2.1).

Über die Gründe einer Expression Neutrophilen-chemoattraktiver Substanzen im bovinen CL können nur Vermutungen angestellt werden, da es zurzeit keine Belege für luteale Neutrophile im bovinen CL gibt. Im Gegensatz dazu wurden Neutrophile während des gesamten Zyklus und verstärkt zum Zeitpunkt der Luteolyse bei der Stute (Al-Zi'abi et al., 2003) und der Ratte (Brannstrom et al., 1994) dokumentiert. Möglich wäre es daher, dass allein aufgrund einer im Vergleich zu anderen Leukozytensubpopulationen aufwendigeren Nachweismethode von Neutrophilen im CL, bislang kein Beweis ihres Vorkommens (Brannstrom et al., 1994) beim Rind erbracht wurde. Andererseits wirken beide Chemokine nicht nur auf Neutrophile sondern z.T. auch auf T-Lymphozyten chemoattraktiv, welche bereits im bovinen CL nachgewiesen wurden (Townson et al., 2002). Aus diesem Grunde fand im Rahmen dieser Studie zusätzlich zur Bestimmung der Genexpression von CXCL1 und CXCL8 auch eine Überprüfung der Sekretion von löslichen, chemoattraktiven Substanzen durch das CL im Transmigrationssassay mit CL-Gewebekulturüberständen auf funktioneller Ebene statt (3.1.2).

Im Ergebnis lagen die Migrationsraten Neutrophiler nach Inkubation mit CL-Überständen signifikant höher (53,5 %;  $p < 0,01$ ) als die Kontrollmedien RPMI und M199 (Abb. 8). Zusätzlich belegte eine, im Vergleich zum CL-Überstand, signifikant höhere Migrationsrate von rhCXCL8 (85,6 %;  $p < 0,01$ ) die funktionelle Aktivität von Neutrophilen im Transmigrationssassay (Abb. 8). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass Neutrophile auch in vivo in das CL angelockt werden könnten.

Interessanterweise lag der Variationskoeffizient der CL-Überstände mit 35 % höher als bei den durch Kontrollmedien-induzierten Migrationsraten Neutrophiler (RPMI: 28 %; M199: 26 %) und deutlich höher als nach rhCXCL8-induzierter Migration (8 %). Dies lässt die Annahme zu, dass beim Rind ähnlich wie bei der Stute (Al-Zi'abi et al., 2002) und der Ratte (Brannstrom et al., 1994), eine zum Zeitpunkt der Luteolyse verstärkte Besiedlung des CL durch Neutrophile vorliegt. So könnte der hohe Variationskoeffizient der CL-Überstände

durch die begrenzten Möglichkeiten der CL-Entnahme auf dem Schlachthof, welche u.a. keine Bestimmung des Zyklustages zulässt, verursacht sein. Im Folgenden wurde daher ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Luteolyse und der Expression von CXCL1 und CXCL8 untersucht (3.2.1).

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der Expressionsraten und des Transmigrationsassays nur erste Hinweise auf eine Besiedlung des bovinen CL durch Neutrophile. Zwingend notwendig wäre in einem nächsten Schritt der direkte Nachweis von Neutrophilen im bovinen CL, welche unter standardisierten Bedingungen eines Tiermodells (2.2.4.3) entnommen werden könnten.

#### **4.2.2.3 Luteale Expression von CCL5, Nachweis der Sekretion von löslichen, für Eosinophile chemoattraktiven Substanzen und der Anzahl von Eosinophilen im CL**

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Eosinophile im CL cyclicum und im erstmals CL graviditatis beim Rind, in geringer Anzahl und ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, nachgewiesen (3.1.4). Korrespondierend dazu wurden beim Rind allein im dominanten Follikel und im CL kurz nach Ovulation eine größere Anzahl an Eosinophilen im Vergleich zur Blüte- und Regressionsphase gezählt (Reibiger und Spanel-Borowski, 2000; Rohm et al., 2002). Angelockt werden Eosinophile u.a. durch das Chemokin CCL5, welches beim Rind während der Ovulation (Aust et al., 1999) und zum Zeitpunkt der nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Luteolyse (Kliem et al., 2007) verstärkt exprimiert wird. Weshalb trotz geringer Anzahl an Eosinophilen während der Regression (Reibiger und Spanel-Borowski, 2000) die Expression von CCL5 bei der Untersuchung von Kliem et al. (2007) anstieg, ist unklar. Jedoch könnte allein die Injektion von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , wie sie Kliem et al. (2007) im Rahmen ihres Versuches durchführten, einen Anstieg der CCL5-Expression verursachen. So zeigen Lawler et al (1999), dass bei der Stute nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierter Luteolyse eine wesentlich stärkerer Anstieg von Eosinophilen im CL folgte, als während der natürlichen Luteolyse. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CCL5 in CL cyclica, CL graviditatis (3.1.1) und nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierter Luteolyse (3.2.1) bestimmt. Korrespondierend zu den geringen, nicht signifikant unterschiedlichen Zahlen an Eosinophilen, wurden auch keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CCL5 zwischen CL cyclica und CL graviditatis festgestellt (Abb. 6). Im Gegensatz dazu wiesen Lawler et al (1999) eine geringere Anzahl an Eosinophilen während der Frühträchtigkeit im Vergleich zu den Tagen 12 bis 14 p.ov. nach. Wie bereits unter 4.2.2.1 und 4.2.2.2 beschrieben, sollte auch hier eine wiederholte Probennahme mit größerer Anzahl und unter standardisierten Bedingungen erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die funktionelle Überprüfung der Sekretion von löslichen, für Eosinophile chemoattraktive Substanzen im Transmigrationsassay mit CL-Gewebekulturüberständen (3.1.2). Im Mittel lag die Migrationsrate von Eosinophilen zwar über denen der Kontrollmedien (Abb. 8), jedoch waren die Werte nicht signifikant. So kann eine Freisetzung löslicher, chemotaktisch auf Eosinophile wirkender Substanzen vom CL Gewebepellet nach Inkubation mit M199 nur vermutet werden. Nach Unterteilung der Proben nach Lokalisation und CL-Typ, lag die Migrationsrate der CL graviditatis in Peripherie und Zentrum zwar höher, jedoch waren auch diese Unterschiede nicht signifikant (Abb. 9). Interessanterweise hemmte rhCXCL8 die Migration Eosinophiler signifikant ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu beiden Kontrollmedien (Abb. 8). Möglich wäre in diesem Zusammenhang eine gegenseitige Regulation durch CXCL8, welche die Migration von Eosinophilen in das CL zum Zeitpunkt der Einwanderung von Neutrophilen unterdrückt. Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Regulation zeigte die Studie von Brannstrom et al. (1994). Hierbei wiesen die Autoren Neutrophile in großer Anzahl während der Trächtigkeit und der Pseudo-Trächtigkeit der Ratte nach, jedoch wurden Eosinophile zu diesem Zeitpunkt in nur sehr geringer Zahl gefunden. Folgerichtig wären eine Untersuchung der Expression von CCL5, CXCL1 und CXCL8, sowie der quantitative Nachweis von Eosinophilen und Neutrophilen zum Zeitpunkt der Ovulation und während der Anbildungsphase des CL sinnvoll.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit die Migrationsraten eosinophiler Granulozyten mit den Expressionsraten von Chemokinen und TNF- $\alpha$  korreliert (Abb. 11). Hierbei zeigte sich eine signifikant negative Korrelation mit der Genexpression von TNF- $\alpha$  in der CL-Peripherie ( $r = -0,74$ ). Im Zentrum wurde im Gegensatz dazu keine Korrelation festgestellt. Dieses Ergebnis lässt eine Regulation der Migration von Eosinophilen durch TNF- $\alpha$  im bovinen CL vermuten. So könnte es während der Luteolyse zu einer verringerten Migration von Eosinophilen in das CL, aufgrund der hohe Expression von TNF- $\alpha$  zu diesem Zeitpunkt kommen (Neuvians et al., 2004).

### **4.3 Beeinflussung der lutealen Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$ durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>**

Nachdem in den vom Schlachthof stammenden CL-Proben die Expression von CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL8 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen wurde (3.1), wurde im Folgenden der Einfluss von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  auf die Expression dieser Substanzen in vivo und in vitro untersucht. Für beide Möglichkeiten gibt es eine Reihe von Rahmenbedingungen, welche das Ergebnis der

jeweiligen Untersuchung beeinflussen können. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden, sowie die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit diskutiert.

#### **4.3.1.1 Beeinflussung der lutealen Chemokin- und TNF- $\alpha$ Genexpression durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub> in vivo**

Bei Untersuchungen am lebenden Tier ist die strenge Einhaltung einer Reihe von Bedingungen wie sie unter 4.1.1 beschrieben wurden, unerlässlich. Zusätzlich ist es von größter Wichtigkeit adäquate Kontrollen durchzuführen, um die erlangten Untersuchungsergebnisse interpretieren zu können. So wurde in der hier vorliegenden Arbeit allein die intramuskuläre PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion bei den Kontrolltieren, ähnlich der Studie von Neuvians et al. (2004), weggelassen. Alle anderen Bedingungen blieben identisch. Im Gegensatz dazu wählten Kliem et al. (2008) für ihre Kontrolle CL von Schlachtrindern unbekannter Herkunft. Dieser Umstand erschwert die Interpretation der von den Autoren erhobenen Ergebnisse, da im Rahmen dieser Arbeit signifikant höhere Genexpressionswerte von Schlachthof-CL im Vergleich zur Entnahme unter standardisierten Bedingungen unter 3.4 beschrieben werden.

Beide Autoren machten in ihren Studien keine Angaben über den Laktationsstatus der von ihnen gewählten Kühe, sodass eine Beeinflussung der Ovarfunktion durch eine Mastitis (Hoeben et al., 2000) nicht ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu wählten Skarzynski et al. (2007) für seine Studie Färsen aus, sodass keine Mastitis die Untersuchungsergebnisse beeinflussen konnte.

Bei der Untersuchung von CL-Proben ist weiterhin der Zeitpunkt der Ovarentnahme, oder der Fraktionssammlung bei implantierten MDS (Shaw und Britt, 1995), nach Applikation der Testsubstanz wichtig. So entnahmen Neuvians et al. (2004) die CL-tragenden Ovarien frühestens zwei Stunden nach intramuskulärer PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion. Zu diesem Zeitpunkt wurde von den Untersuchern bereits eine signifikant höhere Genexpressionsrate von **TNF- $\alpha$**  im Vergleich zu nicht behandelten Kühen, gemessen. In dieser Studie hielt die signifikant erhöhte Genexpression von TNF- $\alpha$  bis zum Ende des Untersuchungszeitraum (64 h p.i.) an. Der höchste Expressionswert wurde dabei zwei Stunden p.i. gemessen (Neuvians et al., 2004). Kliem et al. (2008) zeigten einen signifikanten Anstieg der Genexpression von TNF- $\alpha$  bereits 30 min nach intramuskulärer PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion. Auch hier wurde bei TNF- $\alpha$  der höchste Wert des gesamten Untersuchungszeitraumes (64 h p.i.) gemessen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde bereits 15 min nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion ein signifikanter Anstieg der Genexpression von TNF- $\alpha$  im Vergleich zu nicht behandelten HF-Färsen notiert (3.2.1). Dabei konnte eine biphasische Expression von TNF- $\alpha$  mit Maximalwerten 15 min und 120 min p.i. gemessen werden. Die



höchsten Werte wurden sowohl im CL-Zentrum, als auch in der CL-Peripherie, bereits 15 min p.i. festgestellt. In Hinblick auf die Lokalisation der CL-Proben wurden bei diesem Versuch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Peripherie und dem Zentrum nachgewiesen.

Zusammenfassend entsprechen die Ergebnisse der TNF- $\alpha$  Genexpression den bei Kliem et al. (2008) und Neuvians et al. (2004) beschriebenen Ergebnissen. Erstmals konnte in der hier vorliegenden Arbeit, der Beginn eines signifikanten Anstieges von TNF- $\alpha$  bereits 15 min p.i. gemessen werden, was eine ungewöhnliche schnelle Reaktion des CL auf die intramuskuläre PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion darstellt. Zusätzlich bekräftigen die Ergebnisse eine konzentrationsabhängige Beteiligung von TNF- $\alpha$  an der Luteolyse des Rindes, wie sie bereits von Skarzynski et al. (2007) vermutet wurde. So wurde die Expression von TNF- $\alpha$  in geringerer Menge auch bei der Kontrollgruppe und 5 min p.i. gemessen (Abb. 15A, B). Dass die PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierte Luteolyse ihre Ursache in einer ansteigenden Sekretion von TNF- $\alpha$  haben könnte, bewiesen Henkes et al. (2008) bei der Maus. Die Autoren injizierten hierbei pseudoträchtigen Mäusen einen TNF- $\alpha$  neutralisierenden Antikörper und anschließend PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, bei welcher nach alleinigen Applikation von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  eine Regression des CL stattfand, konnte in der mit dem Antikörper behandelten Gruppe keine Luteolyse der Mäuse festgestellt werden (Henkes et al., 2008). Im Gegensatz dazu beschrieben Sakumoto und Okuda (2004) eine allein während der strukturellen Luteolyse stattfindende Beteiligung von TNF- $\alpha$ .

Weshalb bereits nach so kurzer Zeit einen Anstieg der lutealen TNF- $\alpha$  Genexpression durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  verursacht wird, ist unklar. Vermutlich wird über die gefäßreiche Muskulatur PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  schnell in das Blut aufgenommen und in das stark durchblutete CL transportiert.

Auch die Expression von **CCL20** wurde durch die PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierte Luteolyse beeinflusst (Abb. 15A, B). So stieg die Expression von CCL20 im CL-Zentrum signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle an. Dieses Ergebnis bringt einen weiteren Hinweis auf die unter 4.2.2.1 vermutete Hypothese des Anstieges pro-inflammatorischer Mediatoren zum Zeitpunkt der Luteolyse (Neuvians et al., 2004). Vergleicht man die Expressionsraten von CCL20 in Bezug zur Lokalisation, so wurde eine signifikant stärkere Expression im CL-Zentrum ( $p < 0,05$ ), im Vergleich zur Peripherie festgestellt (Abb. 15C). Dieses Ergebnis bestätigt die unter Abb. 7A beschriebene, signifikant stärkere Expression von CCL20 im CL-Zentrum.

Eine Modulation der lutealen **CCL5**-Expression wurde bisher nur beim Rind 30 min nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter Luteolyse in vivo beschrieben (Kliem et al., 2007). Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Beeinflussung in Form eines Anstieges der Expression von CCL5, nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter Luteolyse, bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nach 720 min

beobachtet werden, jedoch war diese weder in der Peripherie, noch im Zentrum signifikant (Abb. 15A, B). Dieses Ergebnis wird durch die Studie von Kliem et al. (2007) bestätigt, welche gleichermaßen einen nicht signifikanten Anstieg der CCL5-Expression bis zur letzten Probenahme nach 64 Stunden zeigten. Im Gegensatz zu Kliem et al. (2007) wurde jedoch in der hier vorliegenden Studie ein wesentlich früher Anstieg von CCL5 (Peripherie: 15 min p.i., Zentrum: 5 min p.i.) gemessen. Ursache dieser Unterschiede liegt auch hier vermutlich in dem bereits bei TNF- $\alpha$  beschriebenen, unterschiedlichen Beginn der Probenentnahme. Auch bei CCL5 wurden in Hinblick auf die Lokalisation keine signifikanten Unterschiede gefunden (Abb. 15C). Wie bereits unter 4.2.2.3 beschrieben, könnte jedoch allein die exogene Applikation von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  den Anstieg der Expression von CCL5 verursacht haben (Lawler et al., 1999). Auszuschließen wäre dies nur durch eine vergleichende Untersuchung mit Tieren, denen zum Zeitpunkt der natürlichen Luteolyse das CL-tragende Ovar entnommen wurde, mit den hier erhobenen Daten.

Wie bereits unter 4.2.2.2 vermutet, kam es nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter Luteolyse zu einer verstärkten Expression von CXCL1 und CXCL8 in CL-Peripherie und Zentrum, bis zum Untersuchungsende (Abb. 15A, B). So war die Expression von CXCL1, ähnlich den Ergebnissen von TNF- $\alpha$ , bereits 15 min p. i. signifikant höher, im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Dabei wurden bis 720 min p. i. signifikant höhere Expressionen von CXCL1 gemessen. Dieses Ergebnis lässt eine Beteiligung von CXCL1 an der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierten Luteolyse beim Rind als wahrscheinlich erscheinen. Auch der durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter signifikante Anstieg von CXCL8 ( $p < 0,05$ ), 30 min p. i. in der Peripherie und nach 15 min p.i. im Zentrum, erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung dieses Chemokins an der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierten Luteolyse (Abb. 15A, B). Auffallend war dabei eine signifikant höhere Expression von CXCL8 im CL-Zentrum 15 min, 30 min und 720 min p. i. im Vergleich zur Peripherie, wie sie zuvor bereits bei den CL-Proben vom Schlachthof nachgewiesen wurde (Abb. 15C).

#### **4.3.1.2 Beeinflussung der lutealen P<sub>4</sub>-Sekretion und Chemokin/ TNF- $\alpha$ Genexpression durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub> in vitro**

Da die Injektion von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in vivo in der hier vorliegenden Arbeit einen Anstieg der Genexpression der ausgewählten Chemokine und TNF- $\alpha$  verursachte (3.2.1), wurde im Folgenden geprüft, ob auch in vitro eine Beeinflussung der geprüften Substanzen möglich war. Die CL-Proben stammten dabei wie unter 2.2.4.2 beschrieben, von zyklischen Rindern vom Schlachthof. Im Gegensatz zum in vivo Versuch (3.2.1) wurde jedoch keine signifikante Beeinflussung der Chemokinexpression von Lutealgewebe festgestellt (3.2.2). Jedoch sank die Expression von TNF- $\alpha$  nach 300 min Inkubation mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  signifikant ( $p < 0,05$ ), im Ver-

gleich zur alleinigen Inkubation des CL-Stückes mit M199, ab (Abb. 16A). Auch die P<sub>4</sub>-Sekretion der CL-Stücke stieg in der CL-Peripherie eher an, als abzufallen. So wiesen sowohl Miyamoto et al. (1993), als auch Kobayashi et al. (2001) im MDS nach Infusion von CL-Gewebestücken mit PGF<sub>2α</sub> einen Anstieg der P<sub>4</sub>-Sekretion nach. Miyamoto et al. (1993) vermuteten, dass bei in vitro Versuchen eine entscheidende Komponente für die Initiierung der Luteolyse durch PGF<sub>2α</sub> fehlt. Welche Komponente für diese veränderte Beeinflussung von PGF<sub>2α</sub> in vitro verantwortlich ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Interessanterweise hatte PGF<sub>2α</sub> in vitro in der hier vorliegenden Arbeit nicht nur auf die P<sub>4</sub>-Sekretion, sondern auch auf die Expression mehrerer Chemokine und TNF-α einen modulierenden Effekt. So sank die Expression von CCL5, CCL20, CXCL1 und TNF-α in der CL-Peripherie nach 300 minütiger Inkubation mit PGF<sub>2α</sub> signifikant im Vergleich zur Inkubation über 120 min ab (Abb. 16A, B). Im Zentrum wurde allein für CXCL1 dieser Effekt beobachtet.

Nach Korzekwa et al. (2008) konnte eine Senkung der P<sub>4</sub>-Sekretion in vitro, allein durch Aufrechterhaltung des Zellkontaktes von Lutealzellen zu Leukozyten und Endothelzellen, durch PGF<sub>2α</sub> erreicht werden. Jedoch wurde im Gegensatz dazu in der hier vorliegenden Arbeit und in der Untersuchung von Miyamoto et al. (1993) nie eine Separation der Lutealzellen von anderen Zellarten des CL vorgenommen. So bleibt die Ursache der nicht zuverlässig reproduzierbaren Initiierung der Luteolyse durch PGF<sub>2α</sub> in vitro im Vergleich zu den in vivo Versuchen weiter unklar.

Jedoch könnte die in der hier vorliegenden Arbeit vermutlich vorliegende, fehlende Auslösung der Luteolyse durch PGF<sub>2α</sub> in vitro den ausbleibenden Anstieg der ausgewählten Chemokine und TNF-α erklären. Gewissheit würde jedoch nur ein Versuchsaufbau bieten, bei welchem in vitro zuverlässig eine Luteolyse ausgelöst werden könnte.

#### **4.4 Beeinflussung der lutealen Expression von Chemokinen und TNF-α, sowie der P<sub>4</sub>-Sekretion durch TNF-α in vitro**

Eine konzentrationsabhängige, luteolytische Wirkung von TNF-α wurde in vivo beim Rind durch die Studien von Skarzynski et al. (Skarzynski et al., 2003; Skarzynski et al., 2007) gezeigt. Vermutlich ist jedoch TNF-α nicht allein Auslöser der Luteolyse, sondern auch ein Bestandteil der Mediatoren, welche zur Regression des CL beitragen (Berisha und Schams, 2005). So konnten Liebermann et al. (1996) nach alleiniger Infusion von TNF-α in bovinen

CL-Stücken im MDS an den Tagen 8 bis 12 p.ov. nur eine schwache Senkung der P<sub>4</sub>-Sekretion nach 120 min messen. Im Gegensatz dazu konnten Benyo und Pate (1992) in bovinen Lutealzellkulturen keine Abnahme der P<sub>4</sub>-Synthese bei Inkubation mit TNF- $\alpha$  allein feststellen. So sank die P<sub>4</sub>-Konzentration nach 4 Tagen nur infolge eines zytotoxischen Effektes der Kombination aus TNF- $\alpha$  mit IFN- $\gamma$  (Benyo und Pate, 1992).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine geringe, nicht signifikante Reduzierung der P<sub>4</sub>-Sekretion nach Inkubation der CL-Stücke mit TNF- $\alpha$  nach 300 min und 120 min festgestellt werden (Tab. 12). Die Expression von CXCL1 und CXCL8 stieg nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  über einen Zeitraum von 300 min signifikant ( $p < 0,05$ ) in Peripherie im Vergleich zur Kontrolle an. Auch TNF- $\alpha$  selbst lag nach Inkubation über eine Länge von 120 min im Vergleich zur Kontrolle signifikant ( $p < 0,05$ ) höher. Die Expression im CL-Zentrum war nach 120 min bei allen Chemokinen und TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle sichtbar, jedoch war dies nur bei CXCL8 signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die durch TNF- $\alpha$  in vitro gemessene, im Vergleich zum in vivo Versuch von Skarzynski et al. (2007) schwache Beeinflussung der P<sub>4</sub>-Sekretion hat ihren Ursprung möglicherweise in einer fehlenden Kombination verschiedener Mediatoren. So wiesen Ohtani et al. (2004) eine stärkere Senkung der P<sub>4</sub>-Sekretion im MDS beim Schaf in vivo nach, wenn sie TNF- $\alpha$  mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und ET-1 kombinierten. Im Vergleich dazu führte die Infusion von ET-1 und TNF- $\alpha$  zu einer geringeren P<sub>4</sub>-Senkung (Ohtani et al., 2004). Jedoch zeigten die Autoren auch einem Abfall der P<sub>4</sub>-Sekretion durch alleinige Infusion von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und ET-1.

Folglich ist TNF- $\alpha$  höchstwahrscheinlich an der Regression des bovinen CL beteiligt, jedoch kann diese in vitro durch die alleinige Gabe von TNF- $\alpha$  nicht ausgelöst werden.

Des Weiteren kann eine durch TNF- $\alpha$  verursachte Modulation der CL-Physiologie durch Unterdrückung der hypophysären LH-Sekretion nicht ausgeschlossen werden. So vermuten McCann et al. (2000) eine Senkung der hypophysären LH-Sekretion im Rahmen von Entzündungsprozessen durch TNF- $\alpha$ .

#### **4.5 Luteale Genexpression an den Tagen 10 bis 12 p.ov. im Vergleich mit Corpora lutea cyclica in der Blütephase**

Nachdem, sowohl im Tiermodell als auch in der Blüte-CL Gewebekultur, eine erhöhte Genexpression aller gemessenen Chemokine und TNF- $\alpha$ , nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation festgestellt wurde, konnte ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider Versuche vorgenommen werden.

Um den Einfluss der Variablen welche aus einer unbekanntem Herkunft, einem nicht bekannten Gesundheitsstatus, einer ungenauer Bestimmung des Zyklustages, sowie Stress vor der Schlachtung resultieren, wurde die Chemokin- und TNF- $\alpha$ -Genexpression von CL aus standardisierten Bedingungen mit denen vom Schlachthof verglichen (Abb. 19).

Alle Chemokine und TNF- $\alpha$  wurden in CL cyclica unbekannter Herkunft stärker exprimiert als in CL an den Tagen 10 bis 12 p.ov.. Signifikant waren die Unterschiede für CCL5, CCL20, CXCL1 und TNF- $\alpha$ . So lagen bei CCL20 und CXCL1 sowohl in der CL-Peripherie als auch im CL-Zentrum die Expressionsraten bei CL cyclicum unbekannter Herkunft signifikant höher. Sowohl bei CCL5 im CL-Zentrum, als auch bei TNF- $\alpha$  in der Peripherie, lag die Genexpression signifikant höher (Abb. 19). Deutlich geringer unterscheidet sich die Expression von CXCL8 zwischen den beiden Gruppen.

Auf welche der oben beschriebenen Variablen die erhöhte Chemokin/ TNF- $\alpha$ -Genexpression zurückzuführen ist, kann bei diesem Versuchsaufbau nicht bestimmt werden. Aus diesem Grunde wäre eine weitere Untersuchung, bei welchen klinisch gesunden Rindern zu einem festgelegten Zeitraum p.ov. nach Tötung auf dem Schlachthof die CL-tragenden Ovarien entnommen würden, sinnvoll. Hierbei könnte allein der im Rahmen der Schlachtung entstehende Stress die Ergebnisse beeinflussen.

#### **4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick**

In der hier vorliegenden Studie wurden keine Unterschiede in der Expression immunologisch wirksamer Mediatoren oder der Präsenz von Leukozyten zwischen CL der Blütephase von zyklischen oder von trächtigen Rindern nachgewiesen. So konnten zur Klärung der Frage, ob diese immunologischen Komponenten am Erhalt der CL-Funktion während der Trächtigkeit beteiligt sind, keine weiterführenden Hinweise gewonnen werden. Jedoch könnte anstatt einer generell unterschiedlichen Genexpression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  bei CL graviditatis, auch eine während der Trächtigkeit veränderte Ansprechbarkeit des CL auf proinflammatorische Substanzen vorliegen (Bagavandoss et al., 1990), welche die Auslösung einer Luteolyse verhindert. Aus diesem Grunde wären weitere Untersuchungen zu diesem Thema sinnvoll.

In Hinblick auf die Modulation der lutealen Genexpression durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bestätigen die hier vorliegenden Untersuchungen eine Beteiligung von TNF- $\alpha$  an der Luteolyse des Rindes. So konnte in dieser Arbeit der Anstieg von TNF- $\alpha$ , wie ihn Studien von Kliem et al. (2008) und Neuvians et al. (2004) beschrieben, gemessen werden. Darüber hinaus wurde der Beginn der

TNF- $\alpha$  Expression bereits erstmals 15 min p. i. festgestellt. Auch die im Rahmen dieser Studie erstmals gemessene Expression von CXCL1, CXCL8 und CCL20 lag nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierter Luteolyse signifikant höher als in CL cyclica und CL graviditatis. Dabei reagierte die Expression von TNF- $\alpha$  und den genannten Chemokinen bereits sehr früh nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation im Vergleich zu der erst Stunden später abfallenden P<sub>4</sub>-Sekretion.

In dieser Studie wurde außerdem deutlich, dass die Ergebnisse einer Modulation der Chemokin- und TNF- $\alpha$ -Genexpression im Rahmen von *in-vitro*-Modellen nur begrenzt aussagekräftig sind und *in-vivo*-Versuche nicht ersetzen können. So konnte, im Vergleich zum Tiermodell, keine Änderung der Expression nach Applikation von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  gemessen werden. Eine Inkubation von CL-Fragmenten mit TNF- $\alpha$  zeigte zwar bei CXCL1 und CXCL8, einen ähnlich signifikanten Anstieg der Genexpression wie im Tiermodell, jedoch blieb CCL20 unbeeinflusst und die Expression von TNF- $\alpha$  sank signifikant ab. Allerdings ist allein aufgrund der fehlenden Bestimmbarkeit des Zyklustages bei den vom Schlachthof stammenden CL-Proben der direkte Vergleich der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich. Auch in der Literatur wurde die Nachstellung dieses komplexen Prozesses *in vitro* mit sehr unterschiedlichem Erfolg beschrieben (Kobayashi et al., 2001; Korzekwa et al., 2008). Welche Komponenten zu einer vergleichbaren Reaktion des CL im *in-vitro*-Modell im Vergleich zum *in-vivo*-Modell nötig sind, bleibt auch weiterhin unklar.

Darüber hinaus geben die Ergebnisse dieser Studie aufgrund der Expression von CXCL1 und CXCL8, sowie der signifikant verstärkten Migration von Neutrophilen im Transmigrationsassay, erste Hinweise für eine Besiedlung von Neutrophilen während der Blütephase des CL im Zyklus und der Trächtigkeit. So könnte in einer Folgestudie anhand der Nachweismethode von Al-Zi'abi et al. (2002) die Anwesenheit von Neutrophilen im CL des Rindes überprüft werden. Auch wäre zu untersuchen, ob die Anzahl von Neutrophilen mit der ansteigenden Expression von CXCL1 und CXCL8 zum Zeitpunkt der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induzierten Luteolyse korreliert. So könnte zusätzlich ein Hinweis auf die Bedeutung einer erhöhten Expression dieser Chemokine kurz nach Induktion der Luteolyse erbracht werden.

Aufgrund von kaum vorhandener Literatur (Shirasuna et al., 2008) war die Interpretation der regional unterschiedlichen Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  in CL-Proben schwierig. So kann nur vermutet werden, dass die signifikant höhere Expression von CCL5, CCL20, CXCL8 im CL-Zentrum mit einer lokal begrenzt auftretenden Änderung der Durchblutung oder Entzündungsreaktion in Verbindung steht. Auch war dieser Effekt bei CL-Proben vom Schlachthof wesentlich ausgeprägter, als bei CL aus dem Tierversuch. Interessanterweise lag im Gegensatz dazu die Expression von TNF- $\alpha$  in den CL vom Schlachthof in der Peripherie

signifikant höher. Welche Rolle dabei die unbekannte Herkunft der Tiere, eventuelle Entzündungen wie Mastitiden oder Stress eine Rolle spielen bleibt unklar.

Letztendlich lassen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Reihe von Fragen, die Beeinflussung der Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  betreffend, offen. So kann keine eindeutige Erklärung für die erstmals im Rahmen dieser Untersuchungen festgestellte, signifikant erhöhte Expression von CCL5, CCL20, CXCL1 und TNF- $\alpha$  in CL-Proben, welche vom Schlachthof stammen im Vergleich zu Kontrollproben des Tierversuchs, geliefert werden. Abzuleiten ist daraus jedoch einerseits, die enorme Relevanz von standardisiert durchgeführten Tierversuchen für die Interpretation der Ergebnisse und andererseits eine möglicherweise, durch Entzündungen und/oder Stress der Schlachttiere verursachte erhöhte Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$ . Auch hier wäre zur Erforschung des Einflusses von Entzündungsmediatoren ein unter kontrollierten Bedingungen durchgeführter Tierversuch notwendig.

## 5 Zusammenfassung

### **Sybille Raddatz: Untersuchungen zum Einfluss von Chemokinen und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ auf die Funktion des Corpus luteum beim Rind während des Diöstrus, der Trächtigkeit und der Luteolyse**

Eine in den letzten Jahrzehnten sinkende Trächtigkeitsrate des Hochleistungsmilchrindes der Rasse Holstein-Friesian könnte ihre Ursache in einer Dysfunktion der Ovarphysiologie haben, welche durch Entzündungen wie der Mastitis ausgelöst werden kann. Der Einfluss von Entzündungs-vermittelnden Leukozyten, Chemokinen und Zytokinen auf das Corpus luteum (CL) ist jedoch nur teilweise erforscht. Ziel dieser Studie war es, das Vorkommen von Leukozyten, Chemokinen und TNF- $\alpha$  im CL cyclicum und CL graviditatis vergleichend zu analysieren. Zusätzlich wurde geprüft, in wieweit eine Modulation der lutealen Chemokin- und TNF- $\alpha$ - Genexpression, sowie der P<sub>4</sub>-Synthese durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und TNF- $\alpha$  erfolgt.

Hierfür wurde die Genexpression der Chemokine CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL8 und des Zytokins TNF- $\alpha$  unter Beachtung möglicher regionaler Unterschiede (CL-Peripherie versus CL-Zentrum) im CL-Gewebe mittels qRT-PCR in drei Versuchsmodellen bestimmt. Im ersten Abschnitt wurden in der Blütephase befindende, CL-tragende Ovarien von 7 trächtigen und 8 zyklischen, frisch geschlachteten Rindern entnommen. Zusätzlich zur qRT-PCR wurde funktionell geprüft, ob die Kulturüberstände von CL-Gewebefragmenten zur Migration von Eosinophilen und Neutrophilen führen. Ausserdem wurde die P<sub>4</sub>-Sekretion in CL-Gewebekulturüberständen nachgewiesen. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung auf das Vorkommen und die Zahl residenter Leukozyten und eosinophiler Granulozyten in histologischen CL-Gewebeschnitten.

Eine Expression der untersuchten Chemokine und TNF- $\alpha$  konnte in allen CL im CL-Zentrum nachgewiesen werden. In der Peripherie von nur einem CL cyclicum fehlte die Expression von CCL20 und CXCL8. Zwischen CL graviditatis und CL cyclica bestanden bezüglich der Genexpression keine signifikanten Unterschiede. Die Genexpression von CXCL8, CCL20 und CCL5 lag im CL-Zentrum signifikant höher, als in der CL-Peripherie, während für TNF- $\alpha$  eine signifikant höhere Genexpression in der Peripherie festgestellt wurde.

Die fehlenden Unterschiede zwischen CL cyclica und CL graviditatis deuten auf sehr vergleichbare, immunregulative Vorgänge in physiologisch unterschiedlichen Corpora lutea hin. Die regional unterschiedliche Expression von Chemokinen und TNF- $\alpha$  hingegen, sowie die Unterschiede der P<sub>4</sub>-Sekretion im CL-Zentrum versus CL-Peripherie könnten auf unterschied-



lichen Durchblutungsraten und differierende Immunregulationsmechanismen innerhalb des CL hinweisen.

Die signifikant höheren Migrationsraten neutrophiler Granulozyten (53%) nach Einsatz von CL-Gewebekulturüberständen (verglichen zu Medium-Kontrollansätzen: 24%-30%), belegen die funktionelle Expression chemotaktischer Mediatoren im CL. Dies scheint selektiv für Neutrophile zu gelten, da ein signifikanter Einfluss auf die *in-vitro*-Migration von eosinophilen Granulozyten nicht beobachtet werden konnte. Die Produktion Neutrophilen-chemotaktischer Faktoren unterschied sich nicht zwischen CL- Peripherie und CL-Zentrum, sowie auch nicht zwischen CL cyclica und CL graviditatis. Dies deckte sich mit der immunhistologisch ermittelten Zahl an Leukozyten, die sich nicht zwischen CL cyclica und CL graviditatis, als auch nicht zwischen CL-Peripherie und CL-Zentrum unterschied. Die sehr geringe Zahl an nachgewiesenen Eosinophilen in CL-Gewebeschnitten ( $0-1 \pm 0,4$ ) verglichen mit der Zahl an Leukozyten, reflektierte sich ebenso in einer signifikant negativen Korrelation ( $r = -0,76$ ) zwischen den Migrationsraten Eosinophiler und der Expression von TNF- $\alpha$  in der Peripherie.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden zur Bestimmung der Genexpression oben genannter Chemokine und TNF- $\alpha$  während der Luteolyse bei klinisch gesunden, zyklischen Färsen an den Tagen 10 bis 12 p.ov. das CL-tragende Ovar operativ entfernt. Die Ovarentnahme erfolgte transvaginal bei 24 Färsen 5 min, 15 min, 30 min, 120 min und 720 min nach Injektion von 25 mg des PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Analogons Dinoprost und bei 5 Färsen ohne vorherige Behandlung. Ein signifikanter Anstieg der Genexpression im Vergleich zur Kontroll-CL wurde für CCL20 720 min post injectionem (p.i.) im CL-Zentrum gemessen. Hingegen wurde eine signifikant höhere Expression für CXCL1 in der CL-Peripherie und im CL-Zentrum, bereits 15 min p.i. ermittelt, die bis zum Ende der Messungen (720 min p.i.) anhielt. Die CXCL8-Expression stieg im CL-Zentrum früher (15 min p.i.) als in der CL-Peripherie (30 min p.i.) an, und blieb in beiden Lokalisationen bis 120 min p.i. signifikant erhöht. Die TNF- $\alpha$ -Expression war im CL-Zentrum und in der CL-Peripherie 15 min und 30 min nach PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Applikation signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht; im CL-Zentrum konnte dies auch noch 120 min p.i. beobachtet werden. Die Expression von CCL5 lag nach Injektion von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes (720 min p.i.) höher als die Kontrolle, jedoch war dies nicht signifikant. Die P<sub>4</sub>-Plasmakonzentration der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -behandelten Färsen sank gegenüber den Kontrolltieren 720 min p.i. signifikant ab. Damit modulierte eine PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion signifikant das im Gelbkörper exprimierte Muster an Chemokinen und TNF- $\alpha$ . Dies bietet einen Hinweis auf die Beteiligung dieser Substanzen an der Luteolyse beim Rind.

Ob  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ebenso *in vitro* einen Einfluss auf die Genexpression in CL-Fragmenten hat, wurde im dritten Abschnitt der Arbeit untersucht. Ebenso wurde geprüft, wie ein exogen zugegebener inflammatorischer Mediator ( $\text{TNF-}\alpha$ ) die Genexpression in CL-Fragmenten beeinflusst. Diese Studien wurden mit CL cyclica in der Blütephase von frisch geschlachteten Rindern durchgeführt. Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpression in der CL-Gewebekultur und beeinflusste auch nicht die  $\text{P}_4$ -Konzentration in den Kulturüberständen. Hingegen führte die Inkubation von CL-Gewebe mit  $\text{TNF-}\alpha$  zur signifikant erhöhten Expression von CXCL1, CXCL8 und  $\text{TNF-}\alpha$  der CL-Peripherie. Die CXCL8-Expression erwies sich ebenfalls im CL-Zentrum als signifikant erhöht im Vergleich mit CL-Gewebe ohne  $\text{TNF-}\alpha$  Applikation.

Alle Chemokine und  $\text{TNF-}\alpha$  wurden in CL cyclica von frisch geschlachteten Rindern stärker exprimiert, als in CL an den Tagen 10 bis 12 p.ov.. Signifikante Unterschiede wurden für CCL5, CCL20, CXCL1 und  $\text{TNF-}\alpha$  ermittelt. Für CCL20 und CXCL1 galt dies in der CL-Peripherie und dem CL-Zentrum, bei CCL5 für das CL-Zentrum und bei  $\text{TNF-}\alpha$  für die CL-Peripherie. Damit erweisen sich *in-vitro*-Modelle als nur begrenzt aussagekräftig für die Untersuchung zur Modulation der Chemokin- und  $\text{TNF-}\alpha$ -Genexpression. Des Weiteren deutet diese erhöhte Expression bei den vom Schlachthof stammenden CL auf eine mögliche Beeinflussung der lutealen Chemokin- und  $\text{TNF-}\alpha$ -Genexpression durch Entzündungen und/oder Stress hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschriebenen erstmals die Genexpression der Chemokine CXCL1, CXCL8 und CCL20 während der Blütephase des CL cyclicum und des CL graviditatis beim Rind. Außerdem zeigt diese Studie deutliche Zusammenhänge zwischen der durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Luteolyse und einer ansteigenden Expression dieser Chemokine und  $\text{TNF-}\alpha$  *in vivo*. Die fehlende Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auf die Genexpression *in vitro* deutet darauf hin, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  *in vivo* die Luteolyse nicht direkt, sondern indirekt über andere Mediatoren wie  $\text{TNF-}\alpha$  induziert. Folgestudien zum luteolytischen Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  *in vivo* sollten sich der Frage nähren, auf welchem Wege diese Substanz zu einer veränderten Genexpression im Corpus luteum führt. Zusätzlich sollte die Bedeutung der verschiedenen, lokal und systemisch bei Entzündungen hochregulierten, Mediatoren für die CL-Physiologie untersucht werden. Insgesamt sollten Kenntnisse über den Einfluss immunologischer Prozesse auf die Reproduktionsleistung erweitert werden, um die Fruchtbarkeit beim Milchrind in Zukunft verbessern zu können.

## 6 Summary

**Sybille Raddatz: Investigations on influences of chemokines and tumor-necrosis-factor- $\alpha$  on the function of the bovine Corpus luteum during the dioestrus, pregnancy and luteolysis**

The decline of successful pregnancy rates in high performance holstein-friesian dairy cattle could be the result of ovarian dysfunctions, which are caused by inflammations like the mastitis. The influence of inflammation-mediated leucocytes, chemokines und cytokines on the corpus luteum (CL) is only partially known. Therefore the aim of the present study was a comparative investigation on the incidence of leucocytes, chemokines und TNF- $\alpha$  at the CL cyclicum and CL graviditatis. Additionally a possible modulation of the luteal chemokine- and TNF- $\alpha$  gene expression as well as the P<sub>4</sub>-synthesis by PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  and TNF- $\alpha$  was proved.

For this purpose the gene expression of the chemokines CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL8 and of the cytokine TNF- $\alpha$  in CL-tissue have been determined by qRT-PCR considering local differences (CL-periphery versus CL-centre) in three types of experimental models. In the first step ovaries with CL of the mid-luteal phase were obtained from 7 pregnant and 8 cyclic, fresh slaughtered cattle. In addition to qRT-PCR the rate of migration of eosinophil and neutrophil granulocytes were functionally proved with supernatants of CL-tissue fragments. Furthermore the concentrations of P<sub>4</sub> in supernatants of CL-tissue fragments were detected. In addition, the presence and quantity of resident leucocytes und eosinophils were determined in histological CL-slices.

The gene expression of the tested chemokines and TNF- $\alpha$  were demonstrated in all CL in the centre. Only in the periphery of one CL cyclicum no expression of CCL20 and CXCL8 could be verified. No differences in gene expression between CL graviditatis and CL cyclica existed. In the CL-centre the gene expression of CXCL8, CCL20 and CLL5 were significantly higher compared to the CL-periphery, whereas the gene expression of TNF- $\alpha$  was significantly higher in the periphery.

The lack of differences between CL cyclica and CL graviditatis suggest comparable immunoregulatory processes in physiologically different corpora lutea. The locally different gene expression of chemokines and TNF- $\alpha$ , as well as differences in P<sub>4</sub>-concentration in CL-supernatants of centre and periphery could indicate differences in blood flow and immunoregulatory mechanism inside the CL.

A significant higher migration rate of neutrophil granulocytes (53%) after incubation with CL-tissue supernatants (compare to medium-controls: 24%-30%) documented the functional expression of chemotactic mediators in the CL. This fact seems only to be relevant for neutrophil granulocytes, because no significant influence of the *in-vitro*-migration was observed for eosinophils. The secretion of neutrophil chemoattractive substances did not differ in CL-periphery and CL-centre, as well as CL cyclica and CL graviditatis. This observation is confirmed by the constant number of leucocytes in CL cyclica and CL graviditatis, as well as in CL-periphery and CL-centre, detected by immunohistochemical staining. The very low number of eosinophils ( $0.1 \pm 0.4$ ) compared to the quantity of leucocytes in CL-slices were corroborated by a significant negative correlation ( $r = -0.76$ ) between the eosinophil migration rate and the expression of TNF- $\alpha$  in the periphery.

In the second part of this study the gene expression were determined during luteolysis in CL from healthy, normally cycling heifers on day 10 until 12 post ovulationem (p.ov.). Therefore the ovaries of 24 heifers were excised by transvaginal ovariectomy 5 min, 15 min, 30 min, 120 min and 720 min after injection of 25 mg of the PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  analogue dinoprost. From 5 heifers ovaries were obtained without a previous PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  injection. A significant increase in gene expression of CCL20 was detected 720 min post injectionem (p.i.) in the CL-centre compared to the control. The gene expression of CXCL1 was significant higher in the CL-periphery and in the CL-centre 15 min p.i. until the end of the investigation (720 min p.i.) compared to the control group. For CXCL8 an significantly increased gene expression in the CL-centre could be detected already after 15 min, whereas in the CL-periphery the gene expression rised not until 30 min p.i., in both locations expression remained significantly higher until 120in p.i.. The gene expression of TNF- $\alpha$  was significantly higher in the CL-centre and in the CL-periphery 15 min and 30 min after PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  injection compared to the control group; this augmentation was still observed 120 min p.i. in the CL-centre. The expression of CCL5 after PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  injection was higher until the end of investigation compared to the control group, however this result was not significant. The P<sub>4</sub>-plasma concentration of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  treated heifers decreased significantly 720 min p.i., compared to the control animals. Therefore the PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -injection affected the expression pattern of chemokines and TNF- $\alpha$  in the CL. This result indicates an involvement of these substances in bovine luteolysis.

In the third part the influence of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  on the gene expression in vitro were investigated in CL-fragments. Furthermore the influence on the gene expression in CL-fragments was tested by the exogenous application of an inflammatory mediator (TNF- $\alpha$ ). These studies were conducted with CL cyclica in the mid-luteal phase from fresh slaughtered cattle. Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  induced no significant alterations in gene expression in the culture of CL-tissue and did

not affect the concentration of P<sub>4</sub> in supernatants of CL-tissue. By contrast incubation of CL-tissue with TNF- $\alpha$  led to a significant elevated expression of CXCL1, CXCL8 and TNF- $\alpha$  in the CL-periphery. Likewise the expression of CXCL8 was also higher in the CL-centre compared to CL-tissue without TNF- $\alpha$ -application.

All chemokines and TNF- $\alpha$  in CL cyclica of fresh slaughtered cattle were expressed in a higher amount, compared to CL on day 10 until 12 p.ov.. Significant differences were observed for CCL5, CCL20, CXCL1 and TNF- $\alpha$ . This was noticed for CCL20 and CXCL1 in the CL-periphery and in the CL-centre, as well as in CCL5 in the CL-centre and in TNF- $\alpha$  in the CL-periphery. For this reason *in-vitro*-models are only suitable to a limited extend to determine the modulation of chemokine and TNF- $\alpha$  gene expression. In addition these elevated expressions in CL of slaughtered cattle suggest an inducement of the luteal chemokine and TNF- $\alpha$  gene expression by inflammation and/or stress.

The results of the present study described for the first time the gene expression of the chemokines CXCL1, CXCL8 and CCL20 during the mid luteal phase in CL cyclium and Cl graviditatis in cattle. In addition this study shows strong correlations between a PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -induced luteolysis and an increased expression of these chemokines and TNF- $\alpha$  in vivo. The missing influence of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  on the gene expression in vitro suggest that in vivo PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  does not directly influence luteolysis but rather acts indirectly via other mediators, like TNF- $\alpha$ . Further studies about the luteolytic influence of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in vivo should focus on the question how this substance modifies gene expression in bovine corpus luteum. Additionally the impact of different, in local and systemic inflammations up regulated mediators should be investigated in CL-physiology. In conclusion the knowledge about the influence of immunological processes on reproduction should be expended to enhance fertility in dairy cattle in future.

## 7 Literatur

- Abulafia, O., Sherer, D.M., 2000, Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 182, 240-246.
- Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2003, Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125, 759-767.
- Acosta, T.J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2002, Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol Reprod* 66, 651-658.
- Akhawi-Araghi, D.M., 2005. Evaluierung eines PCR-Nachweisverfahrens zur Bestimmung der Expression von Zytokin- und Chemokingenen. Diss. Fachber. Humanmed., Tübingen.
- Al-Zi'abi, M.O., Fraser, H.M., Watson, E.D., 2002, Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction* 123, 67-77.
- Al-Zi'abi, M.O., Watson, E.D., Fraser, H.M., 2003, Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction* 125, 259-270.
- Alila, H.W., Hansel, W., 1984, Induction of lymphopenia causes luteal dysfunction in cattle. *Biol Reprod* 31, 671-678.
- Almeida, F.R., Kirkwood, R.N., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., 2000, Consequences of different patterns of feed intake during the estrous cycle in gilts on subsequent fertility. *J Anim Sci* 78, 1556-1563.
- 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.
- Ashworth, C.J., Sales, D.I., Wilmut, I., 1989, Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fertil* 87, 23-32.
- Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrouer, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S., 2006, The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 21, 1705-1719.
- Aust, G., Brylla, E., Lehmann, I., Kiessling, S., Spanel-Borowski, K., 1999, Cloning of bovine RANTES mRNA and its expression and regulation in ovaries in the periovulatory period. *FEBS Lett* 463, 160-164.
- Aust, G., Simchen, C., Heider, U., Hmeidan, F.A., Blumenauer, V., Spanel-Borowski, K., 2000, Eosinophils in the human corpus luteum: the role of RANTES and eotaxin in eosinophil attraction into periovulatory structures. *Mol Hum Reprod* 6, 1085-1091.
- Bagavandoss, P., Wiggins, R.C., Kunkel, S.L., Remick, D.G., Keyes, P.L., 1990, Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. *Biol Reprod* 42, 367-376.
- Bauer, M., Reibiger, I., Spanel-Borowski, K., 2001, Leucocyte proliferation in the bovine corpus luteum. *Reproduction* 121, 297-305.
- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Ott, T.L., 1997, Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 37, 412-420.
- Benyo, D.F., Haibel, G.K., Laufman, H.B., Pate, J.L., 1991, Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine corpus luteum during the estrous cycle, luteolysis, and early pregnancy. *Biol Reprod* 45, 229-234.

- Benyo, D.F., Pate, J.L., 1992, Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 130, 854-860.
- Berisha, B., Schams, D., 2005, Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 29, 305-317.
- Bignold, L.P., 1995, The eosinophil leukocyte: controversies of recruitment and function. *Experientia* 51, 317-327.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bornstein, S.R., Rutkowski, H., Vrezas, I., 2004, Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215, 135-141.
- Brannstrom, M., Giesecke, L., Moore, I.C., van den Heuvel, C.J., Robertson, S.A., 1994, Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod* 50, 1161-1167.
- Bukovsky, A., 2006, Immune system involvement in the regulation of ovarian function and augmentation of cancer. *Microsc Res Tech* 69, 482-500.
- Bukulmez, O., Arici, A., 2000, Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod Update* 6, 1-15.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Castro, A., Castro, O., Troncoso, J.L., Kohen, P., Simon, C., Vega, M., Devoto, L., 1998, Luteal leukocytes are modulators of the steroidogenic process of human mid-luteal cells. *Hum Reprod* 13, 1584-1589.
- Chagas e Silva, J., Diniz, P., Lopes da Costa, L., 2008, Luteotrophic effect, growth and survival of whole versus half embryos and, their relationship with plasma progesterone concentrations of recipient dairy heifers. *Anim Reprod Sci* 104, 18-27.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., 2005, Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology* 64, 49-60.
- Cherry, J.A., Hou, X., Rueda, B.R., Davis, J.S., Townson, D.H., 2008, Microvascular endothelial cells of the bovine corpus luteum: a comparative examination of the estrous cycle and pregnancy. *J Reprod Dev* 54, 183-191.
- DeVries, M.E., Ran, L., Kelvin, D.J., 1999, On the edge: the physiological and pathological role of chemokines during inflammatory and immunological response. *Semin. Immunol.* 11, 95-104.
- Dickson, S.E., Bicknell, R., Fraser, H.M., 2001, Mid-luteal angiogenesis and function in the primate is dependent on vascular endothelial growth factor. *J Endocrinol* 168, 409-416.
- Duncan, W.C., Rodger, F.E., Illingworth, P.J., 1998, The human corpus luteum: reduction in macrophages during simulated maternal recognition of pregnancy. *Hum Reprod* 13, 2435-2442.
- Endo, T., Kanayama, K., 1998, Effects of splenectomy on luteal function in pseudopregnant rabbits. *J Int Med Res* 26, 93-97.
- Engel, E., 2004. Nachweis der Expression leukozytärer Zytokine im Corpus luteum der Hündin zu definierten Stadien im Diöstrus. Diss. Fachb. Veterinärmed., Gießen.
- Erlebacher, A., Zhang, D., Parlow, A.F., Glimcher, L.H., 2004, Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Invest* 114, 39-48.

- Espey, L.L., 1980, Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod* 22, 73-106.
- Falconer, H., Mwenda, J.M., Chai, D.C., Wagner, C., Song, X.Y., Mihalyi, A., Simsa, P., Kyama, C., Cornillie, F.J., Bergqvist, A., Fried, G., D'Hooghe, T.M., 2006, Treatment with anti-TNF monoclonal antibody (c5N) reduces the extent of induced endometriosis in the baboon. *Hum Reprod* 21, 1856-1862.
- Fitzgerald, D.C., Meade, K.G., McEvoy, A.N., Lillis, L., Murphy, E.P., Machugh, D.E., Baird, A.W., 2007, Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 116, 59-68.
- Form, D.M., Auerbach, R., 1983, PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 172, 214-218.
- Gardiner, T.A., Gibson, D.S., de Gooyer, T.E., de la Cruz, V.F., McDonald, D.M., Stitt, A.W., 2005, Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 166, 637-644.
- Girsh, E., Greber, Y., Meidan, R., 1995, Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. *Biol Reprod* 52, 954-962.
- Grunert, E., Berchtold, M., 1999, *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*, 3 Edition. Parey, Berlin.
- Halme, J., Hammond, M.G., Syrop, C.H., Talbert, L.M., 1985, Peritoneal macrophages modulate human granulosa-luteal cell progesterone production. *J Clin Endocrinol Metab* 61, 912-916.
- Hameed, A., Fox, W.M., Kurman, R.J., Hruban, R.H., Podack, E.R., 1995, Perforin expression in human cell-mediated luteolysis. *Int J Gynecol Pathol* 14, 151-157.
- Hansen, P.J., Soto, P., Natzke, R.P., 2004, Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol* 51, 294-301.
- Hansen, T.R., Austin, K.J., Perry, D.J., Pru, J.K., Teixeira, M.G., Johnson, G.A., 1999, Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 329-339.
- Hayashi, K., Tanaka, J., Hayashi, K.G., Hayashi, M., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2002, The cooperative action of angiotensin II with subluteolytic administration of PGF2alpha in inducing luteolysis and oestrus in the cow. *Reproduction* 124, 311-315.
- Henkes, L.E., Sullivan, B.T., Lynch, M.P., Kolesnick, R., Arsenault, D., Puder, M., Davis, J.S., Rueda, B.R., 2008, Acid sphingomyelinase involvement in tumor necrosis factor alpha-regulated vascular and steroid disruption during luteolysis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7670-7675.
- Hockett, M.E., Almeida, R.A., Rohrbach, N.R., Oliver, S.P., Dowlen, H.H., Schrick, F.N., 2005, Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. *J Dairy Sci* 88, 2422-2431.
- Hoeben, D., Burvenich, C., Trevisi, E., Bertoni, G., Hamann, J., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W., 2000, Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J Dairy Res* 67, 503-514.
- Hoffmann, B., 1999, *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*, 3 Edition. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 13-28 pp.



- Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B., 1980, Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 63, 155-160.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2005, Immunobiology, 6 Edition. Garland Science Publishing, New York.
- Jaroszewski, J.J., Hansel, W., 2000, Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. *Proc Soc Exp Biol Med* 224, 50-55.
- Jindal, R., Cosgrove, J.R., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., 1996, Effect of nutrition on embryonal mortality in gilts: association with progesterone. *J Anim Sci* 74, 620-624.
- Kalra, P.S., Edwards, T.G., Xu, B., Jain, M., Kalra, S.P., 1998, The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Domest Anim Endocrinol* 15, 321-332.
- Karstrom-Encrantz, L., Runesson, E., Bostrom, E.K., Brannstrom, M., 1998, Selective presence of the chemokine growth-regulated oncogene alpha (GROalpha) in the human follicle and secretion from cultured granulosa-lutein cells at ovulation. *Mol Hum Reprod* 4, 1077-1083.
- Kato, M., Kephart, G.M., Morikawa, A., Gleich, G.J., 2001, Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissues: evidence for eosinophil degranulation in normal gastrointestinal tract. *Int Arch Allergy Immunol* 125 Suppl 1, 55-58.
- Kato, S., Shiratsuchi, A., Nagaosa, K., Nakanishi, Y., 2005, Phosphatidylserine- and integrin-mediated phagocytosis of apoptotic luteal cells by macrophages of the rat. *Dev Growth Differ* 47, 153-161.
- Kawano, Y., Fukuda, J., Nasu, K., Nishida, M., Narahara, H., Miyakawa, I., 2004, Production of macrophage inflammatory protein-3alpha in human follicular fluid and cultured granulosa cells. *Fertil Steril* 82 Suppl 3, 1206-1211.
- Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Einspanier, R., Meyer, H.H., Schmidt, S.E., Reichenbach, H.D., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E., 2006, Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod* 74, 253-264.
- Kliem, H., Berisha, B., Meyer, H.H., Schams, D., 2008, Regulatory changes of apoptotic factors in the bovine corpus luteum after induced luteolysis. *Mol Reprod Dev*.
- Kliem, H., Djurkovic, M., Schams, D., Meyer, H., Berisha, B., 2007, Investigations of mRNA expression of chemokines and their receptors in the bovine corpus luteum during induced luteolysis. In: 40. Kongr. der Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Berlin, p. 15.
- Kobayashi, S., Acosta, T.J., Ozawa, T., Hayashi, K., Berisha, B., Ohtani, M., Schams, D., Miyamoto, A., 2002, Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. *Biol Reprod* 66, 174-179.
- Kobayashi, S., Berisha, B., Amselgruber, W.M., Schams, D., Miyamoto, A., 2001, Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. *J Endocrinol* 170, 369-380.
- Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., Strieter, R.M., 1992, Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-1801.

- Korzekwa, A.J., Jaroszewski, J.J., Bogacki, M., Deptula, K.M., Maslanka, T.S., Acosta, T.J., Okuda, K., Skarzynski, D.J., 2004, Effects of Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and nitric oxide on the secretory function of bovine luteal cells. *J Reprod and Dev* 50, 411-417.
- Korzekwa, A.J., Jaroszewski, J.J., Woclawek-Potocka, I., Bah, M.M., Skarzynski, D.J., 2008, Luteolytic Effect of Prostaglandin F(2alpha) on Bovine Corpus Luteum Depends on Cell Composition and Contact. *Reprod Domest Anim*.
- Krishna, A., Terranova, P.F., 1985, Alterations in mast cell degranulation and ovarian histamine in the proestrous hamster. *Biol Reprod* 32, 1211-1217.
- Lawler, D.F., Hopkins, J., Watson, E.D., 1999, Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrous cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. *J Reprod Fertil* 117, 281-290.
- Lee, Z., Swaby, R.F., Liang, Y., Yu, S., Liu, S., Lu, K.H., Bast, R.C., Jr., Mills, G.B., Fang, X., 2006, Lysophosphatidic acid is a major regulator of growth-regulated oncogene alpha in ovarian cancer. *Cancer Res* 66, 2740-2748.
- Lei, Z.M., Chegini, N., Rao, C.V., 1991, Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol Reprod* 44, 1148-1156.
- Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., Nuseir, N., 1987, Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630-632.
- Leroy, J.L., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I.G., Bols, P.E., 2008, Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod Domest Anim*.
- Liebermann, J., Schams, D., Miyamoto, A., 1996, Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy in vitro. *Reprod Fertil Dev* 8, 1003-1011.
- Liptak, A.R., Sullivan, B.T., Henkes, L.E., Wijayagunawardane, M.P., Miyamoto, A., Davis, J.S., Rueda, B.R., Townson, D.H., 2005, Cooperative expression of monocyte chemoattractant protein 1 within the bovine corpus luteum: evidence of immune cell-endothelial cell interactions in a coculture system. *Biol Reprod* 72, 1169-1176.
- Lucy, M.C., 2001, Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 84, 1277-1293.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001, Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175-180.
- McCann, S.M., Kimura, M., Karanth, S., Yu, W.H., Mastronardi, C.A., Rettori, V., 2000, The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann N Y Acad Sci* 917, 4-18.
- McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C., 1999, Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79, 263-323.
- Meyer, H.H., Eisele, K., Osaso, J., 1989, A biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> alpha. *Prostaglandins* 38, 375-383.
- Meyer, S., 2008, Untersuchungen zur Beeinflussung funktioneller Eigenschaften von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der initialen Phase der bovinen Mastitis. *Diss. Fachber. Veterinärmed., Hannover*.

- Miyamoto, A., von Lutzow, H., Schams, D., 1993, Acute actions of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha, E<sub>2</sub>, and I<sub>2</sub> in microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. *Biol Reprod* 49, 423-430.
- Murdoch, W.J., Steadman, L.E., 1991, Investigations concerning the relationship of ovarian eosinophilia to ovulation and luteal function in the sheep. *Am J Reprod Immunol* 25, 81-87.
- Naessens, J., Hopkins, J., 1996, Introduction and summary of workshop findings. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52, 213-235.
- Nakamura, Y., Smith, M., Krishna, A., Terranova, P.F., 1987, Increased number of mast cells in the dominant follicle of the cow: relationships among luteal, stromal, and hilar regions. *Biol Reprod* 37, 546-549.
- Neuvians, T.P., Schams, D., Berisha, B., Pfaffl, M.W., 2004, Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F<sub>2</sub>alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 70, 473-480.
- Nishizuka, Y., Sakakura, T., 1969, Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166, 753-755.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000, Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80, 1-29.
- Niswender, G.D., Nett, T.M., 1994, *The corpus luteum and its control in infraprimates species*, 2 Edition. Raven Press Ltd, New York.
- O'Leary, S., Jasper, M.J., Robertson, S.A., Armstrong, D.T., 2006, Seminal plasma regulates ovarian progesterone production, leukocyte recruitment and follicular cell responses in the pig. *Reproduction* 132, 147-158.
- Ohtani, M., Takase, S., Wijayagunawardane, M.P., Tetsuka, M., Miyamoto, A., 2004, Local interaction of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha with endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha on the release of progesterone and oxytocin in ovine corpora lutea in vivo: a possible implication for a luteolytic cascade. *Reproduction* 127, 117-124.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Wolcawek-Potocka, I., Skarzynski, D.J., 2004, Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71, 2065-2071.
- Okuda, K., Sakumoto, R., Uenoyama, Y., Berisha, B., Miyamoto, A., Schams, D., 1999, Tumor necrosis factor alpha receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 61, 1017-1022.
- Oliveira, J.F., Henkes, L.E., Ashley, R.L., Purcell, S.H., Smirnova, N.P., Veeramachaneni, D.N., Anthony, R.V., Hansen, T.R., 2008, Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology* 149, 1252-1259.
- Ormerod, A.D., Herriot, R., Davidson, R.J., Sewell, H.F., 1990, Adult mastocytosis: an immunophenotypic and flow-cytometric investigation. *Br J Dermatol* 122, 737-744.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X., Lee, J.W., 2003, The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34, 597-627.
- Pate, J., Keyes, L., 2001, Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction* 122, 665-676.
- Pate, J.L., Condon, W.A., 1989, Regulation of steroidogenesis and cholesterol synthesis by prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and lipoproteins in bovine luteal cells. *J Reprod Fertil* 87, 439-446.

- Penny, L.A., 2000, Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis. *Rev Reprod* 5, 63-66.
- Pepperell, J.R., Wolcott, K., Behrman, H.R., 1992, Effects of neutrophils in rat luteal cells. *Endocrinology* 130, 1001-1008.
- Petrie, A., Watson, P., 2006, *Statistics for veterinary and animal science*, 2 Edition. Blackwell, Oxford.
- Petroff, M., Coggeshall, K.M., Jones, L.S., Pate, J.L., 1997, Bovine luteal cells elicit major histocompatibility complex class II-dependent T-cell proliferation. *Biol Reprod* 57, 887-893.
- Petroff, M.G., Petroff, B.K., Pate, J.L., 1999, Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. *Endocrinology* 140, 1018-1021.
- Petroff, M.G., Petroff, B.K., Pate, J.L., 2001, Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reproduction* 121, 753-760.
- Prakash, B.S., Meyer, H.H., Schallenberger, E., van de Wiel, D.F., 1987, Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J Steroid Biochem* 28, 623-627.
- Radbruch, A., 1992, *Immunofluorescence: Basic considerations*. Springer, Heidelberg.
- Rainard, P., Fromageau, A., Cunha, P., Gilbert, F.B., 2008, Staphylococcus aureus lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Vet Res* 39, 52.
- Redmer, D.A., Reynolds, L.P., 1996, Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod* 1, 182-192.
- Reibiger, I., Spänel-Borowski, K., 2000, Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 118, 243-249.
- Rivest, S., Lee, S., Attardi, B., Rivier, C., 1993, The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 beta alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. *Endocrinology* 133, 2424-2430.
- Robinson, R.S., Fray, M.D., Wathes, D.C., Lamming, G.E., Mann, G.E., 2006, In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol Reprod Dev* 73, 470-474.
- Rohm, F., Spänel-Borowski, K., Eichler, W., Aust, G., 2002, Correlation between expression of selectins and migration of eosinophils into the bovine ovary during the periovulatory period. *Cell Tissue Res* 309, 313-322.
- Rosiansky-Sultan, M., Klipper, E., Spänel-Borowski, K., Meidan, R., 2006, Inverse relationship between nitric oxide synthases and endothelin-1 synthesis in bovine corpus luteum: interactions at the level of luteal endothelial cell. *Endocrinology* 147, 5228-5235.
- Roth, Z., 2008, Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 238-244.
- Rüsse, I., Sinowatz, F., 1998, *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, 2 Edition. Parey, Berlin.
- Sakumoto, R., Berisha, B., Kawate, N., Schams, D., Okuda, K., 2000, Tumor necrosis factor-alpha and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 62, 192-199.
- Sakumoto, R., Okuda, K., 2004, Possible actions of tumor necrosis factor-alpha in ovarian function. *J Reprod Dev* 50, 39-46.

- Schallenberger, E., Schams, D., Bullermann, B., Walters, D.L., 1984, Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *J Reprod Fertil* 71, 493-501.
- Schams, D., Berisha, B., 2004, Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. *Reprod Domest Anim* 39, 241-251.
- Schuberth, H.J., Hadam, M., Leibold, W., 1991, Differentiation and transplantation antigens on the surface of mononuclear cells of cattle, horses and dogs. *Tierarztl Prax* 19, 119-122.
- Schutyser, E., Struyf, S., Menten, P., Lenaerts, J.P., Conings, R., Put, W., Wuyts, A., Proost, P., Van Damme, J., 2000, Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells. *J Immunol* 165, 4470-4477.
- Shaw, D.W., Britt, J.H., 1995, Concentrations of tumor necrosis factor alpha and progesterone within the bovine corpus luteum sampled by continuous-flow microdialysis during luteolysis in vivo. *Biol Reprod* 53, 847-854.
- Sheldon, I.M., Dobson, H., 2004, Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 82-83, 295-306.
- Shirasuna, K., Shimizu, T., Hayashi, K.G., Nagai, K., Matsui, M., Miyamoto, A., 2007, Positive Association, in Local Release, of Luteal Oxytocin with Endothelin 1 and Prostaglandin F2alpha During Spontaneous Luteolysis in the Cow: A Possible Intermediatory Role for Luteolytic Cascade Within the Corpus Luteum. *Biol Reprod*.
- Shirasuna, K., Watanabe, S., Asahi, T., Wijayagunawardane, M.P., Sasahara, K., Jiang, C., Matsui, M., Sasaki, M., Shimizu, T., Davis, J.S., Miyamoto, A., 2008, Prostaglandin F2alpha increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. *Reproduction* 135, 527-539.
- Silva, P.J., Juengel, J.L., Rollyson, M.K., Niswender, G.D., 2000, Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin F(2alpha) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF(2alpha). *Biol Reprod* 63, 1229-1236.
- Skarzynski, D.J., Bah, M.M., Deptula, K.M., Woclawek-Potocka, I., Korzekwa, A., Shibaya, M., Pilawski, W., Okuda, K., 2003, Roles of tumor necrosis factor-alpha of the estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biol Reprod* 69, 1907-1913.
- Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G., Okuda, K., 2008, Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 57-65.
- Skarzynski, D.J., Jaroszewski, J.J., Okuda, K., 2005, Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 29, 340-346.
- Skarzynski, D.J., Okuda, K., 1999, Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin F2alpha is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. *Biol Reprod* 60, 1292-1298.
- Skarzynski, D.J., Woclawek-Potocka, I., Korzekwa, A., Bah, M.M., Piotrowska, K., Barszczewska, B., Okuda, K., 2007, Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biol Reprod* 76, 619-627.
- Song, G., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 2007, Pregnancy and interferon tau regulate RSAD2 and IFIH1 expression in the ovine uterus. *Reproduction* 133, 285-295.

- Spanel-Borowski, K., Rahner, P., Ricken, A., 1997, Immunolocalisation of CD18-positive cells in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 111, 197-205.
- Standaert, F.E., Zamora, C.S., Chew, B.P., 1991, Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. *Am J Reprod Immunol* 25, 163-168.
- Steiger, M., Senn, M., Altreuther, G., Werling, D., Sutter, F., Kreuzer, M., Langhans, W., 1999, Effect of a prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers. *J Anim Sci* 77, 2523-2532.
- Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G., 2007, The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 28, 117-149.
- Stoebel, D.P., Moberg, G.P., 1982, Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 65, 92-96.
- Szukiewicz, D., Klimkiewicz, J., Pyzlak, M., Szewczyk, G., Maslinska, D., 2007, Locally secreted histamine may regulate the development of ovarian follicles by apoptosis. *Inflamm Res* 56 Suppl 1, S33-34.
- Tamura, K., Kogo, H., 1999, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances interleukin-1beta stimulated histamine release in the preovulatory rat ovary. *Eur J Pharmacol* 373, 207-213.
- Taubert, A., Hermosilla, C., 2008, Bovine recombinant IFNgamma induces endothelial cell gene transcription of immunoregulatory molecules and upregulates PMN and PBMC adhesion on bovine endothelial cells. *Vet Res Commun* 32, 35-47.
- Tizard, I.R., 2008, *Veterinary Immunology*, 8 Edition. Elsevier Ltd, Oxford.
- Townson, D., 2006. Immune cell-endothelial cell interactions in the bovine corpus luteum. In: Kong. *Integrative and Comparative Biology*, Orlando, Florida, pp. 1055-1059.
- Townson, D.H., Liptak, A.R., 2003, Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 94.
- Townson, D.H., O'Connor, C.L., Pru, J.K., 2002, Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 66, 361-366.
- Townson, D.H., Pate, J.L., 1996, Mechanism of action of TNF-alpha-stimulated prostaglandin production in cultured bovine luteal cells. *Prostaglandins* 52, 361-373.
- Tsai, S.J., Juengel, J.L., Wiltbank, M.C., 1997, Hormonal regulation of monocyte chemoattractant protein-1 messenger ribonucleic acid expression in corpora lutea. *Endocrinology* 138, 4517-4520.
- Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., 1998, Prostaglandin F2alpha regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 58, 346-352.
- Vogel, B., Klinder, A., Sittig, D., Aust, G., 2005, Bovine eotaxin (CCL11)--an unusual member of the eotaxin group--attracts eosinophils in vitro but is not responsible for eosinophilia in the ovary. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 67-77.
- Walsh, G.M., 1997, Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *Br J Haematol* 97, 701-709.
- Wang, F., Riley, J.C., Behrman, H.R., 1993, Immunosuppressive levels of glucocorticoid block extrauterine luteolysins in the rat. *Biol Reprod* 49, 66-73.
- Widdison, S., Watson, M., Piercy, J., Howard, C., Coffey, T.J., 2008, Granulocyte chemotactic properties of *M. tuberculosis* versus *M. bovis*-infected bovine alveolar macrophages. *Mol Immunol* 45, 740-749.
- Wiltbank, M.C., Shiao, T.F., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1995, Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 52, 74-78.

- Wu, R., Van der Hoek, K.H., Ryan, N.K., Norman, R.J., Robker, R.L., 2004, Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update* 10, 119-133.
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R.M., Gunther, J., Draing, C., von Aulock, S., Schuberth, H.J., Seyfert, H.M., 2008, Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 45, 1385-1397.
- Zeineh, K., Kawano, Y., Fukuda, J., Nasu, K., Narahara, H., Miyakawa, I., 2003, Possible modulators of IL-8 and GRO-alpha production by granulosa cells. *Am J Reprod Immunol* 50, 98-103.
- Zerbe, H., Ossadnik, C., Leibold, W., Schuberth, H.J., 2001, Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils. *Vet Microbiol* 79, 351-365

## **Danksagung**

Ganz besonderes herzlich möchte ich mich bei Herrn Apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Schubert bedanken. Erst durch seine Unterstützung gelang es mir, nach einigen Umwegen, einen roten Faden unter den vielen Forschungsmöglichkeiten zu entdecken und bis zum Ende zu verfolgen. Ohne seine motivierende, immer freundliche und konstruktive Art wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Bollwein danke ich für die Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen auch nach kompletter Neugestaltung meines Dissertationsthemas Mittel und Wege für einen guten Abschluss zu finden. Erst durch die, wie ich finde, sehr gelungene Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe Immunologie und der Klinik für Rinder konnten die Möglichkeiten einer großen Klinik mit dem Grundlagenwissen der Immunologen effektiv verbunden werden.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Akio Miyamoto und seinen Mitarbeitern Kaya Nagai, Dr. Koumei Shirasuna (Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro, Japan) für die Bereitstellung von Probenmaterial für die qRT-PCR bedanken. Des Weiteren gilt Frau Dr. Nicola Beindorff ein herzliches Dankeschön für die Einarbeitung in den Umgang mit Gelbkörpergewebe, die Einführung in die Methodik des EIA und ihren Ideenreichtum in Bezug auf die „Gelbkörperforschung“.

Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Kathrin Langner. Durch Ihre kompromisslose Unterstützung und ihr Engagement weit über das dienstliche Maß hinaus, gelang in kürzester Zeit nicht nur die Etablierung der qRT-PCR in der Immunologie. Auch mein zwischenzeitlich gesunkener Mut, wurde durch ihre tatkräftige Unterstützung bald wieder neu entfacht.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe Immunologie für das jederzeit offene Ohr, ihre immense Geduld und die immer freundliche Art nicht nur beim Lösen von Problemen bedanken. Ich hoffe, dass die hier entstandenen Freundschaften die schönen Zeiten in der Immunologie noch weit überdauern werden! Einem großes Dankeschön auch an Maren Lüdemann-Brockhahn und Anne Jordan, welche durch ihre Freundschaft und unsere „Laufgruppe“ (oder besser: Klatsch-und-Tratsch-ohne-Kaffee-oder-Kuchen-Runde) einen herrlichen, seelischen und körperlichen Ausgleich zu der manchmal etwas zermürenden Doktorarbeit boten.

Meiner Familie und Sven Meyer danke ich für ihr immer währendes Vertrauen und ihre Unterstützung in mich. Allein durch euren Optimismus könnte ich diesen Weg gehen!