

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Plattform Besamung und Embryotransfer

(Leiterin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Christine Aurich Dipl.ECAR)

Heat Shock Protein Expression in Plazenta und Ovarien gravider und nicht gravider Hündinnen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Astrid Bauer

Wien, im April 2022

Betreuerin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Sabine Schäfer-Somi Dipl.ECAR

Department für Kleintiere und Pferde

Plattform Besamung und Embryotransfer

Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Drⁱⁿ med.vet. Priv.-Dozⁱⁿ Christiane Weissenbacher-Lang

Danksagung

Hiermit möchte ich mich zu allererst bei meiner Betreuerin, Frau Ao. Univ. Prof. Dr. med. vet. Sabine Schäfer-Somi für die gute Zusammenarbeit und die überaus nette Betreuung bedanken. Ich konnte stets auch meine eigenen Ideen einbringen und es wurde immer versucht, diese in der Diplomarbeit gut umzusetzen. Weiters ein großes Dankeschön an Herrn Mag. rer.nat. Stefan Kummer. Er war mir im Bereich der Mikroskopie, der bildlichen und statistischen Auswertung eine unglaublich große Hilfe und stand bei allen Fragen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Außerdem möchte ich mich bei „meinen“ Tierärzten bedanken, bei denen ich bereits vor Beginn meines Veterinärstudiums in der Ordination mithelfen durfte und mittlerweile seit Jänner 2020 als studentische Assistentin Teil ihres Teams bin. Ich habe während meiner 6 Jahre Studienzeit bereits sehr viel praktische Erfahrung bei ihnen sammeln dürfen und wurde von beiden stets unterstützt, wann immer ich Hilfe brauchte.

Letztendlich gilt mein größter Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem langen Studienweg begleitet haben. Sie standen mir stets zur Seite, hatten ein offenes Ohr, wann immer ich eines brauchte. Ohne sie hätte mein Studium zu meinem Traumberuf nur halb so viel Spaß gemacht. Ich danke Euch!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Aufbau und Funktion der Plazenta	3
2.2	Aufbau und Funktion der Ovarien	5
2.2.1	Oogenese und Follikulogenese bei der Hündin	5
2.2.2	Endokrinologische Steuerung der Ovarien und Zyklus der Hündin.....	6
2.2.3	Auto – und parakrine Steuerung der Ovarien.....	7
2.3	Verlauf der Gravidität bei Hündinnen.....	9
2.4	Hitzeschockproteine	11
2.4.1	HSP70	12
2.4.2	HSP60 (HSPD1).....	13
2.4.3	Wichtige Funktionen von Hitzeschockproteinen.....	14
3	Tiere, Material und Methodik.....	17
3.1	Tiere und Probengewinnung	17
3.2	Material und Methodik.....	18
3.2.1	Western Blot-Analyse.....	18
3.2.2	Fixierung der Proben	21
3.2.3	Färbung der Proben	22
3.2.4	Durchführung	24
3.3	Mikroskopie und finale Auswertung	27
3.3.1	Mikroskopie	27
3.3.2	Quantitative Auswertung und qualitative Bildbeschreibung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Quantitative Auswertung – HSP70.....	33
4.2	Quantitative Auswertung – Kinase 67.....	35
4.3	Qualitative Auswertung – HSP60 (HSPD1)	37
4.4	Qualitative Auswertung – Caspase 3	41
4.5	Detaillierte, qualitative Bildbeschreibung zur Expression von HSP60 (= HSPD1), HSP70, Kinase 67 und Caspase 3 in den Zellen von Plazenta, Gelbkörper und Follikeln	45
5	Diskussion.....	47
6	Zusammenfassung.....	56
7	Summary	58
8	Abkürzungsverzeichnis.....	60
9	Literaturverzeichnis	61
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	70

11	Anhang	71
-----------	---------------------	-----------

1 Einleitung und Fragestellung

Einleitung

Hitzeschockproteine (= Heat Shock Proteins bzw. HSP) sind Moleküle, die der Gruppe der Chaperone angehören und zahlreiche, meist schützende Aufgaben im Organismus erfüllen, sowie bei physiologischen Stoffwechselprozessen der Körperzellen von Bedeutung sind (Agashe und Hartl 2000, Gething und Sambrook 1992). Kommt es zu einer „Stress-Situation“ der Zelle, ausgelöst durch beispielsweise Hyperthermie, aber auch UV-Strahlung, Schwermetalle, Ischämie, Entzündungen oder Trauma, werden als Reaktion auf die schädliche Einwirkung Hitzeschockproteine im Körper exprimiert. Dies wird auch als „Stress-Antwort“ bezeichnet. So kann eine Denaturierung, sprich eine irreversible Zerstörung, der körpereigenen Proteine und das darauffolgende Absterben von Zellen verhindert werden. Zu den Aufgaben von Hitzeschockproteinen zählen die Bindung von Polypeptiden, die Proteinfaltung neu synthetisierter Proteine, sowie die Stabilisierung fehlerhaft gefalteter Proteine. Außerdem sind sie auch für die Reparatur von Zellschäden zuständig (Agashe und Hartl 2000, Bond und Schlesinger 1987, Lindquist 1986, Lindquist und Craig 1988, Macario 1995).

In der Humanmedizin ist bereits bekannt, dass Hitzeschockproteine während der Gravidität und Geburt an der Regulation der Autophagie beteiligt sind. Dies geschieht vermutlich über die Regulierung von Apoptose und Proliferation (Witkin et al. 2017).

In dieser Diplomarbeit soll daher die Koexpression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 im Gewebe von Ovarien und Plazenta gravider und nicht gravider Hündinnen untersucht werden. Die Faktoren Kinase 67 und Caspase 3 werden in dieser Studie dabei ebenfalls beurteilt. Die Gruppe der Caspasen gehört zur Familie der Cysteinproteasen und beeinflusst über intrinsische und extrinsische Wege die Apoptose, den programmierten, teils reversiblen, Zelltod, von Zellen (Degterev et al. 2003). Kinase 67 ist ein Non Histone Protein und wird wiederum mit der Proliferation von Zellen in Verbindung gebracht, wobei die genaue Funktion dieses Proteins bisher nicht geklärt ist (Inwald et al. 2013, Klopffleisch et al. 2011). Es werden Gewebeproben aus Plazenta und Ovarien entnommen, speziell immunhistochemisch angefärbt und als histologische Präparate anschließend unter dem Mikroskop beurteilt und fotografiert. Schlussendlich erfolgt eine statistische Auswertung der positiv angefärbten und negativen Zellen.

Ziele und Hypothesen

Aktuell gibt es in der Veterinärmedizin kaum vergleichbare Studien zur Expression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 im Gewebe von Ovarien und Plazenta im Verlauf der Gravidität tragender Hündinnen. Ebenso gibt es in der internationalen Literatur keine vergleichbaren Studien über die Faktoren Kinase 67 und Caspase 3 im Zusammenhang mit der Gravidität bei Hündinnen. Da aber bereits in einer Vorstudie die Expression von HSP70 im Trophoblasten entdeckt wurde (Schäfer-Somi et al. 2020), sowie HSP60 und 70 bereits im Blutserum frühgravider Hündinnen nachgewiesen werden konnten (Schäfer-Somi et al. 2019), ist das Ziel dieser Diplomarbeit, herauszufinden, in welchen Gewebeabschnitten und in welcher Intensivität die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 in Ovarien und Plazenta tragender Hündinnen exprimiert werden. Außerdem soll die Untersuchung der Faktoren Kinase 67 und Caspase 3 Auskunft über das Ausmaß lokaler Apoptose und Proliferation geben. Für diese Pilotstudie wurden daher 18 vorberichtlich gesunde Hündinnen im Alter von ein bis drei Jahren, sowohl in der Frühgravidität, als auch Graviditätsmitte, sowie Graviditätsende herangezogen. Gesamt stehen neun Proben gravider Hündinnen zur Verfügung. Vergleichend dazu gibt es neun Tiere, die keine Trächtigkeit aufweisen. Mithilfe neuer Erkenntnisse dieser Studie sollen in Zukunft genauere Aussagen über die Expression von Hitzeschockproteinen in Plazenta und Ovarien gravider Hündinnen getroffen werden können.

Die Hypothese dieser Studie lautet, dass HSP60 und HSP70 im Verlauf der Frühgravidität, Graviditätsmitte und am Graviditätsende im Plazenta- und Ovargewebe gravider Hündinnen spezifisch und anders als bei nicht-tragenden Hündinnen exprimiert werden und Kinase 67 und Caspase 3 an der lokalen Apoptose und Proliferation beteiligt sind. Letzteres kann nur im Falle einer eventuellen Koexpression vermutet werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Funktion der Plazenta

Die Plazenta, oder auch Mutterkuchen genannt, stellt als natürliche Barriere die Verbindung zwischen Fetus und Muttertier dar (Schnorr und Kressin 2011). Sie dient als Schutz gegen schädliche Einwirkungen von außen. Neben ihrer Schutzfunktion, erfüllt die Plazenta außerdem metabolische Funktionen. So spielt die Plazenta eine zentrale Rolle beim Austausch von Gasen und transportiert wichtige Nährstoffe (Mineralstoffe, Glucose, freie Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine) zum Fetus. Stoffwechselendprodukte hingegen werden in das mütterliche Blut abgegeben und über die Nieren des Muttertieres ausgeschieden. Weiters kann die Plazenta Hormone bilden und besitzt immunologische Funktionen, indem mütterliche Antikörper auf die ungeborenen Jungtiere übertragen werden können (Aralla et al. 2013, Furukawa et al. 2014, Schnorr und Kressin 2011). Die Plazenta besteht aus zwei Teilen. Einerseits aus der Placenta fetalis, die vom tertiären Chorion des Trophoblasten gebildet wird und andererseits aus der Placenta materna, die sich aus dem mütterlichen Endometrium entwickelt. Je nach Tierart, werden unterschiedliche Plazentatypen differenziert. Bei Hündinnen wird eine Placenta endotheliochorialis ausgebildet. Dabei wird das mütterliche Uterusepithel gänzlich abgebaut, sodass das Chorionepithel des Trophoblasten direkt an das Endothel der mütterlichen Kapillaren anschließt (Enders und Carter 2012). Durch den Gewebeab- und -umbau des mütterlichen Epithels besteht eine starke Verbindung zwischen Placenta fetalis und materna. Bei der Geburt werden diese umstrukturierten Uterusbestandteile (= Decidua) abgestoßen und die Gebärmutterschleimhaut kann sich in der Erholungsphase (= Puerperium) regenerieren (Schnorr und Kressin 2011). Ab Tag 20 der Trächtigkeit entwickeln sich Lamellen, wobei sich fetales und mütterliches Gewebe zunehmend ineinander verzahnt. Makroskopisch betrachtet ordnen sich diese Lamellen gürtelförmig um das Chorion an, weshalb man anatomisch von einer Placenta zonaria, beziehungsweise Gürtelplazenta spricht (Furukawa et al. 2014, Miglino et al. 2006). Bei diesen Lamellen handelt es sich um Chorionprotusionen, die in das Epithel des Uterus vordringen (Schnorr und Kressin 2011). Die eigentliche Gürtelplazenta kann in voller Entwicklung histologisch, wie in Abb. 1 ersichtlich, in mehrere Schichten unterteilt werden. Die innerste Schicht, in der fetales und mütterliches Gewebe eng miteinander verzahnt sind, wird als Plazentalabyrinth oder plazentares Lamellensystem bezeichnet (Aralla et al. 2013). Es folgt eine Schicht mit großen Drüsenkammern. Diese Drüsenkammern entwickeln sich aus der darunterliegenden Drüsendeckschicht und können beim Hund sehr groß sein. Die äußerste Schicht bildet das Myometrium des Uterus. Da es sich beim Hund wie bereits angeführt um

eine Placenta endotheliochorialis handelt, liegt kein Uterusepithel vor. Stattdessen wird dieses durch eine tiefe Drüsenschicht ersetzt (Schnorr und Kressin 2011). Seitlich der Gürtelplazenta befindet sich die Paraplazenta. In diesem Bereich liegen die Extravasate, die ab dem 18. Tag der Trächtigkeit histologisch als Randhämatome erkennbar sind (Miglino et al. 2006). Bei diesen Randhämatomen handelt es sich um Blutungen, die durch die Zerstörung mütterlicher Gefäße entstehen. Dabei wird das Chorion vom Uterusepithel abgehoben und das Blut kann in die Uteruskrypten und Drüsentubuli vordringen. Beim Hund sind diese Randhämatome während der gesamten Gravidität ausgebildet, wobei sich das Blut im Laufe der Trächtigkeit mittels Phagozytose der Chorionzotten zurückbildet und schlussendlich makroskopisch nur mehr ein „grüner Saum“ zu sehen ist (Schnorr und Kressin 2011).

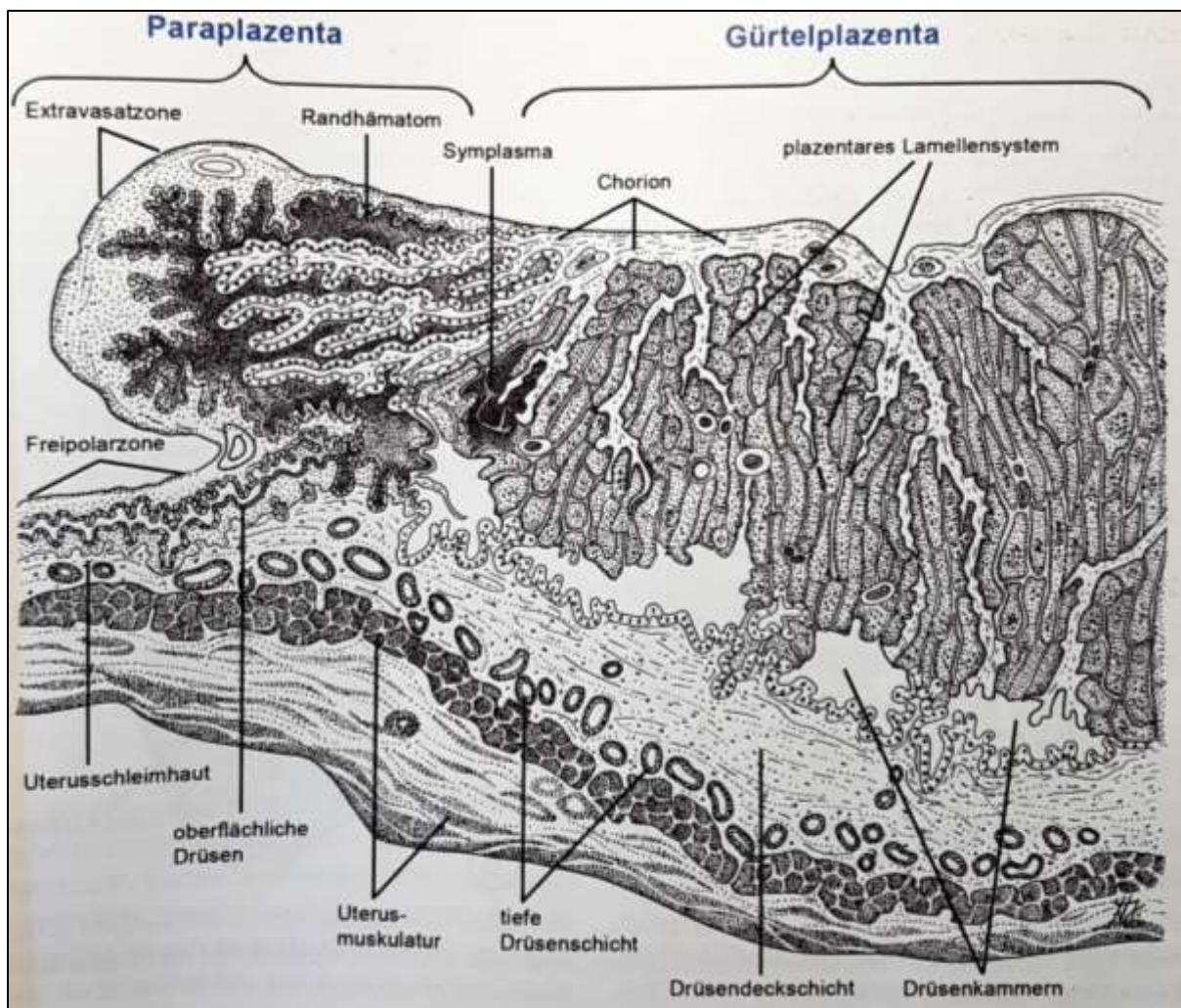


Abb. 1 Plazenta des Hundes im fortgeschrittenen Stadium

Vergrößerung 15x (Schnorr und Kressin 2011)

2.2 Aufbau und Funktion der Ovarien

Die Ovarien, bzw. Eierstöcke, der Haussäugetiere stellen die weiblichen Keimdrüsen dar, die Hormone produzieren und somit die Funktionalität der weiblichen Geschlechtsorgane sicherstellen. Die Hauptaufgaben der Ovarien sind zum einen die Oogenese, also die Anlage und Reifung von Eizellen. Andererseits werden am Ovar Follikel ausgebildet, bestehend aus Granulosa- und Thekazellen, welche die eigentliche Eizelle (= Oozyste) schützend umgeben. Man bezeichnet diesen Prozess auch als Follikulogenese (Porrás-Gómez und Moreno-Mendoza 2017, Zuckermann 1951).

2.2.1 Oogenese und Follikulogenese bei der Hündin

Die Oozyste, umgeben von Granulosazellen, wird als Primordialfollikel bezeichnet, die Oozysten in den Primordialfollikeln wiederum als Primordialoozysten (Eppig und O'Brien 1996). Die Anlage der weiblichen Keimdrüsen findet bei Hündinnen am 36. Tag der Gravidität statt (Meyers-Wallen et al. 1991, Pretzer 2008), die Oogenese und Entwicklung von Primordialfollikeln zwei bis drei Wochen nach der Geburt (Andersen und Simpson 1974, Peters und McNatty 1981). Bei der Hündin werden ca. 100.000 Primordialfollikel angelegt, wobei sich einige dieser bereits im Welpenalter weiterentwickeln und die meisten Primordialfollikel aber vorerst über Monate oder Jahre hinweg in diesem Stadium ruhend gestellt sind (Durrant et al. 1998, Lintern-Moore und Moore 1979, Songsasen et al. 2009). Die ersten Primordialfollikel werden, wie bereits erwähnt, im Welpenalter aktiviert. Dies geschieht ungefähr mit sechs Wochen (Zlotnik 1994). Dabei transformieren die flachen Granulosazellen zu einer kubischen Form und die Oozyste nimmt ungefähr das Doppelte an ihrer Ursprungsgröße zu, von anfänglichen 10-26 µm Durchmesser auf 10-62 µm (der Durchschnitt beträgt 31 µm). Dieses Stadium wird als Primärfollikel bezeichnet (Durrant et al. 1998, Songsasen et al. 2009, Zlotnik 1994). Mit der stetigen Proliferation von Granulosazellen bildet sich aus dem Primärfollikel der Sekundärfollikel aus. In dieser Phase differenzieren sich außerdem die Thekazellen aus interstitiellen Stromazellen und umschließen die Granulosazellen. Die Eizelle wächst weiter an und weist bereits einen durchschnittlichen Durchmesser von 60,5 µm (35-88 µm) auf. Im sekundären Stadium des Follikels wird von der Oozyste bereits eine Glykoproteinmembran ausgebildet, die Zona pellucida (van den Hurk und Zhao 2005). Sie stellt eine schützende Barriere um die Eizelle dar. Füllt sich der Follikel zunehmend mit Flüssigkeit, so charakterisiert dies das tertiäre Stadium. Die Granulosazellen proliferieren weiter und die Eizelle nimmt weiter an Größe zu (Songsasen et al. 2009). Der Durchmesser eines Tertiärfollikels beträgt bereits mehr als 0,4 mm im Durchmesser (Reynaud et al. 2012) (Abb. 2). Alle diese Follikelformen befinden sich in der Rinde des Ovars und sind zwischen dem 120. und 160. Tag nach der Geburt

in Hündinnen nachweisbar. Schlussendlich reift der Tertiärfollikel bis kurz vor dem Proöstrus der jungen Hündin zum sogenannten Graaf'schen Follikel heran und ist mittlerweile 5-7 mm groß (Andersen und Simpson 1974, Durrant et al. 1998, England und Allen 1989, Reynaud et al. 2012, Wildt et al. 1977). Es kommt zur Ovulation und Freisetzung der Eizelle (Abb. 3). Entgegen anderer Säugetiere, erfolgt die endgültige Reifung der Eizelle bei der Hündin zwei bis drei Tage nach der Ovulation im Eileiter (= Tuba uterina) (Chastant-Maillard et al. 2011).

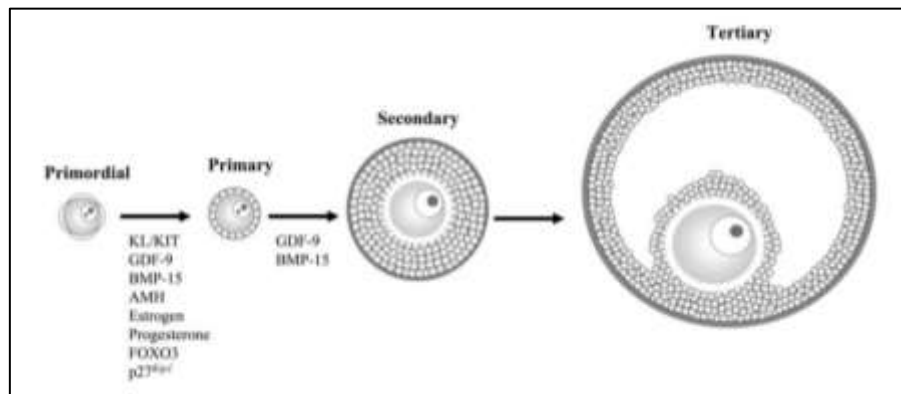


Abb. 2 Entwicklungsstadien der Follikel in Ovarien der Säugetiere (Moniruzzaman und Miyano 2010)

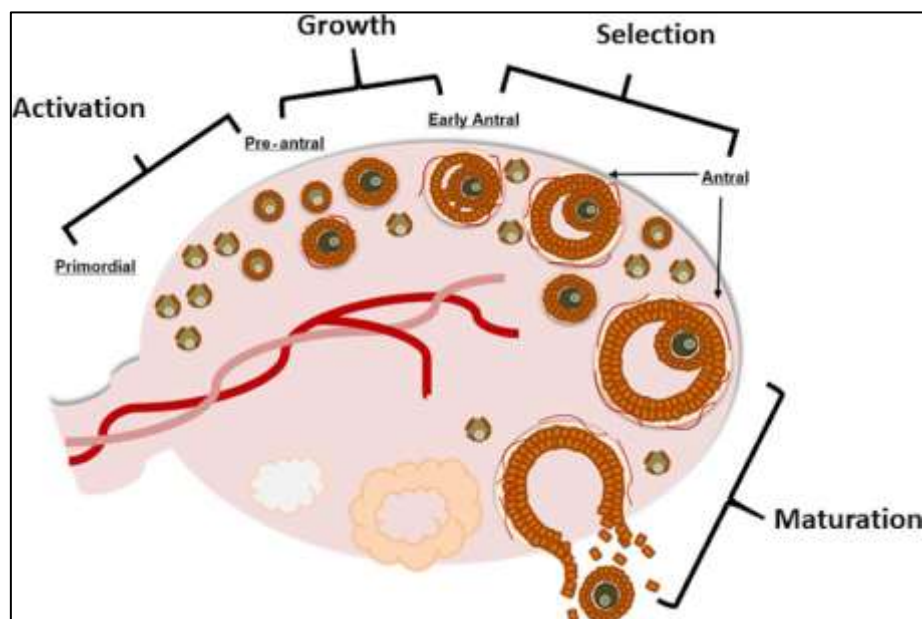


Abb. 3 Follikulogenese und Ovulation bei Säugetieren (Songsasen und Nagashima 2020)

2.2.2 Endokrinologische Steuerung der Ovarien und Zyklus der Hündin

Der Sexualzyklus der Hündin wird wie bei vielen anderen Tierarten ebenfalls über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse reguliert. Bei der Hündin liegt ein monoöstrischer, asaisonaler Zyklus vor, der in fünf Phasen, den Präproöstrus (bzw. Ende des Anöstrus), den Proöstrus, den Östrus, den Metöstrus und den Anöstrus unterteilt werden kann. Ein Zyklus dauert gesamt fünf bis zwölf Monate, wobei die anöstrische Phase mit drei bis zehn Monaten

am längsten ist (Concannon et al. 1999, Concannon 2009, Wildt et al. 1979). Kurz vor Beginn des Proöstrus wird vom Hypothalamus das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) sezerniert. Dieses beeinflusst wiederum den Hypophysenvorderlappen und es erfolgt die Freisetzung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) (Concannon 2009). FSH und LH wirken nach Bindung an die spezifischen Rezeptoren direkt am Ovar und fördern die Heranreifeung von angelegten Primordialfollikeln zu ovulationsreifen, dominanten Graaf'schen Follikeln. Es kommt zu einem Anstieg von Östradiol im Proöstrus und schließlich zum LH-Peak, welcher 48-60 Stunden später im Östrus eine spontane Ovulation auslöst (Concannon 2011, England et al. 2009). Im Östrus wird bereits während des LH-Peaks Progesteron ausgeschüttet. Kommt es zu keiner Befruchtung der ovulierten Oozyte, so bleibt die Progesteronkonzentration trotzdem 55-75 Tage lang erhöht, wobei die Höchstkonzentrationswerte zwischen 15-85 ng/ml liegen. Diese Phase des Zyklus wird als Metöstrus, beziehungsweise Scheinträchtigkeit, bezeichnet. Im Anöstrus sinkt die Progesteronkonzentration wieder ab und der nächste Sexualzyklus kann von vorne beginnen (Concannon 2009).

2.2.3 Auto – und parakrine Steuerung der Ovarien

Neben einer neuroendokrinen Steuerung der Ovarien sollen außerdem auch auto- und parakrine Faktoren Einfluss auf die Funktion der Eierstöcke haben. So spielt vor allem das Anti-Müller Hormon (AMH) eine wesentliche Rolle bei der Beeinflussung des Sexualzyklus bei der Hündin. AMH wird in den Granulosazellen der Follikel exprimiert und soll die Aktivierung von Primordialfollikeln unterdrücken (Durlinger et al. 2002, Josso 2019, Poole et al. 2016). Außerdem reguliert AMH die Effekte von FSH und nimmt damit indirekt Einfluss auf das Follikelwachstum (Durlinger et al. 2002). Bei adulten, intakten Hündinnen kann AMH im Blut serologisch nachgewiesen werden, bei jungen, präpubertären und kastrierten Tieren jedoch nicht (Place et al. 2011). Circa eine Woche vor dem LH-Peak kann ein deutlicher Anstieg von AMH bei der Hündin verzeichnet werden (Nagashima et al. 2016). Die Werte bleiben während des Östrus deutlich erhöht, im Laufe des Metöstrus und Anöstrus sinken diese wieder auf den Basalwert ab (Karakas Alkan et al. 2019, Nagashima et al. 2016).

Ebenfalls soll auch der Insulin-like growth factor (IGF) Einfluss auf die Funktion der Ovarien bei Hündinnen nehmen. In der Humanmedizin konnte bereits nachgewiesen werden, dass IGF-II reproduktive Abläufe reguliert, während der Faktor IGF-II bei Wiederkäuern und Nagetieren die Follikulogenese beeinflusst. Beide Faktoren stimulieren die Proliferation von Granulosazellen und fördern die Sensitivität der Follikel gegenüber FSH (Silva et al. 2009,

Sirotkin 2011). Bei der Hündin ist die Wirkung von IGF zwar noch nicht erwiesen, allerdings zeigte sich, dass IGF-I mit der Körpergröße der Hündin und somit der Größe präovulatorischer Follikel positiv korrelierte (Reynaud et al. 2010).

Die Gruppe der Fibroblast growth Faktoren gehört zu den Heparin-bindenden Peptiden. Sie sind ebenfalls an der Regulierung der Ovarfunktion bei Säugetieren beteiligt (Chaves, R. N. et al. 2012). Bei der Hündin spielen der Fibroblast growth Faktor II und VII eine Rolle. FGF-II ist in den Oozysten und den Granulosazellen in allen Phasen des Sexualzyklus, ausgenommen Anöstrus, lokalisiert (Songsasen et al. 2009). FGF-VII konnte ebenfalls in den Granulosazellen der Primärfollikel, sowie in den Granulosa- und Thekazellen der Sekundärfollikel nachgewiesen werden. Da FGF-VII in den Ovarien präpubertärer Hündinnen nicht nachweisbar ist, sehr wohl aber während des Proöstrus und Östrus läufiger Hündinnen, lässt sich daraus schließen, dass FGF an der Follikulogenese als beeinflussender Faktor beteiligt ist (Chaves, R. N. et al. 2012, Songsasen et al. 2009, Songsasen und Nagashima 2020).

Auch Wachstumshormone und Insulin regulieren die Follikulogenese zahlreicher Säugetiere indirekt mit (van den Hurk und Zhao 2005). In den Ovarien von Schafen (Eckery et al. 1997), Kühen (Kölle et al. 1998) oder Ratten (Zhao et al. 2002) konnten bereits Wachstumshormone nachgewiesen werden, Insulinrezeptoren finden sich unter anderem an den Follikeln von Menschen (Samoto et al. 1993) oder Ziegen (Chaves, R. et al. 2012). Beide Faktoren führen dazu, dass FSH sensibler auf eine Stimulation des Gonadotropin Releasing Hormons (GnRH) reagiert (Chaves, R. et al. 2012). Bei der Hündin konnte in vitro festgestellt werden, dass Wachstumshormone und Insulin Sekundärfollikel beeinflussen. Dabei garantieren beide Faktoren einerseits das Überleben der Sekundärfollikel und stimulieren andererseits das Wachstum selbiger nach 18 Tagen (Serafim et al. 2013, Serafim et al. 2015).

Activin ist ein dimeres Polypeptid, das ebenfalls mit der Follikulogenese in Zusammenhang steht (Bloise et al. 2019). Studien haben gezeigt, dass Activin die Entwicklung von Oozysten in der Prophase der Meiose beschleunigt. In der Maus konnte eine Expressierung von Activin A aus Follikeln nachgewiesen werden (Bloise et al. 2019). Activin A stimuliert somit die Proliferation von Granulosazellen und beeinflusst ebenso das Follikelwachstum. Eine in vitro Studie von Songsasen und Nagashima (2020) zeigte, dass Activin A synergetisch mit FSH korreliert, um das Follikelwachstum zu fördern. Weiters unterstützt Activin A das in vitro Wachstum von Oozysten, indem es die Kommunikation zwischen Keimzellen und somatischen Zellen aufrechterhält (Nagashima et al. 2019).

2.3 Verlauf der Gravidität bei Hündinnen

Wird die Oozyste nach ihrer Reifung im Eileiter befruchtet, so entwickelt sich im distalen Eileiter aus dem Morulastadium eine Blastozyste, die zwischen Tag zehn und zwölf nach dem LH-Peak weiter in den Uterus der Hündin abwandert. Vorerst „schwimmt“ diese Blastozyste frei im Lumen der beiden Uterushörner und wird von Endometriumssdrüsen mit Nährstoffen versorgt. Diese Drüsen entwickeln sich aufgrund des starken Progesteronanstiegs in der frühen Trächtigkeit, wobei Progesteron ausschließlich vom Gelbkörper der Hündin gebildet wird (Concannon et al. 1989, Concannon et al. 2001). Achtzehn bis zwanzig Tage nach dem LH-Peak nähert sich die Blastozyste dem Endometrium an, während die Uterindrüsen eine tubuläre Form annehmen, immer stärker anschwellen und vermehrt Sekret produzieren. Mit dem 21. Tag nach dem LH-Peak ist die Implantation abgeschlossen. Mit der endgültigen Implantation haben sich außerdem bereits extramaternale Strukturen, wie Allantois, Amnion und Dottersack entwickelt (Aralla et al. 2013, Concannon et al. 2001, Concannon 2011, Verstegen-Onclin und Verstegen 2008). Während einerseits die Implantation des Zytotrophoblasten erfolgt, entwickelt sich gleichzeitig zwischen Tag 20 und 22 nach dem LH-Peak die Plazenta fetalis aus dem Trophoblasten und die Plazenta maternalis aus dem Endometrium, die zusammen das plazentare Lamellensystem ausbilden. Aufgrund ihrer Verzahnungsstruktur und ihrem Verhalten bei der Geburt handelt es sich bei der Hündin, wie auch bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, um eine deziduate Gürtelplazenta (Aralla et al. 2013, Schnorr und Kressin 2011, Wimsatt 1975). Durch Zellteilung und Zellproliferation entwickelt sich aus dem zelligen Zytotrophoblasten der Synzytiotrophoblast, der ersteren umgibt. Auch die Blutgefäßversorgung nimmt stetig zu. Als erster möglicher Trächtigkeitsnachweis gilt das Hormon Relaxin im Blutserum einer trächtigen Hündin. Es ist plazentären Ursprungs und wird vom Synzytiotrophoblasten sezerniert und in den maternalen Blutkreislauf abgegeben. Relaxin kann zwischen dem 21. und 24. Tag nach dem LH-Peak nachgewiesen werden, da hier die Plazenta fertig entwickelt ist (Aralla et al. 2013, Klonisch et al. 1999, Tsutsui und Stewart 1991). Im Ultraschall können bereits erste Amnionblasen in der Frühträchtigkeit um Tag 20 herum sichtbar sein. Allerdings werden diese häufig von Gas im Darm der Hündin verdeckt. Daher ist eine sichere Trächtigkeitsdiagnose mittels Ultraschalles frühestens ab Tag 25 möglich (Concannon et al. 1989, England und Allen 1990, Yeager et al. 1992). Ab diesem Zeitpunkt lassen sich Blutgefäße, die ausgehend vom Nabelstrang den Dottersack und den Plazentagürtel versorgen, sonographisch darstellen. Ebenfalls ist die Gürtelplazenta mit ihren Randhämatomen erkennbar und auch der heranwachsende Fetus und die zugehörigen Fruchthüllen sind im Ultraschall sichtbar (Miglino et al. 2006). Im Verlauf der postimplantatorischen Phase nimmt der Embryo immer mehr an

Größe zu, der Durchmesser der Fruchtblase wächst stetig und auch die Durchblutung und Gefäßeinsprossung wird vermehrt gefördert (Abb. 4). Palpatorisch können bei der Hündin ab der vierten Trächtigkeitswoche die ampullenartigen Fruchtkammern erfasst werden (Aralla et al. 2013, Baumgartner 2014, Miglino et al. 2006). Erste Herzaktionen des Fetus können im Ultraschall zwischen Tag 23-28 registriert werden, Bewegungen des Fetus um den 35. Tag der Trächtigkeit (Concannon et al. 1989, England und Allen 1990, Yeager et al. 1992). Achtundfünfzig Tage nach dem LH – Peak sind alle Knochen des Fetus mineralisiert, wobei erste knöcherne Strukturen bereits ab dem 44. Trächtigkeitstag sichtbar sein können (Concannon et al. 1989, Concannon und Rendano 1983, Lopate 2008, Toal et al. 1986). Schlussendlich dauert die Trächtigkeit einer Hündin 65 ± 1 Tage nach dem LH-Peak, bis schließlich die ersten Wehen der Hündin auftreten und folglich die Geburt einleiten (Concannon 2011).

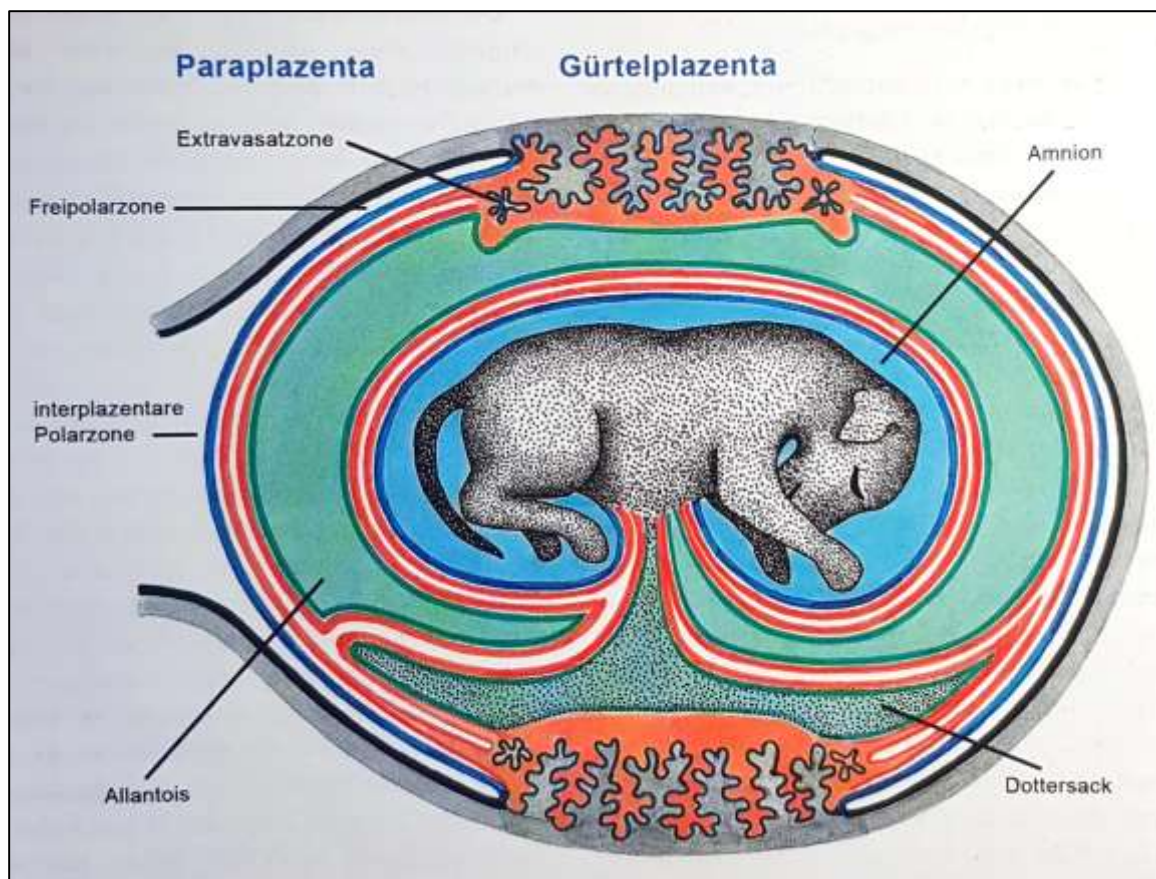


Abb. 4 Schematische Darstellung vollständig entwickelter Fruchthüllen mit umliegender Gürtelplazenta (Schnorr und Kressin 2011)

2.4 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine, oder auch Stressproteine genannt, sind ubiquitär vorkommende, hoch konservierte Proteine. Sie lassen sich in den Zellen aller Organismen, sowohl Eukaryoten, als auch Prokaryoten, finden (Whitley et al. 1999). Hitzeschockproteine konnten erstmals von Ritossa (1962) als chromosomale Auftreibungen in den Speicheldrüsen von Fruchtfliegen nachgewiesen werden. Sie erfüllen einerseits physiologische Stoffwechselprozesse im Körper und schützen andererseits körpereigene Zellen vor schädlichen Einflüssen aller Art, wie beispielsweise Hyperthermie, UV-Strahlung, Schwermetallen, Ischämie, Entzündungen oder Traumata (Agashe und Hartl 2000, Gething und Sambrook 1992). Diese schädlichen Einwirkungen verursachen „Stress“ bei den körpereigenen Zellen und können zu einer Denaturierung und Fehlfaltung der körpereigenen Proteine führen. Um diesen Prozess zu verhindern, werden vermehrt Hitzeschockproteine exprimiert. Diese können einerseits Proteine vor einer Fehlfaltung und Denaturierung schützen, aber andererseits auch bei der Reparatur denaturierter Proteine helfen. Zu weiteren Aufgaben der Hitzeschockproteine zählen unter anderem die Bindung von Polypeptiden, die Proteinfaltung neu synthetisierter Proteine, sowie die Stabilisierung fehlerhaft gefalteter Proteine, oder die Eliminierung fehlgefalteter Proteine (Agashe und Hartl 2000, Bond und Schlesinger 1987, Lindquist 1986, Lindquist und Craig 1988, Macario 1995, Whitley et al. 1999) (Abb. 5). Aufgrund ihrer Funktionen im Körper gehören sie zu der Gruppe der molekularen Chaperone (Schlesinger 1990).

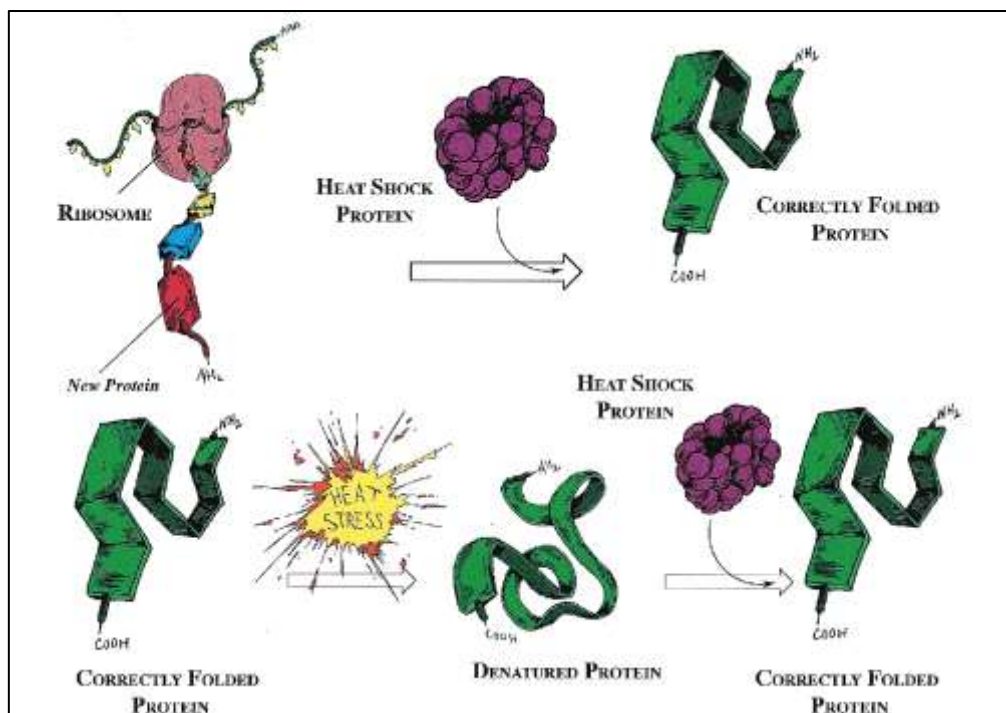


Abb. 5 Bildliche Darstellung der Funktionen von Hitzeschockproteinen (Whitley et al. 1999)

Hitzeschockproteine können bei Säugetieren in zwei Gruppen eingeteilt werden. Je nach Molekulargewicht und Größe (8-150 kDa) differenziert man zwischen hochmolekularen und niedermolekularen Hitzeschockproteinen. Erstere umfasst drei große HSP Familien: HSP60, HSP70 und HSP90. Alle drei Familien sind ATP-abhängige Chaperone und benötigen Ko-Chaperone, um ihre Konformation und ihre ATP-Bindung modulieren zu können. Niedermolekulare Hitzeschockproteine hingegen wirken ATP-unabhängig (Parcellier et al. 2003, Whitley et al. 1999).

Die Regulation und Expression von Hitzeschockproteinen erfolgt über die spezifischen Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSF1, HSF2, HSF3 und HSF4. Je nachdem, welche Art von „Schock“ vorliegt, werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktiviert (Neudegger et al. 2016). Sie liegen im Nukleus und dem Zytoplasma der Zellen in monomerer Form vor und werden erst bei einer notwendigen „Stressantwort“ aktiviert. Kommt es nun beispielsweise zu einer Erhöhung der Körpertemperatur um 3-5° C, so bilden diese Hitzeschockfaktoren Oligomere aus. Diese strukturelle Änderung hat zur Folge, dass die Hitzeschockfaktoren nun als Transkriptionsfaktoren dienen und damit spezifisch an die sogenannten Heat Shock Element-Promotorregionen binden können. Dies führt zu einer verstärkten Transkriptionsrate für HSP-Gene und folglich zu einer vermehrten Expression von Hitzeschockproteinen (Morimoto 1991).

2.4.1 HSP70

Die HSP70 Familie ist der häufigste und meistuntersuchte Vertreter aller Hitzeschockproteine. Die HSP70 Familie besteht aus neun Mitgliedern, die in verschiedenen Regionen der Zelle lokalisiert sind und sich in der Anordnung ihrer Sequenzen unterscheiden. Drei davon finden sich intrazellulär im Nukleus, den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum. Je nach äußerlichen Bedingungen, werden einzelne Mitglieder der HSP70 Familie stärker synthetisiert (Deshaies et al. 1988). HSP70 vermeiden vor allem die Aggregation von Proteinen und erleichtern die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine, indem sie hydrophobe Proteinanteile binden. Bereits denaturierte Proteine werden mit Hilfe der HSP70 lysosomal degradiert. Außerdem schützen sie die Haut und den Körper vor oxidativem Stress oder Hitzestress (Fracella und Rensing 1995, Zettervall S. et al. 2017). Mittlerweile ist auch bekannt, dass Proteine mit Hilfe von Hitzeschockproteinen von einer in die andere Zellorganelle transportiert werden können, unter anderem in das Endoplasmatische Retikulum, die Lysosomen oder in die Chloroplasten. Dabei werden die einzelnen Polypeptide entfaltet, durch die Membranpore in die Zellorganelle transportiert und anschließend erneut korrekt gefaltet

(Cheng et al. 1990, Chiang et al. 1989, Chirico et al. 1988). In Prokaryoten wurden bis dato drei Arten der HSP70 Familie entdeckt: DnaK, HscA und HscC. Die HSP70 Familie beim Eukaryoten besteht aus drei Bauelementen, (a) der N-terminal ATPase, (b) der Domäne, welche die Substrate bindet und (c) dem C-terminal Stück. Sie lassen sich in fast allen zellulären Kompartimenten nachweisen. Dazu zählen Nukleus, Mitochondrien, Chloroplasten, Endoplasmatisches Retikulum und Zytoplasma (Boorstein et al. 1994, Zettervall S. et al. 2017). Wie bereits beschrieben, zählt die HSP70 Familie zu den hochmolekularen Hitzeschockproteinen, weshalb sie in ATP-gebundener Form vorliegen und abhängig von ATP exprimiert werden. In Körperzellen, die einer Stresssituation ausgesetzt werden, kommt HSP70 meist im Nukleus und Nukleolus in ungelöster Form vor. Unter ATP-Einfluss wird HSP70 gelöst und aktiviert. Die Interaktion zwischen HSP70 und Peptiden jeglicher Art ist entscheidend und wichtig für die Regulierung der physiologischen Zellaktivität (Zettervall S. et al. 2017).

2.4.2 HSP60 (HSPD1)

Das Hitzeschockprotein 60 ist ein Chaperon, das zur Gruppe 1, genannt HSPD1, der molekularen Chaperone gehört. Wie auch die HSP70 Familie, reguliert und unterstützt HSP60 die korrekte Faltung von Proteinen und schützt diese vor Denaturierung (Cappello et al. 2008, Macario und Conway de Macario 2005). Allerdings wird im Artikel von Hemmingsen et al. (1988) beschrieben, dass HSP60 eher an der Faltung und Entwicklung von Polypeptiden beteiligt ist, während die HSP70 Familie oftmals den Abbau und die Entfaltung von beispielsweise bereits denaturierten Proteinen übernimmt. HSP60 ist in Eukaryonten hauptsächlich in den Mitochondrien angesiedelt, findet sich aber auch in allen anderen intrazellulären Strukturen. Je nach Lokalisation erfüllt HSP60 unterschiedliche Aufgaben, so unterstützt es beispielsweise das korrekte Falten und den Weitertransport von Proteinen in den Mitochondrien. Im Zytoplasma wiederum kann HSP60 die Apoptose von Zellen begünstigen oder in tumorösen Zellen pro- beziehungsweise anti-kanzerogen wirken (Campanella et al. 2014, Gammazza et al. 2017). Wie auch bei HSP70, ist die Aktivierung von HSP60 ATP-abhängig (Parcellier et al. 2003). Im Unterschied zu HSP70, kann HSP60 zusätzlich mit dem niedermolekularen Ko-Chaperon HSP10 strukturell verbunden sein. HSP60 ist ein Monomer und bildet ohne HSP10 einen stabilen, tetradecamären Doppelring aus (Enriquez et al. 2017). Mit HSP10 entsteht ein symmetrischer Doppelring, wobei HSP10 wie eine Kappe auf dem HSP60 aufsitzt und sowohl die Interaktion mehrerer HSP60 Monomere untereinander, sowie die ATP-Hydrolyse reguliert (Dubaquíé et al. 1997, Richardson et al. 1998, Vilasi et al. 2014).

Ein HSP60 besteht aus drei Strukturen. Zum einen die apikale Domäne, welche sowohl die Substrate, als auch HSP10 bindet und am ATP-Umsatz beteiligt ist. Die äquatoriale Domäne, die die Kommunikation der einzelnen Untereinheiten innerhalb des HSP60 Chaperons aufrechterhält und die intermediäre Domäne, die das Verbindungsstück zwischen apikaler und äquatorialer Ebene darstellt. Abhängig von Temperatur, Protein-Konzentration und HSP10-Anwesenheit kann HSP60 sowohl als Tetradecamer (Doppelring), Heptamer (Einzelring) oder Monomer vorliegen (Braig et al. 1994, Ishida et al. 2018, Levy-Rimler et al. 2001).

2.4.3 Wichtige Funktionen von Hitzeschockproteinen

Die erste entdeckte Aufgabe, die Hitzeschockproteinen zugeschrieben wurde, ist die Thermotoleranz. Diese Funktion wurde erstmalig von Lindquist (1986) beschrieben. Diesem Phänomen verdanken die Hitzeschockproteine auch ihren bis heute bekannten Namen. Unter Thermotoleranz versteht man die zunehmende Resistenz von Körperzellen gegen Hitzebelastung. Werden Zellen einer milden Hitzebelastung ausgesetzt, so adaptieren sie sich zunehmend an die neue Situation und entwickeln Resistenzen gegen Hitze. Steigt nun der Hitzestress auf eine sonst tödliche Temperatur an, so ist es Körperzellen mit Hilfe von Hitzeschockproteinen trotzdem möglich, solch einer Belastung Stand zu halten. Dabei zeigte sich, dass die Menge an aktivierten Hitzeschockproteinen und die damit verbundene, gesteigerte Thermotoleranz positiv korrelierte (Bosch et al. 1988, Mizzen und Welch 1988, Schlesinger 1990, Welch und Mizzen 1988).

Hitzeschockproteine spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort auf schädliche Toxine oder eine Infektion. Auf Grund der guten Strukturhaltung zahlreicher Hitzeschockproteine könnte man meinen, das Immunsystem würde Toleranzen gegen diese Polypeptide ausbilden. Allerdings ist genau das Gegenteil der Fall. Zahlreiche Immunglobuline und zytotoxische T-Lymphozyten sind auf die Erkennung und Eliminierung von HSP-relatierten Peptiden spezialisiert (Kaufmann 1990, Young 1990). Mögliche Ursache hierfür könnte eine Hitzeschock-Reaktion des befallenen Wirtsorganismus sein. Dabei lösen schädliche Mikroorganismen einen „Stress“ der betroffenen Wirtszellen aus und steigern die Aktivität und Expression von Hitzeschockproteinen. Werden die infizierten und geschädigten Zellen mit Hilfe der Immunantwort eliminiert, so kann eine weitere Ausbreitung der Infektion effektiv verhindert werden. Es besteht daher die Annahme, dass eine gesteigerte Sensibilisierung und Fokussierung des Immunsystems auf HSP-Antigene zu einer schnelleren und sichereren Immunantwort des Körpers auf schädliche Mikroorganismen führt, sowie einer besseren Immunüberwachung körpereigener Zellen dient. Allerdings kann nicht

ausgeschlossen werden, dass auch Autoimmunreaktionen auf HSP-Antigene entstehen können (Schlesinger 1990).

Erhöhter oxidativer Stress konnte bei mehreren Krankheiten, wie beispielsweise Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen, festgestellt werden. Dabei haben einige Studien gezeigt, dass Hitzeschockproteine schützende Mechanismen gegen Oxidation ausbilden können. Dies geschieht durch eine Zunahme der Zellresistenz gegen oxidativen Stress, während der Serumspiegel an Hydroxylradikalen und Eisen abnimmt. Dies führt zu einer geringeren Menge an oxidierten Proteinen. „Kleine“ Hitzeschockproteinen, wie beispielsweise HSP27, haben die Möglichkeit, die Anzahl an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu reduzieren und regulieren darüber hinaus den intrazellulären Redox-Schutz zellulärer Zytoskelette (Melinda E. Toth et al. 2015).

Mittlerweile konnten Zusammenhänge zwischen Hitzeschockproteinen und Apoptose hergestellt werden. Als Apoptose bezeichnet man den genetisch programmierten, teils reversiblen Zelltod. Dieser Vorgang ist physiologischer Bestandteil eines Zellorganismus und regelt die Eliminierung geschädigter oder funktionsloser Körperzellen. Apoptose ist ein wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung, bei der Aufrechterhaltung der Homöostase oder der Regulierung von Zellaktivität durch Hormone und Wachstumsfaktoren (Melinda E. Toth et al. 2015). Allerdings kann Apoptose auch fehlindiziert sein. In diesem Zusammenhang werden ebenfalls Hitzeschockproteine exprimiert. Eine Überexpression der Hitzeschockproteine HSP27, HSP60, HSP70 und HSP90 führt zu einer Unterdrückung der Caspase 3-Aktivierung in zahlreichen, verschiedenen zellulären Organismen, wenn eine „Stresssituation“ der Zelle vorliegt (Garrido et al. 2006, Mosser et al. 2000, Mosser und Morimoto 2004). Caspasen gehören zur Familie der Cysteinproteasen und gelten als wesentlicher Stimulator zur Aktivierung des programmierten, physiologischen Zelltodes, indem sie über intrinsische und extrinsische Wege die Apoptose regulieren (Degterev et al. 2003). HSP70 beispielsweise interagiert mit Lysosomen. Dadurch werden die lysosomalen Membranen stabilisiert und damit eine Membranpermeabilität verhindert. Es kommt daher zu keiner Ausschüttung von pro-apoptotischen Faktoren, was wiederum den programmierten Zelltod unterdrückt (Nylandsted et al. 2004). Wie die Gruppe der Caspasen, können auch die Hitzeschockproteine über intrinsische und extrinsische Wege die Apoptose beeinflussen. Dies kann auf drei Ebenen passieren: (a) es werden die Signalwege zur Proteinbildung bereits moduliert und abgeändert, bevor diese in den Mitochondrien verarbeitet werden, (b) es erfolgt eine Kontrolle, ob Gene für Apoptose in den Mitochondrien kodiert und freigesetzt werden und

(c) die Apoptose wird geblockt, indem die Hitzeschockproteine eine Aktivierung von Caspasen verhindern (Gurbuxani et al. 2001, Nylandsted et al. 2000). Im umgekehrten Sinne führt eine vorübergehende Erschöpfung und ein Aufbrauchen des Vorrates an Hitzeschockproteinen zu einer Erhöhung der Sensibilität der Körperzellen gegenüber apoptotischen Stimuli und beeinflusst außerdem die Aktivierung von Caspase 3 (Aghdassi et al. 2007, Choi et al. 2007, Compton et al. 2006, Kamada et al. 2007).

3 Tiere, Material und Methodik

3.1 Tiere und Probengewinnung

Für diese Diplomarbeit wurden von 18 vorberichtlich gesunden Hündinnen Plazenta-, Uterus-, sowie Ovarproben entnommen, wobei in dieser Diplomarbeit die Expression von HSP60 und HSP70 und das Ausmaß von lokaler Apoptose und Proliferation (Caspase 3 und Kinase 67) nur von Proben der Plazenta und der Ovarien untersucht wurden. Bei den Hündinnen dieser Studie handelte es sich um 13 Mischlinge, ein King Charles Spaniel, ein Terrier, eine Französische Bulldogge, ein Yorkshire Terrier, wobei das durchschnittliche Alter 32 ± 26 Monate betrug und das durchschnittliche Gewicht bei 17 ± 6 Kilogramm lag (Abb. 6 und 7). Bei einer der 18 Hündinnen waren Rasse, Alter und Gewicht unbekannt.

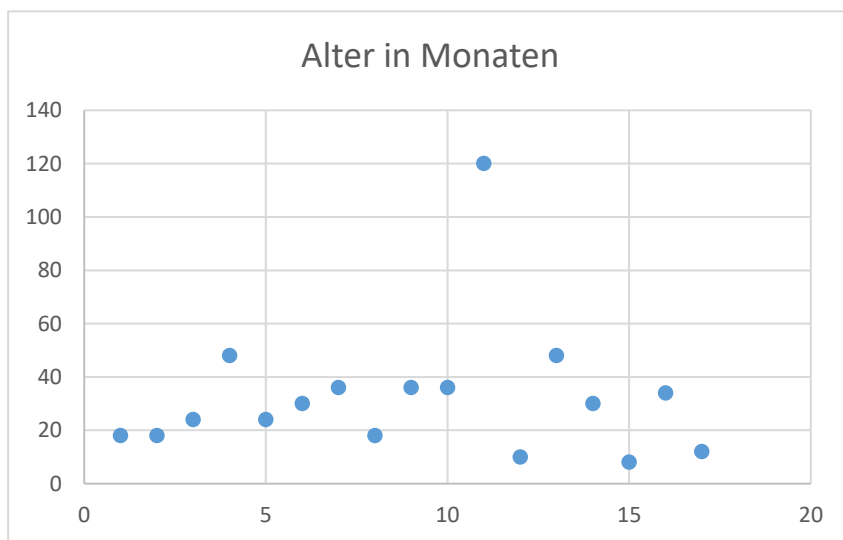


Abb. 6 Graphische Darstellung des Alters der beprobten Hündinnen

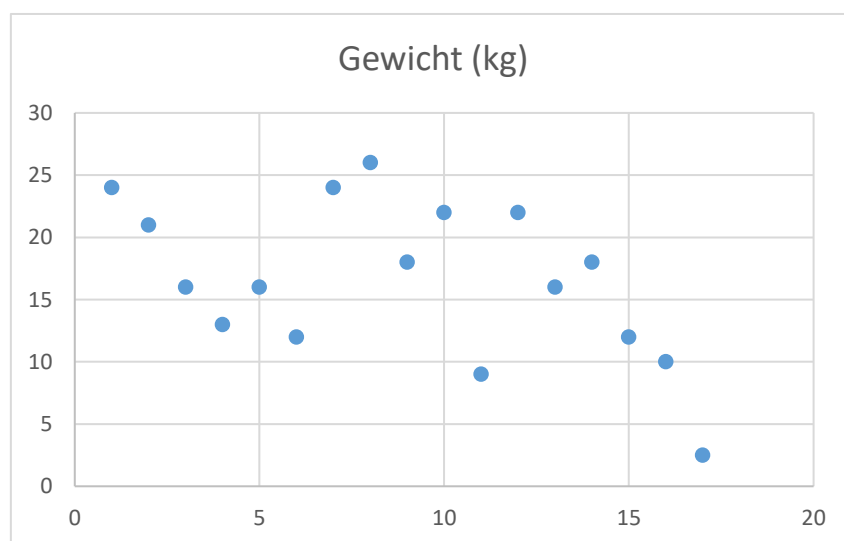


Abb. 7 Graphische Darstellung des Gewichts der beprobten Hündinnen

Insgesamt lagen 51 Proben vor. Die Gewebeproben von 16 der 18 Hündinnen wurden dabei im Zuge eines Kastrationsprojekts (Local ethics committee for animal experiments of Ondokuz Mayıs University, Turkey. Approval number 2020/57) in der Türkei entnommen und in Kooperation mit der Plattform für Besamung und Embryotransfer der Veterinärmedizinischen Universität Wien für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt. Die 16 Tiere waren vorberichtlich gesund und wurden aus Kontrazeptionsgründen in Vollnarkose kastriert. Bei sonographisch nicht graviden Tieren, bei denen eine Bedeckung nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde anschließend an die Kastration eine Gravidität mittels Embryoflush ausgeschlossen.

Bei den anderen zwei der 18 Hündinnen erfolgte die Probenentnahme (elf Proben) durch Ao. Univ.-Prof. Dr.med.vet. Sabine Schäfer-Somi direkt an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, aufgrund eines erfolgten Kaiserschnittes mit anschließender Ovariohysterektomie. Es handelte sich um eine zwei Jahre zehn Monate alte Französische Bulldogge und eine ein Jahr alte Yorkshire Terrier Hündin.

Die Probengewinnung erfolgte bei allen 18 Hündinnen gemäß des gleichen Protokolls. Hierfür wurden von jedem Tier zum Zeitpunkt der Operation drei bis vier Serumröhrchen Blut abgenommen. Das Gewebsmaterial umfasste eine 2x2 cm große Probe aus der Plazenta sowie aus dem Uterus (Interplazentationsstelle). Weiters wurde jeweils ein Stück Gewebeprobe aus der Hornspitze- und -mitte sowie dem Corpus des Uterus und den Ovarien entnommen.

3.2 Material und Methodik

3.2.1 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse wurde am Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie und Embryologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, wie von Hlavaty et al. (2016) beschrieben, gemäß Standardprotokoll durchgeführt.

Leber- und Nierengewebe von Hunden, die für eine Biopsie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorstellig waren (Bioptate), wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und direkt im Anschluss zerkleinert, um Proteindegradation zu vermeiden. Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die Proben in kleine Stücke geschnitten und mit einem Dounce-Homogenisator in RIPA lysis Puffer homogenisiert (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,5 % Natriumdeoxycholat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) 1 % Nonidet P-40 (Igepal, Sigma Aldrich, Wien, A), 0,1 % Natriumdodecylsulfat (Serva) und SDS lysis Puffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 50 mM DTT (Carl Roth GmbH), 2 % SDS (Merck, Wien, A), 10 % Glycerol (Serva, Heidelberg, D), zu beiden wurden 1 % (v/v) Protease und Phosphataseinhibitor

(Protease-Inhibitor Cocktail und Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3, beide Sigma Aldrich, Wien, A) supplementiert.

Die Lysate wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann gevortext. Um die DNA zu zerkleinern, wurden die Homogenisate mehrere Male durch eine 20G Nadel gedrückt und danach bei 10.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Zusätzlich zu den Gewebekomogenisaten wurden Zelllysate von humanen, embryonalen Nierenzellen vorbereitet (HEK293). Der flüssige Überstand wurde bei -80° C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem DC™ Protein Assay (Bio-Rad, Wien, A) gemäß der Anleitung des Herstellers gemessen. Die Proteinextrakte (20 µg Protein je Zeile) wurden auf 10 % Polyacrylamid-Minigels separiert und auf PVDF Membranen übertragen (GE Healthcare, Tiefenbach, A). Um unspezifische Bindung zu vermeiden, wurden die Membranen mit Western Blocking Reagent (Roche, Wien, A; 1:10 in TBST) für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt und anschließend über Nacht bei +4° C mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST Lösung (5x8 min bei Raumtemperatur), wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Primärantikörper wurde ein rabbit polyclonal anti-mouse HSP60 (chaperonin) AK (ABIN1498529; dil. 1:400 und 1:500) und ein rabbit polyclonal anti-mouse HSP70 AK (ABIN361707, dil. 1:600) verwendet. Der Amersham ECL-anti-rabbit IgG peroxidase-linked species-specific Antikörper eines Esels (GE Healthcare, Tiefenbach, A; cat. # NA934; dil. 1:5000) fungierte als Sekundärantikörper. Alle Antikörper wurden in Western Blocking Reagent (Roche, Wien, A) / TBST (1:10) verdünnt. Die Signale konnten mit Amersham Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Tiefenbach, A) und dem BioRad ChemiDoc Image System mit der Image Lab Software (Bio-Rad, Wien, A) sichtbar gemacht werden. Beide verwendeten Primärantikörper ergaben mit den Kontrollproben deutlich sichtbare Banden in den erwarteten kDa Bereichen (Abb. 8 und 9).

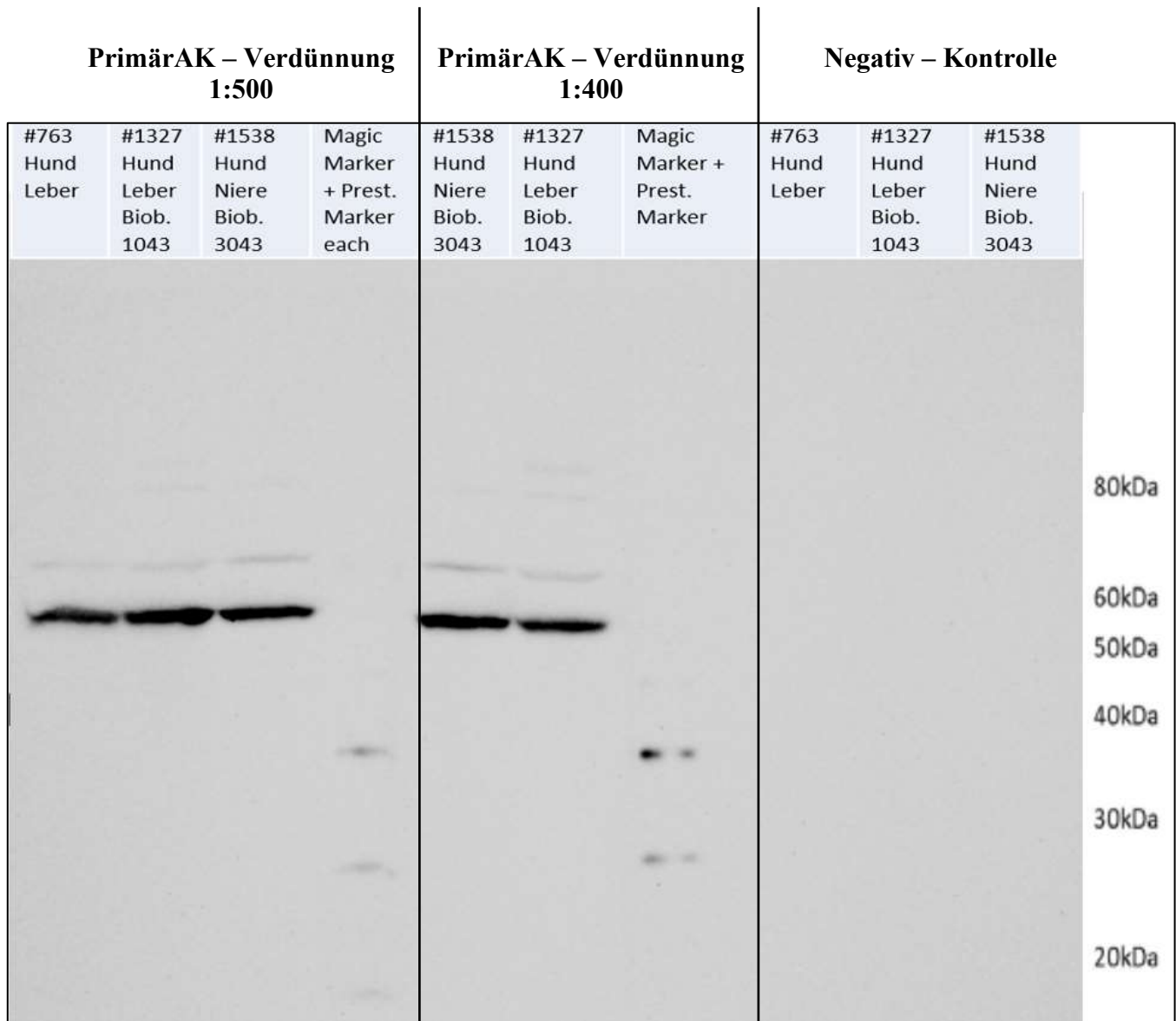


Abb. 8 Western Blot - Analyse (HSP 60)

Analyse mit homogenisierten Lysaten von Biopтатаen aus Hundelebern und -nieren. Die Negativkontrolle wurde ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Banden auf Höhe der 60 kDa sind deutlich zu erkennen. Der Magic Marker bindet den Primärantikörper, detektiert diesen und macht ihn sichtbar. Prest. Marker = Prestained Marker (= vorgefärbter Marker, der ohne weitere Anfärbung visualisiert) AK = Antikörper, Biob = Biopstat, HSP = Heat Shock Protein

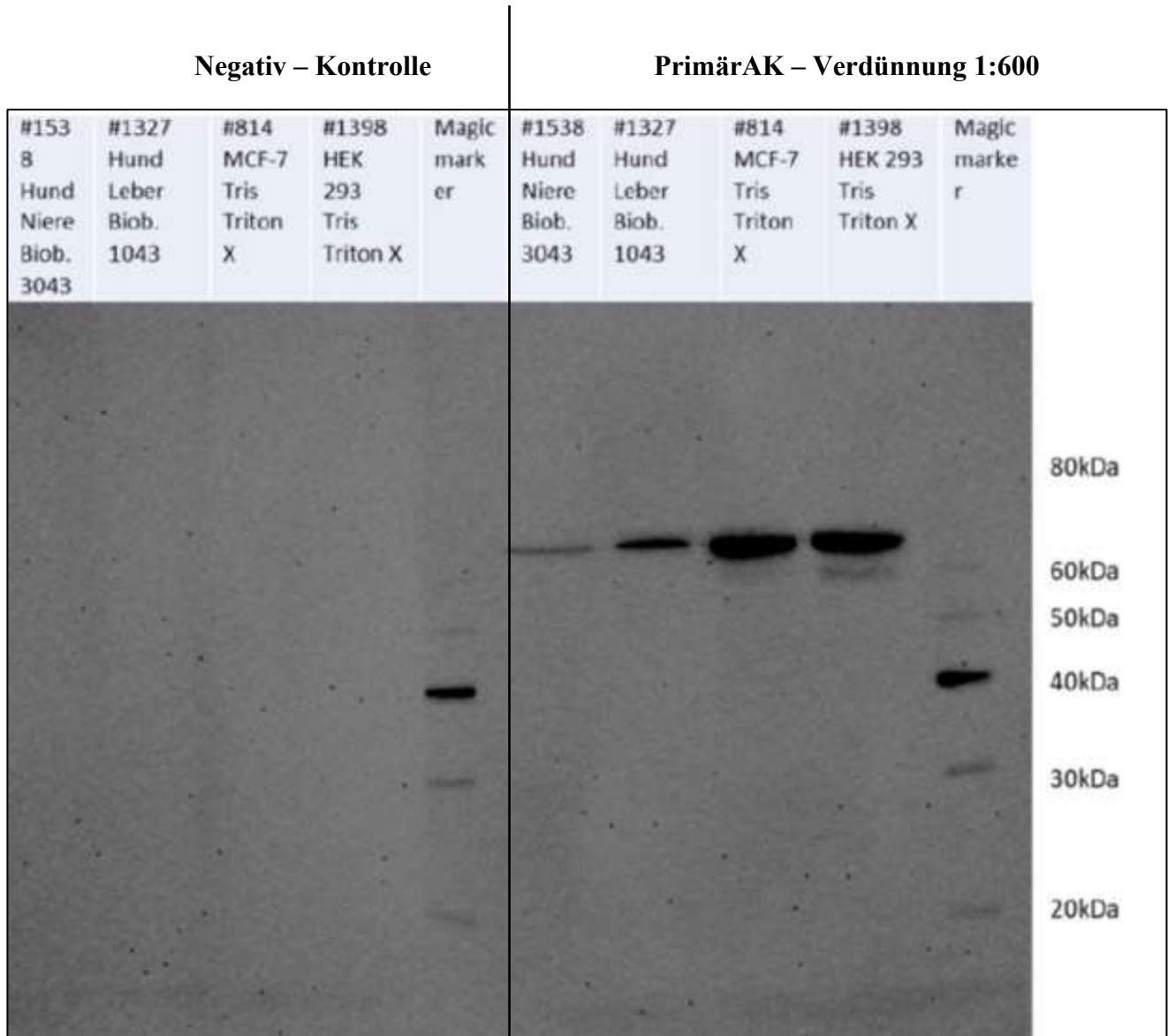


Abb. 9 Western Blot Analyse (HSP 70)

Analyse mit homogenisierten Lysaten von Biopaten aus Hundelebern und -nieren, zusätzlich wurden Homogenisate von Zellkulturen verwendet (MCF-7 = Michigan Cancer Foundation, Brustkrebs-Zelllinie; HEK 293 = human embryonal kidney cells). Die Negativkontrolle wurde ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Banden auf Höhe der 70 kDa sind deutlich zu erkennen. Der Magic Marker bindet den Primärantikörper, detektiert diesen und macht ihn sichtbar. AK = Antikörper, Biob = Biopat, HSP = Heat Shock Protein

3.2.2 Fixierung der Proben

Direkt im Anschluss an die Probengewinnung wurde das Gewebe in vorbereitete Gefäße mit 20 ml 4 % gepuffertem Formalin fixiert, nach 48 h in 70 % Ethanol umgelagert und nach maximal 14 Tagen in Paraffin eingebettet. Im Anschluss wurden die Gewebeproben im Rotationsmikrotom 2 µm fein geschnitten und auf Objektträgern aufgetragen.

3.2.3 Färbung der Proben

Die Färbung der entnommenen Uterus-, Plazenta-, und Ovarproben erfolgte gemäß standardisiertem Protokoll am Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien.

Die Paraffinschnitte wurden nach erfolgter Fixierung immunhistochemisch angefärbt. Diese Färbung wurde auf Basis des HRP-Detektionssystems durchgeführt. Generell werden mit der Immunhistochemie bestimmte Proteine in einem Gewebeschnitt mittels Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar. Dabei bindet ein Primärantikörper an ein Antigen im Gewebe. Anschließend wird ein Sekundärantikörper, der mit einem Markerenzym (= HRP) konjugiert ist, an den Primärantikörper gebunden. Mit dem Detektionssystem Diaminobenzidin werden die Proteine durch eine bräunliche Färbung sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt mit Hämalaun (Abb. 10).

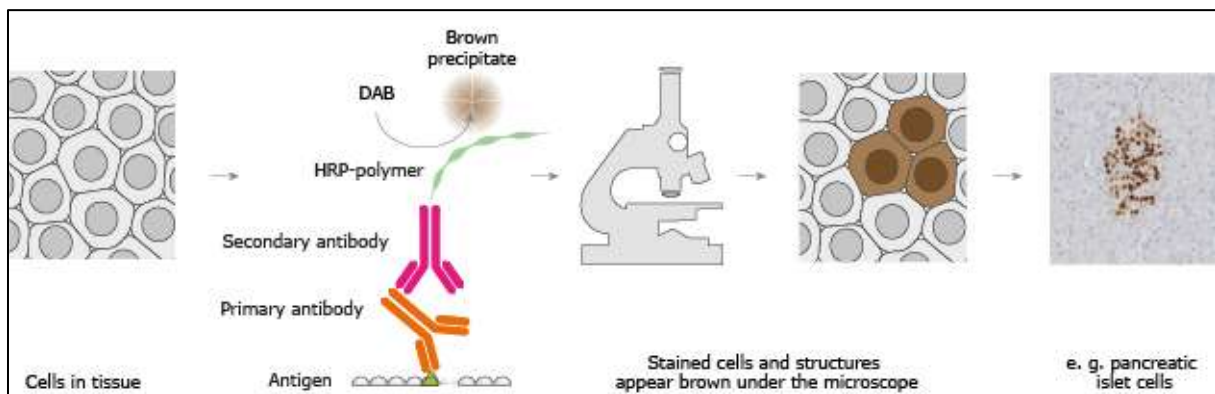


Abb. 10 Immunhistochemische Färbemethode

Bei jeder Färbung wurden zusätzlich zwei Positivkontrollen (Gewebe mit bekannter Antigenkonzentration) und eine Negativkontrolle (nur das Verdünnungsmedium des Primärantikörpers) verwendet.¹

Materialien:

- **Aqua fontis (Leitungswasser)**
- **Aqua dest. (Destilliertes Wasser)**
- **Xylol PHQ (Pharmaqualität)**, Anstaltsapotheke (Brenntag Austria, SAP-Nummer 1927) gebrauchsfertig, gesundheitsschädlich, darf nur mit Nitrithandschuhen und unter dem Abzug verwendet werden

¹ Vgl. Standardarbeitsanweisung SOP-M-10.01 S.2-4, Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie & Embryologie, Vetmeduni Vienna

- **Ethanol**

99,8 % Ethanol vergällt mit 1 % Methylethylketon, (Carl Roth, Kat. Nr.: K928,4)

96 % Ethanol Prima unvollständig vergällt, Anstaltsapotheke (Australco, keine Katalognummer verfügbar), gebrauchsfertig

70 % Ethanol selbst gemacht 700 ml 96 % Ethanol Prima unvollständig vergällt plus 300 ml WEK-Wasser

- **Methanol 99,5 % Ph. Eur. reinst** (Carl Roth, Kat. Nr.: CP43,4) gebrauchsfertig, giftig, darf nur mit Nitrithandschuhen und unter dem Abzug verwendet werden
- **30 % Wasserstoffperoxid** (Merck, Kat. Nr.: 1.07209.1000), Gebrauchsfertig
- **0,01 M Citratpuffer pH 6,0, selbstgemacht**
2,1 g Citronensäure Monohydrat ACS (Merck, Kat. Nr.: 1.00244.1000) in 900 ml WEK-Wasser lösen, mit 13 ml 2M Natronlauge auf pH 6,0 einstellen, mit WEK-Wasser auf 1000 ml auffüllen, Aufbewahrung bei 4° C
- **Tris-EDTA Puffer pH 9,0, selbstgemacht** 1,21 g Tris Base (Sigma Aldrich, Kat. Nr.: T1378-500G), 0,37 g EDTA 99 % (Carl Roth, Kat. Nr.: X986.1), in 900 ml WEK-Wasser lösen, pH-Wert sollte bei 9,0 liegen, wenn nicht dann wenige Tropfen 2M Natronlauge zugeben, mit WEK-Wasser auf 1000 ml auffüllen
- **2M Natronlauge, selbstgemacht**, 80 ml WEK-Wasser mit 20 ml 32 % Natronlauge (Carl Roth, T197) mischen, Aufbewahrung in einer Plastikflasche bei RT
- **Natronlauge 32 % reinst.** (Carl Roth, T197)
- **10x PBS selbstgemacht**, 90 g Natriumchlorid 99,5 % (Carl Roth, Kat. Nr.: 3957.1), 2,8 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat 98 % (Carl Roth, Kat. Nr.: K300.2), 11,4 g Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei 99 % (Carl Roth, Kat. Nr.: P030.1), in 1000 ml WEK-Wasser lösen, pH-Wert überprüfen, Aufbewahrung bei RT
- **1x PBS, selbstgemacht**, 100 ml 10x PBS, selbstgemacht, 900 ml WEK-Wasser, Aufbewahrung bei 4° C
- **DAB-Lösung, DAB Quanto** (Thermo Scientific, Kat. Nr: TA-125-QHDX), nach Gebrauchsanweisung arbeiten: 1 ml DAB Quanto Substrate (Kat. Nr.: TA-125-QHSX), 1 Tropfen DAB Quanto Chromogen, kurz mischen und 100 µl pro Schnitt auftropfen, bei 4° C eine Woche haltbar, DAB ist kanzerogen, nur mit Nitrithandschuhen bearbeiten
- **Hämalaun nach Mayer, selbstgemacht** (nach Romeis), 2 g Hämatoxilin (Carl Roth, Kat. Nr.: 38162) in 2000 ml WEK-Wasser unter Rühren und leichtem erwärmen mischen, 400 mg Natriumiodat 99 % (Carl Roth, Kat. Nr.: HN17.2) und 100 g Aluminiumkaliumsulfat (Merck, Kat. Nr.: 1.01047.1000) zugeben, Farbumschlag zu

blauviolett, 100 g Chloralhydrat 99,5 % (Carl Roth, K318.1, giftig, unter dem Abzug arbeiten mit Nitrithandschuhen) zugeben, 2 g Citronensäure Monohydrat ACS (Merck, Kat.Nr.:1.00244.1000) zugeben, Farbumschlag zu rotviolett, in eine dunkle Glasflasche füllen, bei RT aufbewahren

- **DPX Mountant for histology, gebrauchsfertig** (Sigma, Aldrich, Kat. Nr.: 06522-500ML)
- **Deckgläser 24x50 mm Stärke 1** (Menzel, Kat. Nr.: BB024050M1), nur für Eindeckautomaten CTM
- **Deckgläser 24x32 mm Stärke 1** (VWR, Kat. Nr.: 631-1572)
- **Primärantikörper**
- **Sekundärantikörper²**

Zusätzlich für die HSP60 (HSPD1) Färbung:

- Primärantikörper: Monoclonal Mouse-anti-HSPD1 (HSP60) [Clone 3A2] (AntikörperOnline.de, Kat. Nr.: ABIN1498529)
- Sekundärantikörper: BrightVision Poly-HRP-anti-Mouse, gebrauchsfertig (Immunologic, Kat. Nr.: DPVM110HRP)
- 100 % Normal Goat Serum (Sigma Aldrich, G9023-5ML), in 500 µl Portionen aliquotieren und bei -20° C lagern, angebrochene Aliquots bei 4° C lagern und nicht wieder einfrieren
- 1,5 % Normal Goat Serum, selbstgemacht, 150 µl 100 % Normal Goat Serum, 10 ml 1xPBS, selbstgemacht, Aufbewahrung bei 4° C³
- Positivkontrollen von Leber und Niere
- Negativkontrolle von der Leber

3.2.4 Durchführung

Die Präparate wurden, gemäß der SOP-M-10.01, vom Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, hergestellt und zur Verfügung gestellt. Dafür wurden die Paraffinschnitte mit der Blocknummer, dem Datum der

² Vgl. Standardarbeitsanweisung SOP-M-10.01, Anhang 1: Chemikalien und Reagenzien S.1-3, Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie & Embryologie, Vetmeduni Vienna

³ Vgl. Standardarbeitsanweisung SOP-M-10.01, Anhang 1: Chemikalien und Reagenzien S.1-3, , Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie & Embryologie, Vetmeduni Vienna

Färbung und mit dem Namen des Antikörpers beschriftet. Die Positivkontrollen und die Negativkontrolle mussten ebenfalls richtig gekennzeichnet (+/-) sein.

Im ersten Arbeitsschritt wurden die Präparate entparaffiniert. Dafür wurden die Objektträger in einen Objektträgerhalter einsortiert und im Immunhistologie-Labor der Veterinärmedizinischen Universität inkubiert:

Zuerst zweimal jeweils acht Minuten in Xylol, um das Paraffin zu lösen. Anschließend 2x3 Minuten in 100 % Ethanol, 1x3 Minuten in 96 % Ethanol und 1x3 Minuten in 70 % Ethanol. Die Präparate verblieben solange in 70 %igem Ethanol, bis der nächste Arbeitsschritt eingeleitet werden konnte.

Im Anschluss an die Entparaffinierung folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen. Dieser Schritt diente der Anfärbung aller Zellen mittels Diaminobenzidin (= DAB) und nicht nur der Zielzellen.

Zum Blockieren verwendete man 400 ml Methanol+10 ml H_2O_2 + 90 ml Aqua dest.

Die Schnitte wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger zehnmal mit Aqua fontis gespült und verblieben darin bis zum nächsten Schritt.

Im nächsten Schritt, der Antigendemaskierung, wurden die bei der Fixierung entstandenen Proteinvernetzungen wieder gelockert und aufgebrochen, um dem Primärantikörper eine Bindung an die freigelegten Epitope zu ermöglichen. Dies wurde mittels HIER (Heat Induced Epitope Retrieval) Technik durchgeführt. Dafür kamen die Paraffinschnitte in einen Dampfgerar mit 85° C und verblieben dort 30 Minuten in Tris-EDTA pH 9,0. Durch die Erhitzung in einem Puffer erfolgte die Demaskierung.

Schlussendlich mussten die Schnitte auf Raumtemperatur abkühlen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte 2x5 Minuten in 1xPBS pH 7,4 gewaschen, um den physiologischen pH-Wert der Schnitte wiederherzustellen, damit der Antikörper auch binden und die Färbung wirken konnte.

Mittels Proteinblocking wurden nun die Schnitte den 1xPBS pH 7,4 Küvetten entnommen und PBS-Reste abgeklopft. Das Gewebe auf den Objektträgern wurde mit einem Pap-Pen umrandet, um eine Flüssigkeitsbarriere zu schaffen. Gleich im Anschluss wurde auf den Schnitt das Proteinblocking-Reagenz aufgetropft, um ein Austrocknen des Schnittes zu verhindern. Das hierfür verwendete Reagenz, 1,5 % Normal Goat Serum in PBS (150 µl Goat Serum in 10 ml PBS), wurde auf jeden Objektträger aufgetropft und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Das verwendete Proteinblock-Reagenz richtete sich nach der Spezies in welcher der

Sekundärantikörper hergestellt wurde, sollte aber nicht der Spezies ähneln, an der das Epitop nachgewiesen werden sollte. Beispielsweise wurde beim BrightVision Poly-HRP-anti-mouse Antikörper (in der Ziege produziert) 1,5 % Normal Goat Serum in PBS verwendet. Für BrightVision Poly-HRP-anti-goat Antikörper (im Hasen produziert) wurde 1,5 % Normal Rabbit Serum in PBS verwendet. Dieser Schritt war wichtig, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu vermeiden. Demnach wurden nur die Zielzellen gefärbt.

Danach erfolgte die Zugabe von Primär- und Sekundärantikörpern. Dafür wurde der Primärantikörper in 1xPBS pH 7,4 verdünnt, überschüssiges Serum vom Objektträger entfernt und 100 µl vom Primärantikörper aufgetragen. Bei der parallellaufenden Negativkontrolle wurde kein Primärantikörper dem 1xPBS pH 7,4 beigemengt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C inkubiert.

Am Tag darauf wurde die Primärantikörper/PBS Lösung durch vorsichtiges Abklopfen entfernt und erneut 2x5 Minuten mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen, um restliche, nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper richtete sich nach der Spezies in welcher der Primärantikörper produziert wurde. Es können drei Polymere, die mit HRP konjugiert sind, verwendet werden:

- BrightVision Poly-HRP-anti-mouse (in der Ziege produziert), verwendet bei der Färbung von HSP60
- BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit (in der Ziege produziert)
- BrightVision Poly-HRP-anti-goat (im Hasen produziert)

Danach wurden 100 µl vom unverdünnten Sekundärantikörper auf jeden einzelnen Schnitt aufgetragen und anschließend für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Wie auch schon beim Primärantikörper angeführt, wurde nun auch der Sekundärantikörper vorsichtig abgeklopft und die Schnitte verblieben in 1xPBS pH 7,4.

Im folgenden Schritt sollten die HRP-konjugierten Sekundärantikörper detektiert werden. Hierfür wurde das Chromogen DAB verwendet. Die Oxidation von DAB bewirkte die Entstehung brauner Farbe, die sich in der Umgebung des Antigens absetzte. Hierzu wurde 1ml Puffer mit einem Tropfen DAB gemischt. Das 1xPBS pH 7,4 wurde von den einzelnen Schnitten abgeklopft und 100 µl der DAB-Lösung auf jeden Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden fünf Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DAB-Lösung von den Slides abgeklopft und die Schnitte wurden jeweils zehn Minuten in Aqua dest. gewaschen.

Im vorletzten Schritt wurden die immunhistochemischen Schnitte mit Hämalaun nach Meyer für 1x3 Minuten gegengefärbt. Diese Färbung führte aufgrund ihres guten Kontrastes zum DAB-Farbstoff zu einer besseren Darstellung der Zellkerne. Unter fließendem Aqua fontis wurden alle Slides zehn Minuten lang gebläut, da im Leitungswasser bestimmte Ionen vorhanden sind, die den Bläueffekt bewirken.

Zuletzt wurden die Schnitte entwässert und eingedeckt. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. 1x3 Minuten in 96 % Ethanol, 2x3 Minuten in 100 % Ethanol und 2x3 Minuten in Xylol. Die Objektträger wurden maschinell mittels Eindeckautomaten (Microm CTM6) mit DPX und einem Deckglas eingedeckt. Falls vereinzelte Präparate ausgelassen wurden, musste händisch eingedeckt werden.⁴

3.3 Mikroskopie und finale Auswertung

3.3.1 Mikroskopie

Die fertig gefärbten Präparate wurden schlussendlich in der Abteilung VetCORE-Facility for Research an der Veterinärmedizinischen Universität Wien untersucht. Dafür stand das Mikroskop Zeiss Axio Imager Z2 von Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany zur Verfügung. Für die Fotografie der histologischen Präparate wurde zudem das Programm ZEN2012 verwendet. Pro Gewebeprobe lagen jeweils sechs gefärbte Präparate vor, wobei vier den jeweiligen immunhistochemischen Färbungen entsprachen (je einmal HSP70, HSP60, Caspase 3, Kinase 67) und zwei Proben mittels Hämatoxylin – Eosin angefärbt wurden und als Übersicht für den vorliegenden Gewebeabschnitt dienten. Insgesamt standen 128 immunhistochemisch gefärbte Präparate aus 32 unterschiedlichen Plazenta- und Ovargeweben zur Verfügung. Alle Präparate wurden überblicksmäßig mit dem 10er Objektiv (= 100fache Vergrößerung) angesehen und anschließend mit dem 40er Objektiv (= 400fache Vergrößerung) abschnittsweise fotografiert. Dabei wurden bei den vorliegenden Plazentaprobe jeweils drei bis sieben Bilder von den Regionen Plazentalabyrinth, Spongiöse Drüsenschicht (bzw. Drüsenkammer), oberflächliche Drüsenschicht, tiefe Drüsenschicht und Myometrium gemacht, bei den Ovarproben von Gelbkörper-, sowie Follikelgewebe.

⁴ Vgl. Standardarbeitsanweisung SOP-M-10.01 S.5-8, Institut für Pathologie, Arbeitsbereich Histologie & Embryologie, Vetmeduni vienna

3.3.2 Quantitative Auswertung und qualitative Bildbeschreibung

Da die immunhistochemischen Färbungen HSP60 und Caspase 3 nicht den Zellkern per se anfärben, war hierfür eine quantitative Auszählung nicht möglich. Daher wurde qualitativ mit Beschreibung der Bilder gearbeitet und nach folgendem Schema in Microsoft Office Excel Professional Plus 2016 eingeteilt:

- Menge der Anfärbung
 - 0 %, 0-25 %, 25-50 %, 50-75 %, 75-100 %
- Intensität der Anfärbung
 - Keine, geringgradig, mittelgradig, hochgradig

Für die zellkernassoziierten Färbungen HSP70 und Kinase 67 konnte hingegen für eine quantitative Auszählung das Computerprogramm FIJI herangezogen werden. FIJI ist ein Open Source Bildverarbeitungspaket, das 2011 erstmals veröffentlicht wurde und seitdem für Auswertungen aller Art verwendet werden kann. Dabei wurden pro Bild sowohl die angefärbten (= positiv), als auch die nicht gefärbten (= negativ) Zellkerne gezählt. Mittels Microsoft Office Excel Professional Plus 2016 konnte anschließend der prozentuelle Anteil an positiven und negativen Zellen pro Bild errechnet werden.

Die 18 Hündinnen wurden bei der Endauswertung in Microsoft Office Excel Professional Plus 2016 in fünf Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 (n = 2) umfasst jene Hündinnen, die sich im Endstadium der Gravidität befanden und bei denen die Geburt bereits eingesetzt hat. Gruppe 2 (n = 6) beinhaltete all jene Tiere, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme zwischen dem 30. und 40. Tag trächtig waren. Gruppe 3 (n = 1) umfasste eine Hündin in der Frühgravidität (Tag 16-18). Die Hündinnen der Gruppe 4 (n = 4) befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Diöstrus, waren nicht gedeckt worden und folglich nicht trächtig. Die Hündinnen der Gruppe 5 (n = 5) wurden im Diöstrus gedeckt, es resultierte aber keine Trächtigkeit daraus. Die Gruppen 1-3 konnten gemeinsam als Gruppe „trächtig“ (n = 9), und die Gruppen 4-5 als Gruppe „nicht trächtig“ (n = 9) zusammengefasst werden.

4 Ergebnisse

Für die Endauswertung wurden in Microsoft Office Excel Professional Plus 2016 schlussendlich die Ergebnisse aus 1.034 Bildern ausgewertet. Einen Auszug aller gesammelten Bilder zeigen die Abbildungen 11, 12 und 13. Die Ergebnisse dieser Studie basieren bei den Färbungen HSP70 und Kinase 67 auf quantitativen Auszählungen, durchgeführt mit dem Computerprogramm FIJI, die Ergebnisse der Färbungen HSP60 und Caspase 3 auf qualitativer Bildbeschreibung. Zwölf der 1.034 Bilder zeigten kein eindeutiges Ergebnis und wurden daher nicht in die Endauswertung miteinbezogen. Grund dafür waren beispielsweise ein defekt gefärbter Gewebeabschnitt, Artefakte oder auch eine undeutliche Färbung. Die 18 Hündinnen wurden bei der Endauswertung aller vier immunhistochemischer Färbungen in fünf Gruppen unterteilt: Graviditätsende ($n = 2$), Graviditätsmitte ($n = 6$), Frühe Gravidität ($n = 1$), Metöstrus „nicht gedeckt, nicht trächtig“ ($n = 4$) und Metöstrus „gedeckt, aber nicht trächtig“ ($n = 5$). Da die Plazenta zum Zeitpunkt der Frühträchtigkeit (Tag 16-18) noch nicht vollständig entwickelt ist, lagen nur bei Hündinnen, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der Graviditätsmitte oder am Graviditätsende befanden, Ergebnisse zu den Plazentaprobe vor.

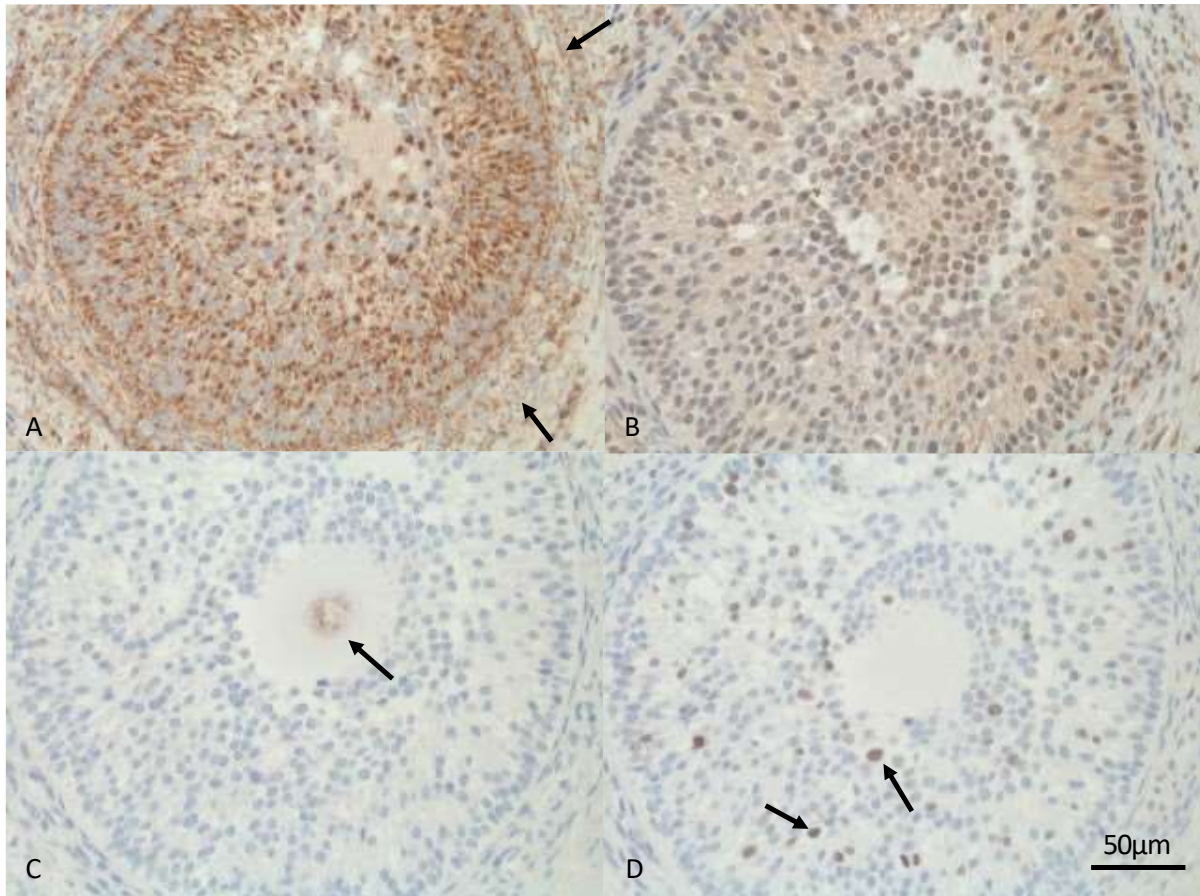


Abb. 11 Immunhistochemisch angefarbtes Follikelgewebe einer Hündin in Endgravidität

- (A) Generalisiertes mit HSP60 angefarbtes Zytoplasma des Follikelgewebes. Die Pfeile markieren HSP60 gefärbte Zellen der Theca interna – Schicht.
- (B) HSP70 Expression in den Nuclei im Follikelgewebe.
- (C) Nicht gefärbtes Follikelgewebe nach Caspase 3 – Färbung. Der Pfeil markiert die gut dargestellte Eizelle, die vom Follikel umgeben wird.
- (D) Expression von Kinase 67. Die Pfeile markieren positiv gefärbte Granulosazellen des Follikelgewebes.

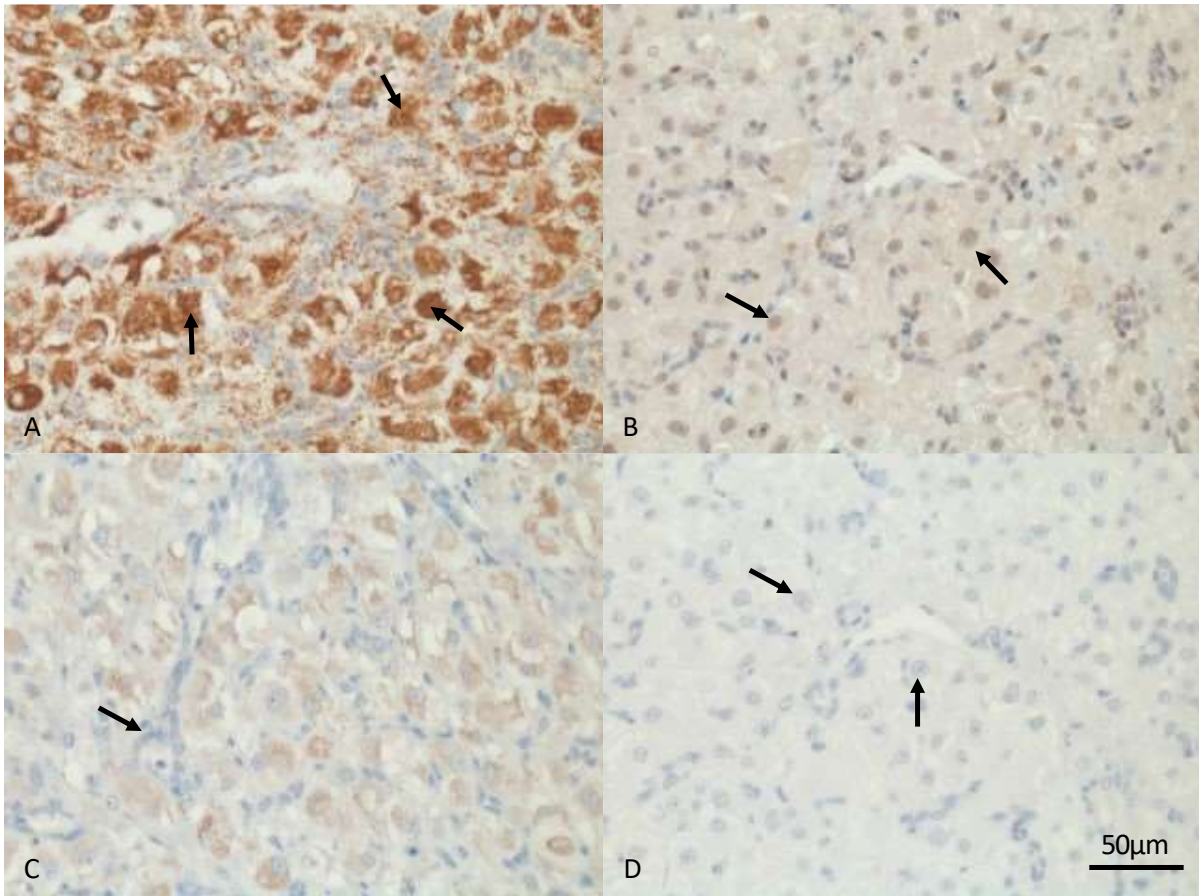


Abb. 12 Immunhistochemisch angefärbtes Gelbkörporgewebe einer Hündin in Endgravidität

- (A) Hochgradig mit HSP60 angereichertes Zytoplasma des Gelbkörporgewebes. Die Pfeile markieren mit HSP60 gefärbte Granulosaluteinzellen.
- (B) Die Pfeile markieren die Expression von HSP70 in den Nuclei der Granulosaluteinzellen.
- (C) Mit Caspase 3 gefärbtes Gelbkörporgewebe. Der Pfeil markiert gut dargestellte, nicht gefärbte Endothelzellen eines Blutgefäßes.
- (D) Keine Expression von Kinase 67. Die Pfeile markieren negativ gefärbte Granulosaluteinzellen des Corpus luteum.

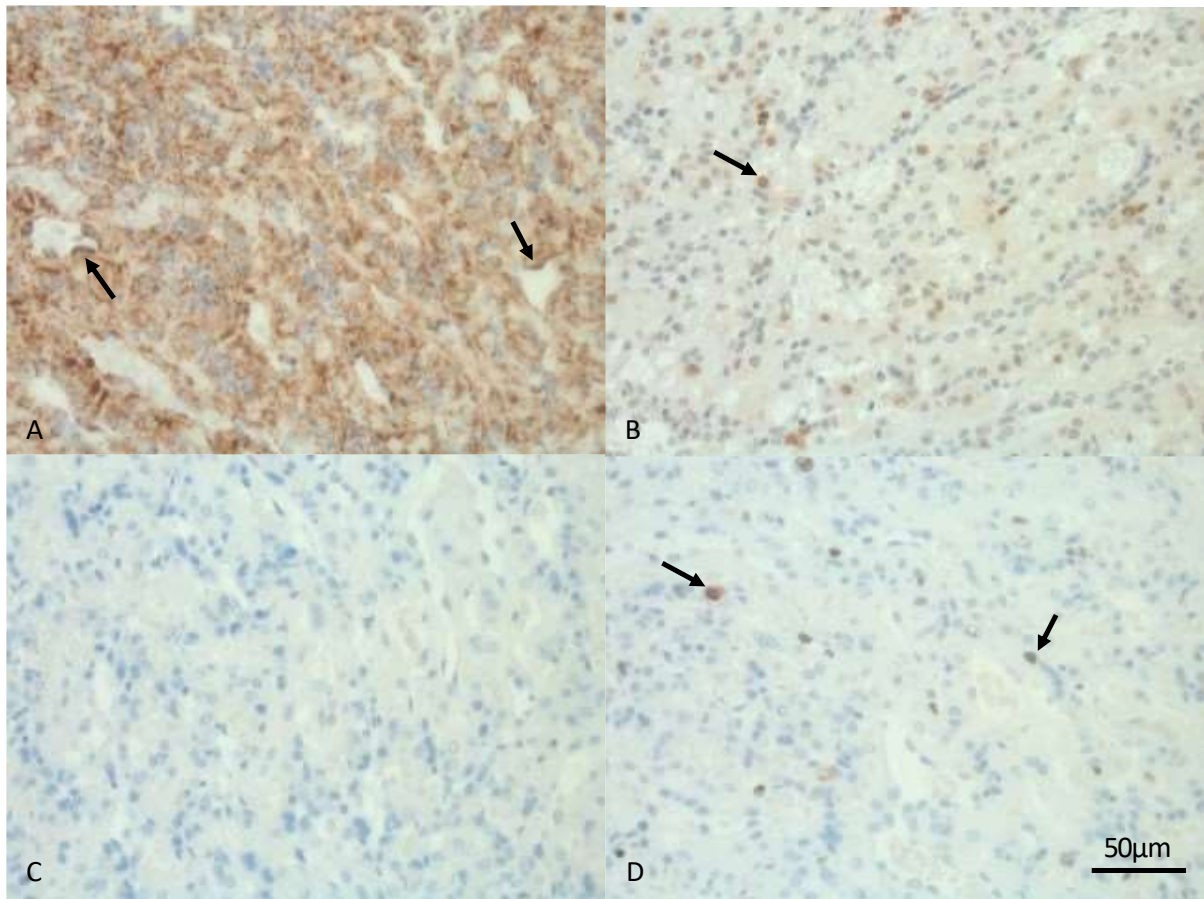


Abb. 13 Immunhistochemisch angefärbtes Plazentalabyrinth einer Hündin in Endgravidität

- (A) Hochgradig mit HSP60 angefärbtes Plazentalabyrinth. Die Pfeile markieren mit HSP60 angereicherte Endothelzellen von Blutgefäßen, die im Labyrinth reichlich vorhanden sind.
- (B) Der Pfeil zeigt die Expression von HSP70 im Zellkern eines Zytotrophoblasten.
- (C) Ungefärbtes Zytotrophoblastengewebe des Plazentalabyrinths bei Caspase 3 Färbung.
- (D) Die Pfeile markieren vereinzelt die Expression von Kinase 67 in den Zytotrophoblastenzellkernen des Plazentalabyrinths.

4.1 Quantitative Auswertung – HSP70

Für die quantitative Bestimmung der Expression von HSP70 in Plazenta und Ovarien gravider und nicht gravider Hündinnen wurden insgesamt 226 Bilder mittels Computerprogramm FIJI ausgewertet. Wie in Abb. 14 ersichtlich, zeigte sich in allen fünf Gruppen eine prozentuell ähnlich starke Expression von HSP70 im Follikelgewebe (84-100 %). Im Gewebe des Corpus luteum (= CL) fällt die prozentuelle Expression von HSP70 deutlich niedriger aus (8-44 %), wobei die Expression von HSP70 im Gelbkörpergewebe zum Graviditätsende hin zunimmt.

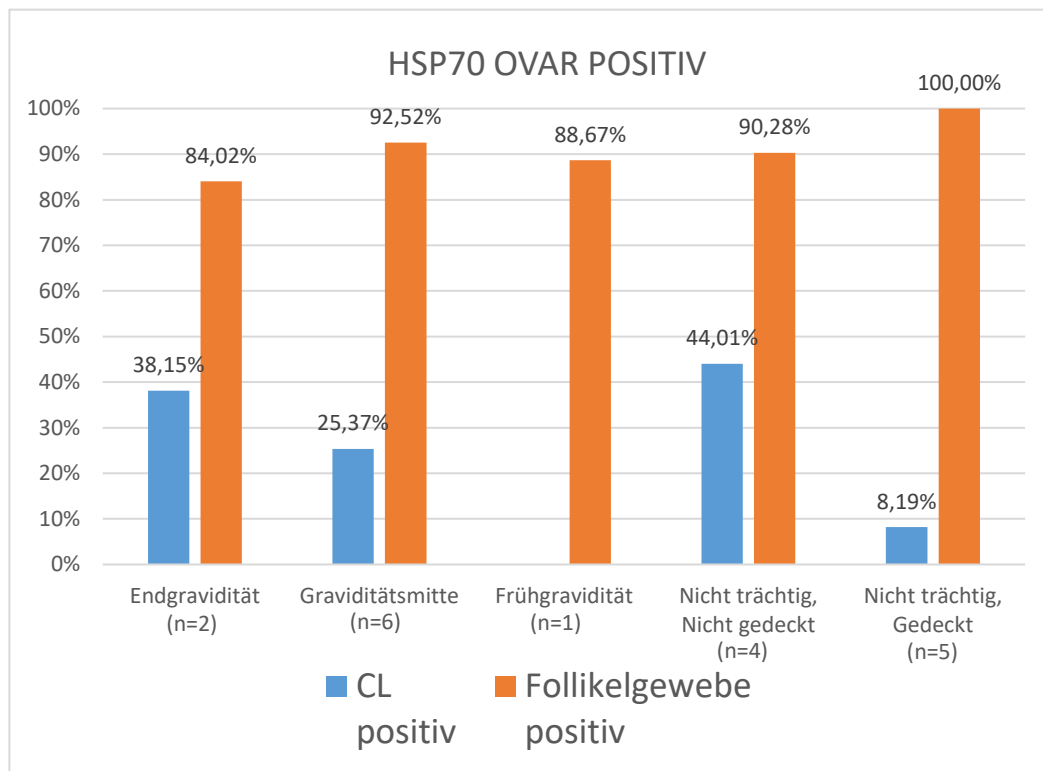


Abb. 14 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von HSP70 in den Ovarien nach Gruppierung; CL = Corpus luteum

Da für diese Studie nur eine Hündin (n = 1) in die Gruppe der Frühträchtigkeit (= Gruppe 3) fällt, liegt auf Grund einer defekten HSP70-Färbung des Gelbkörpergewebes kein Ergebnis zur Expression von HSP70 im Gelbkörpergewebe frühträchtiger Hündinnen vor.

Abb. 15 zeigt die Expression von HSP70 in den Schichten des Plazentagewebes endgravider Tiere und Hündinnen mittlerer Gravidität. Bei beiden Gruppen wird HSP70 am stärksten im Myometrium exprimiert (Graviditätsmitte: 48,64 %; Graviditätsende: 83,67 %), am geringsten in den Zellen der tiefen Drüsenschicht (Graviditätsmitte: 6,15 %, Graviditätsende: 50,23 %). Vergleichend stellt sich ein Anstieg der Zellexpression von HSP70 in allen Gewebeschichten der Plazenta zum Ende der Gravidität hin dar.

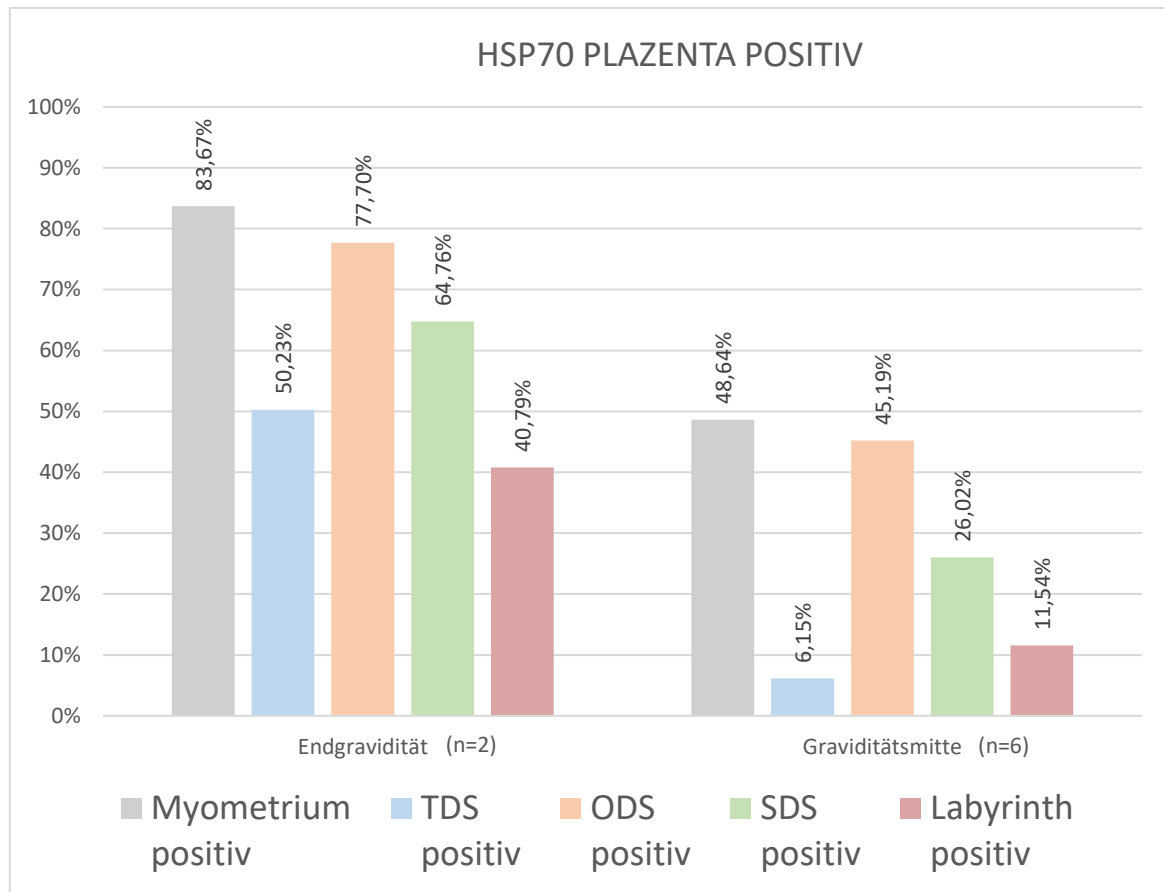


Abb. 15 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von HSP70 in der Plazenta nach Gruppierung; TDS = tiefe Drüsenschicht, ODS = oberflächliche Drüsenschicht, SDS = spongiöse Drüsenschicht

4.2 Quantitative Auswertung – Kinase 67

Für den Proliferationsmarker Kinase 67 sind in dieser Pilotstudie insgesamt 247 Bilder von Plazenta- und Ovargewebe mittels Computerprogramm FIJI ausgewertet worden. Das Endergebnis zeigt, dass Kinase 67 bei nicht trächtigen Tieren im Corpus luteum-Gewebe kaum exprimiert wird. Ein ähnliches Ergebnis weisen die Hündinnen in der Endgravidität auf. Bei den Hündinnen zum Zeitpunkt der Frühgravidität und Graviditätsmitte konnte keine Expression von Kinase 67 (KI67) im Gelbkörpergewebe nachgewiesen werden. Im Follikelgewebe wurde KI67 in allen fünf Gruppen ähnlich gering exprimiert (7,3-14,8 %) (Abb. 16).

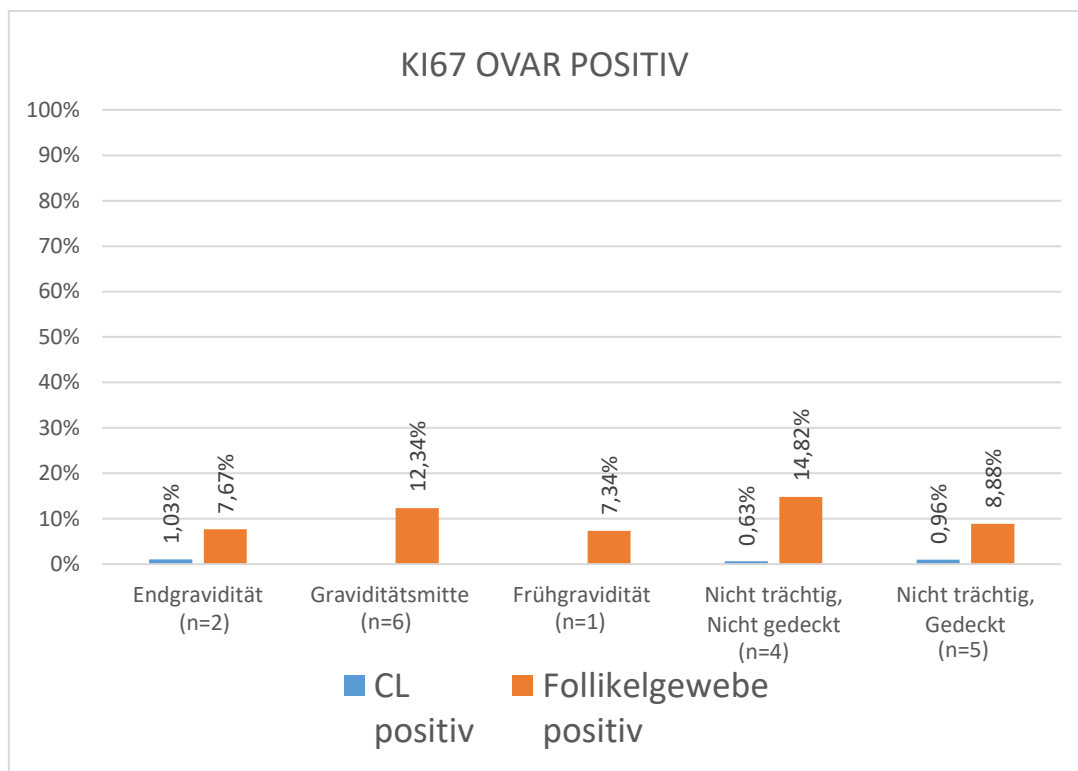


Abb. 16 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von KI67 in den Ovarien nach Gruppierung; CL = Corpus luteum

Neben der geringen Expression von KI67 im Ovargewebe, weisen auch die ausgewerteten Plazentaprobe in Abb. 17 ein ähnlich geringes Ergebnis auf. Im Plazentalabyrinth zeigt sich die stärkste Expression von Kinase 67 in beiden Gruppen, Endgravidität (9,94 %) und Graviditätsmitte (8,07 %). Am Graviditätsende wird KI67 auch stärker in der tiefen Drüsenschicht (3,79 %) und der oberflächlichen Drüsenschicht (2,64 %) exprimiert. Wie bereits bei HSP70 beobachtet, nimmt auch die Expression von KI67 zum Ende der Gravidität hin zu.

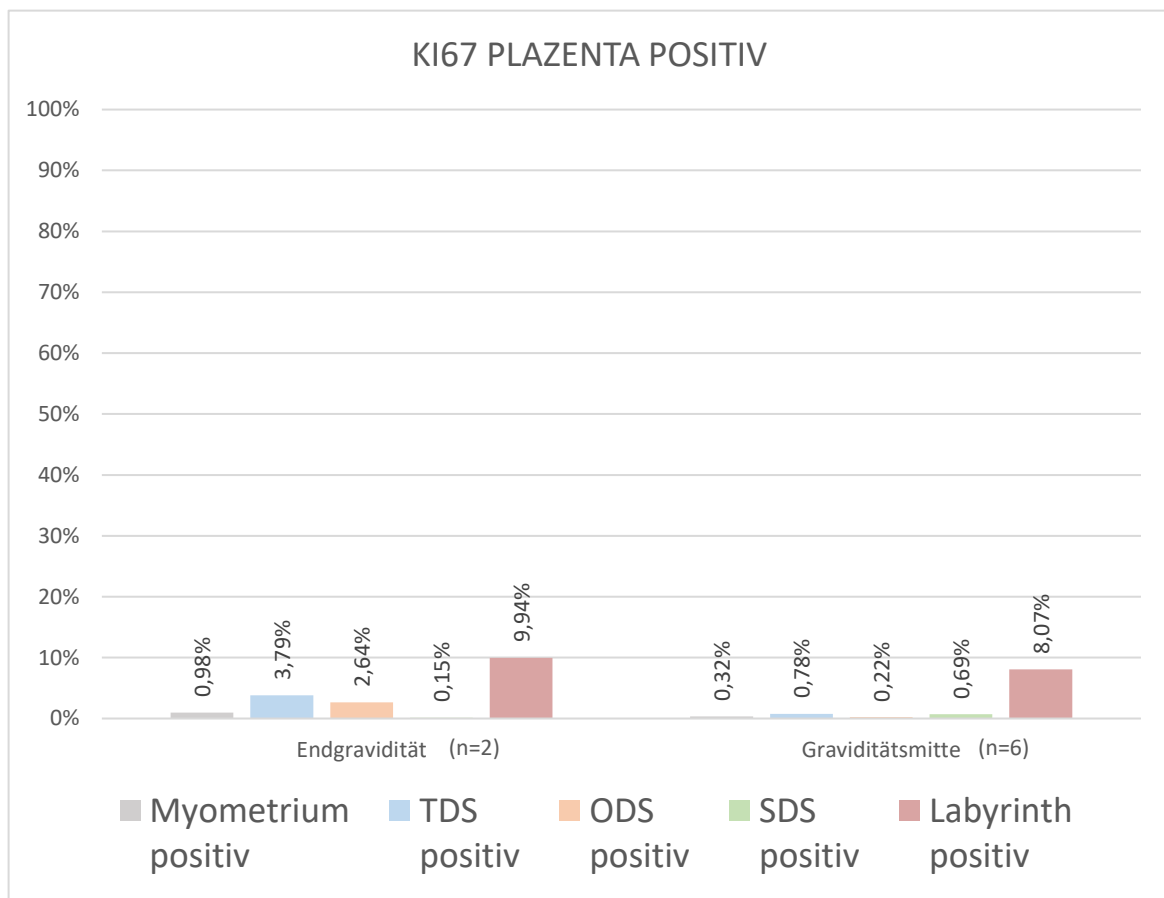


Abb. 17 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von KI67 in der Plazenta nach Gruppierung; TDS = tiefe Drüsenschicht, ODS = oberflächliche Drüsenschicht, SDS = spongiöse Drüsenschicht

4.3 Qualitative Auswertung – HSP60 (HSPD1)

Jene Präparate, die mit HSP60 (= HSPD1) immunhistochemisch angefärbt wurden, wurden insgesamt 277mal ausgewertet. Da HSP60 keine zellkernassoziierte Färbung darstellt, war eine quantitative Auszählung mittels Computerprogramm FIJI nicht möglich es wurde jedes Bild nach dem im Kapitel 3.3.2 erklärten Schema beurteilt. Danach wurden die Ergebnisse der qualitativen Auswertung für die jeweiligen Gewebearten in Microsoft Excel 2016 eingetragen und anschließend in einer Grafik dargestellt.

Die Auswertungen der HSP60 (= HSPD1) Färbung zeigen im Gelbkörpergewebe in allen fünf Versuchsgruppen eine sehr deutliche Expression (Abb. 18 und 19). In fast allen untersuchten Präparaten zeigt sich eine Expression dieses Chaperons von mehr als 50 %. Überwiegend wird HSP60 in dieser qualitativen Auswertung sogar zu mehr als 75 % exprimiert. Die Intensität der Färbung fällt beim untersuchten Corpus luteum Gewebe der frühgraviden Hündin geringer aus, als bei den Hündinnen der Graviditätsmitte und Endgravidität. Außerdem zeigen die Ergebnisse in Abb. 19, dass die Intensität der Färbung bei den Proben der nicht tragenden Hündinnen etwas geringer als bei den endgraviden Tieren ausfällt.

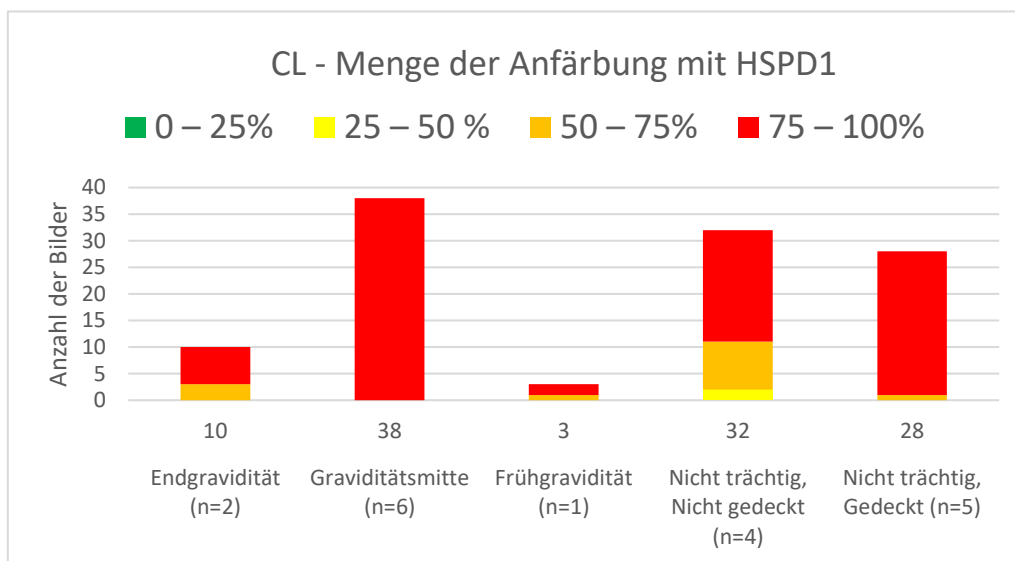


Abb. 18 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit HSPD1 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung; CL = Corpus luteum

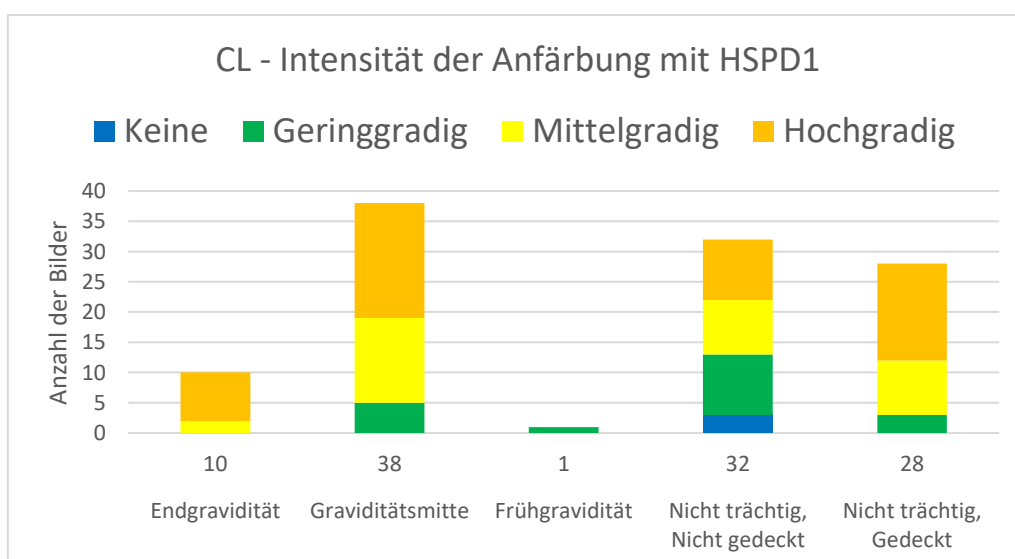


Abb. 19 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit HSPD1 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung; CL = Corpus luteum

Wie bereits im Corpus luteum Gewebe, zeigt sich auch eine starke HSPD1-Anfärbung des Follikelgewebes. In drei der fünf untersuchten Gruppen wird HSP60 sehr stark und intensiv exprimiert. Lediglich bei den analysierten Follikelgeweben der frühgraviden Hündin wird HSPD1 schwächer exprimiert. Aus den Grafiken lässt sich erkennen, dass HSP60 auch vereinzelt bei nicht graviden Tieren schwächer im Follikelgewebe exprimiert wird (Abb. 20 und 21).

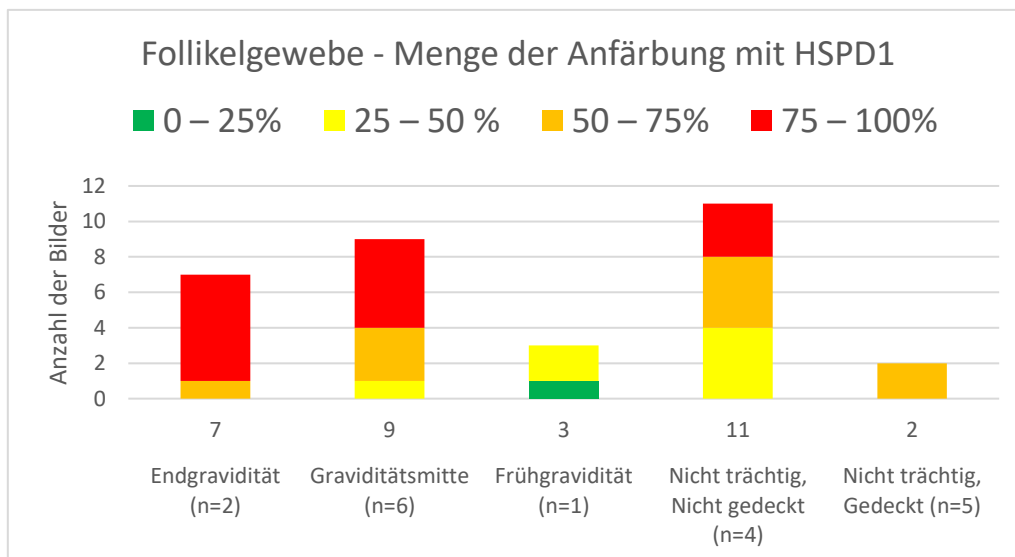


Abb. 20 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit HSPD1 im Follikelgewebe nach Gruppierung

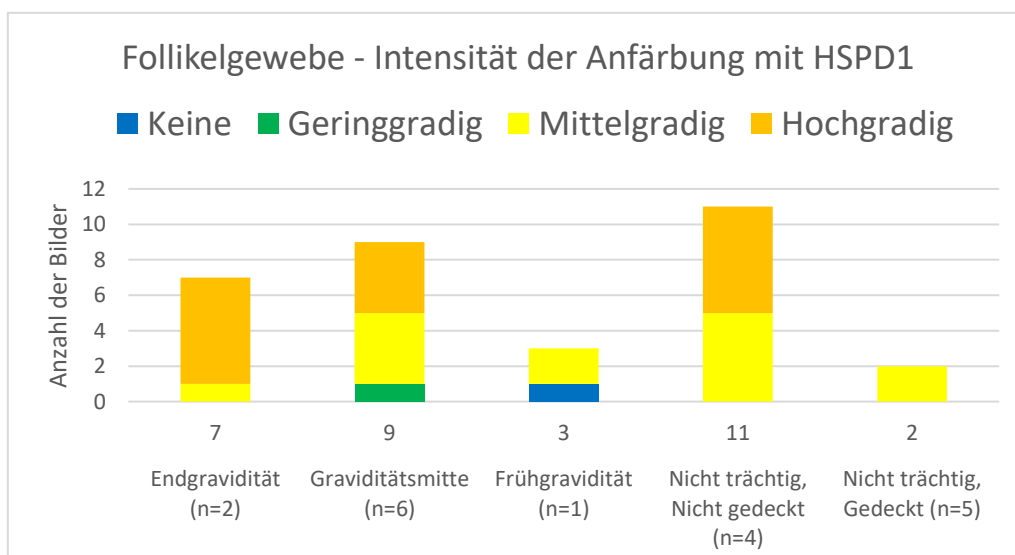


Abb. 21 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit HSPD1 im Follikelgewebe nach Gruppierung

Die Grafiken zur HSP60 Färbung des Plazentagewebes zeigen sowohl eine hohe Menge an angefärbten Zellen, als auch eine hohe Intensität der Anfärbung in den einzelnen Plazentaschichten. Vergleicht man allerdings die Menge und Intensität der Anfärbung zwischen den Gruppen Graviditätsmitte und Endgravidität, so zeigt sich, dass HSP60 gegen Ende der Gravidität in allen Schichten der Plazenta stärker exprimiert wird, als noch zur Graviditätsmitte (Abb. 22).

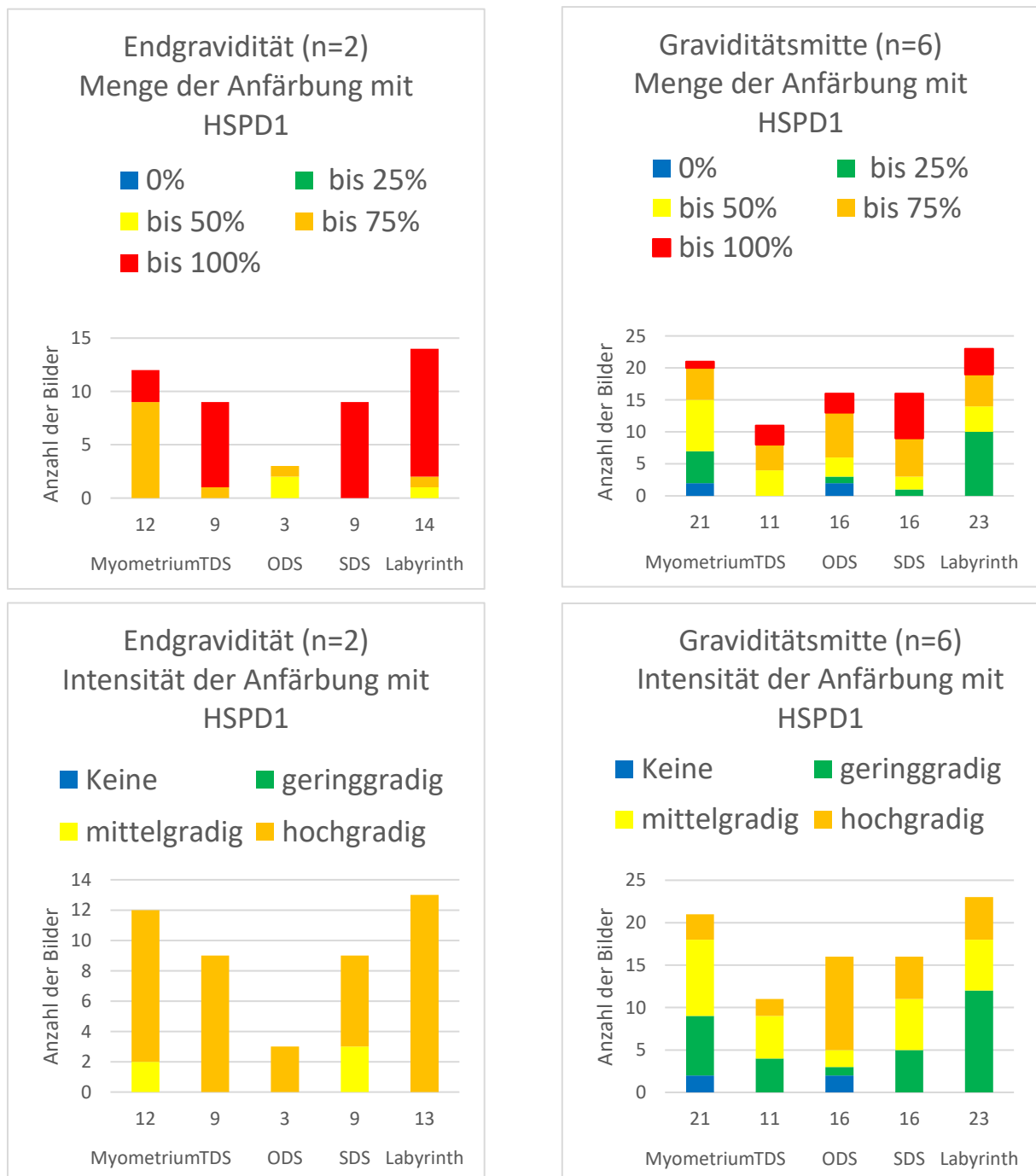


Abb. 22 Graphische Darstellungen der Menge und Intensität der Anfärbung mit HSPD1 in der Plazenta nach Gruppierung; TDS = tiefe Drüsenschicht, ODS = oberflächliche Drüsenschicht, SDS = spongiöse Drüsenschicht

4.4 Qualitative Auswertung – Caspase 3

Von den Plazenta- und Ovarproben, die mit Caspase 3 angefärbt wurden, wurden insgesamt 270 Bilder ausgewertet. Da auch Caspase 3 keine zellkernassoziierte Färbung darstellt, war eine quantitative Auszählung mittels FIJI ebenfalls nicht möglich und es wurde erneut jedes Bild nach dem im Kapitel 3.3.2 beschriebenen Schema ausgewertet. Wie bereits bei der HSP60-Färbung wurden die Ergebnisse der qualitativen Auswertung von Caspase 3 ebenfalls für die jeweiligen Gewebearten in Microsoft Excel 2016 eingetragen und anschließend in einer Grafik dargestellt.

Die Auswertungen der Caspase 3 Färbung zeigen im Gelbkörpergewebe eine starke Expression. Vor allem bei nicht tragenden Hündinnen wird Caspase 3 in hohen Mengen exprimiert. In der Gruppe 2 (Graviditätsmitte) variiert die Expression von Caspase 3 am stärksten. Die Intensität der Färbung variiert ebenfalls. Dennoch lässt sich erkennen, dass die CL-Gewebeproben der nicht graviden Hündinnen intensiver angefärbt sind, als die der graviden (Abb. 23 und 24).

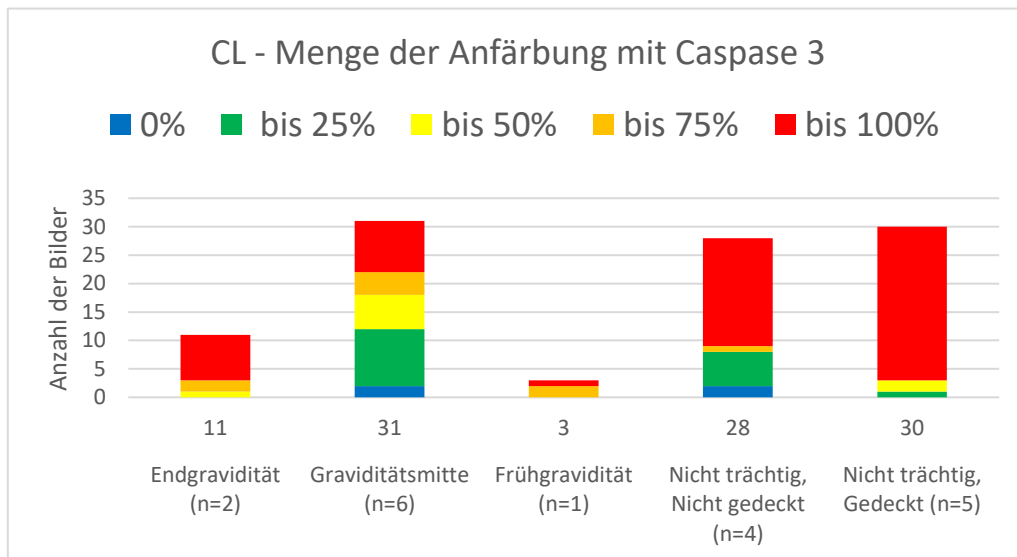


Abb. 23 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit Caspase 3 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung; CL = Corpus luteum

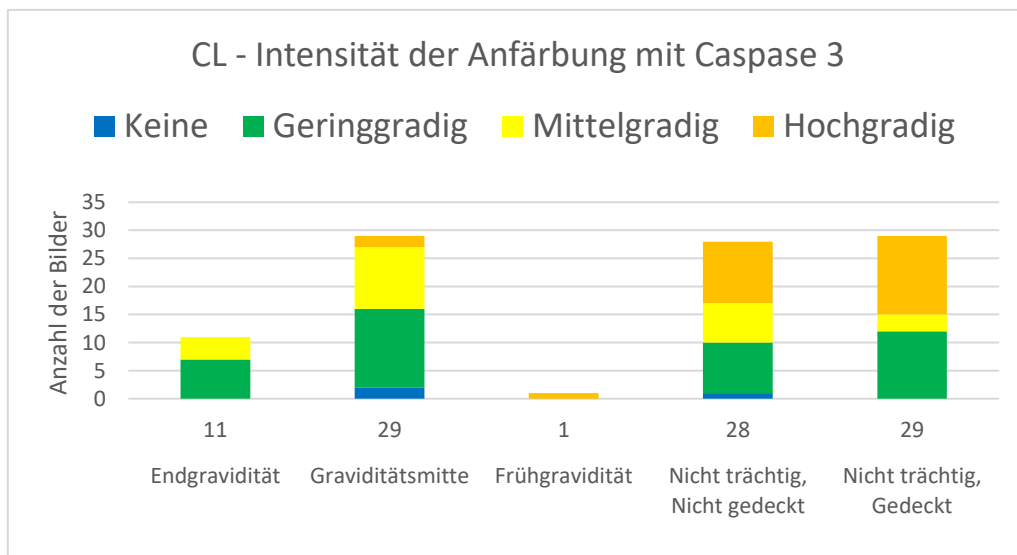


Abb. 24 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit Caspase 3 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung; CL = Corpus luteum

Wie in den Abbildungen 25 und 26 ersichtlich, wird Caspase 3 im Follikelgewebe gravider und nicht gravider Hündinnen generell wenig exprimiert. Auch die Intensität der Anfärbung ist im Follikelgewebe aller fünf Vergleichsgruppen deutlich niedriger als im Gelbkörpergewebe. Allerdings verdeutlicht die Abb. 25, dass Caspase 3 im Follikelgewebe eher bei graviden, als bei nicht graviden Tieren exprimiert wird.

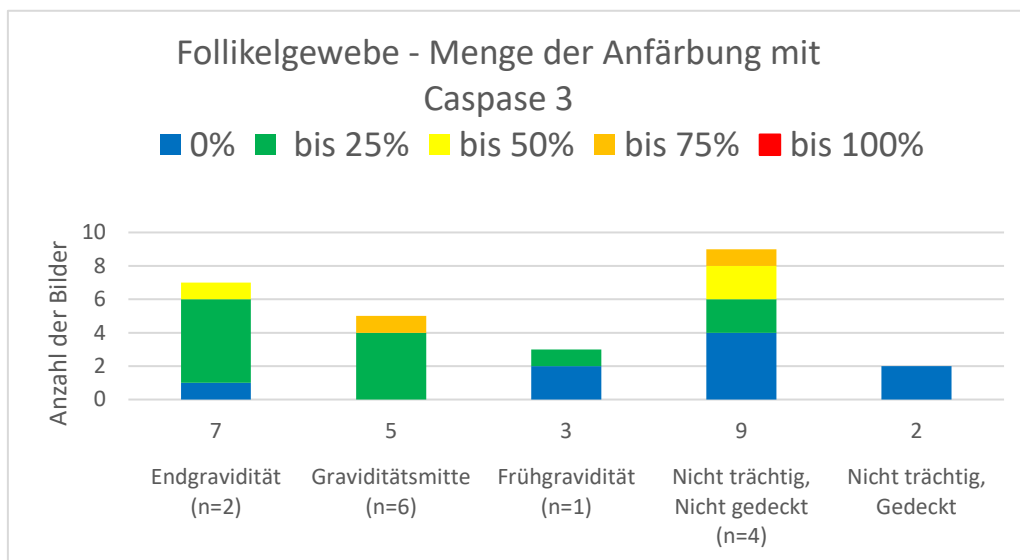


Abb. 25 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit Caspase 3 im Follikelgewebe nach Gruppierung

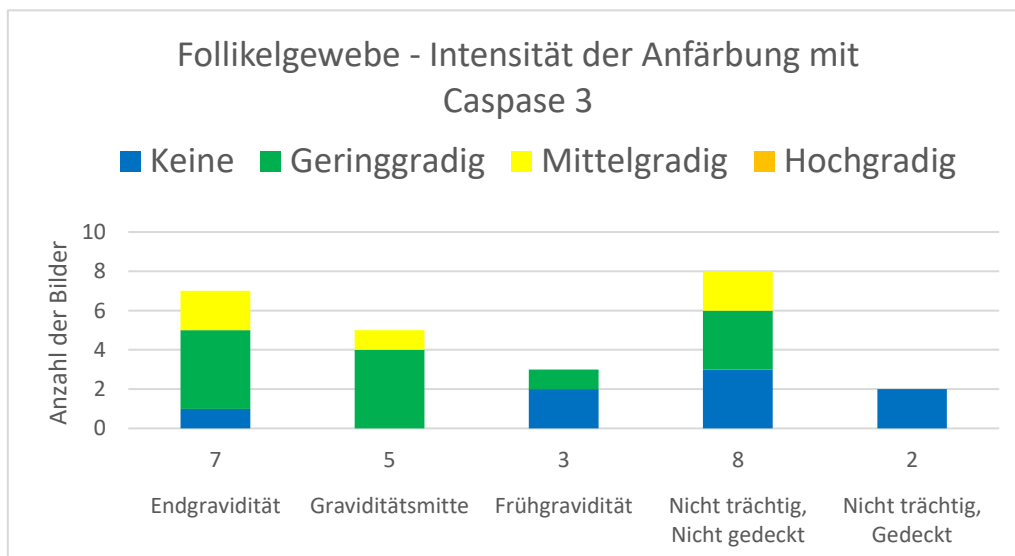


Abb. 26 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit Caspase 3 im Follikelgewebe nach Gruppierung

Die Grafiken zur Caspase 3 Färbung im Plazentagewebe zeigen eine geringe Expression in allen Schichten der Plazenta. Lediglich in der spongiösen Drüsenschicht bei endgraviden Hündinnen wird Caspase 3 stärker exprimiert. Allerdings zeigen die Grafiken, wie bereits in den Abb.en zum Follikelgewebe ersichtlich, eine leichte Tendenz zu einer vermehrten Caspase 3 Expression zum Ende der Gravidität hin (Abb. 27).

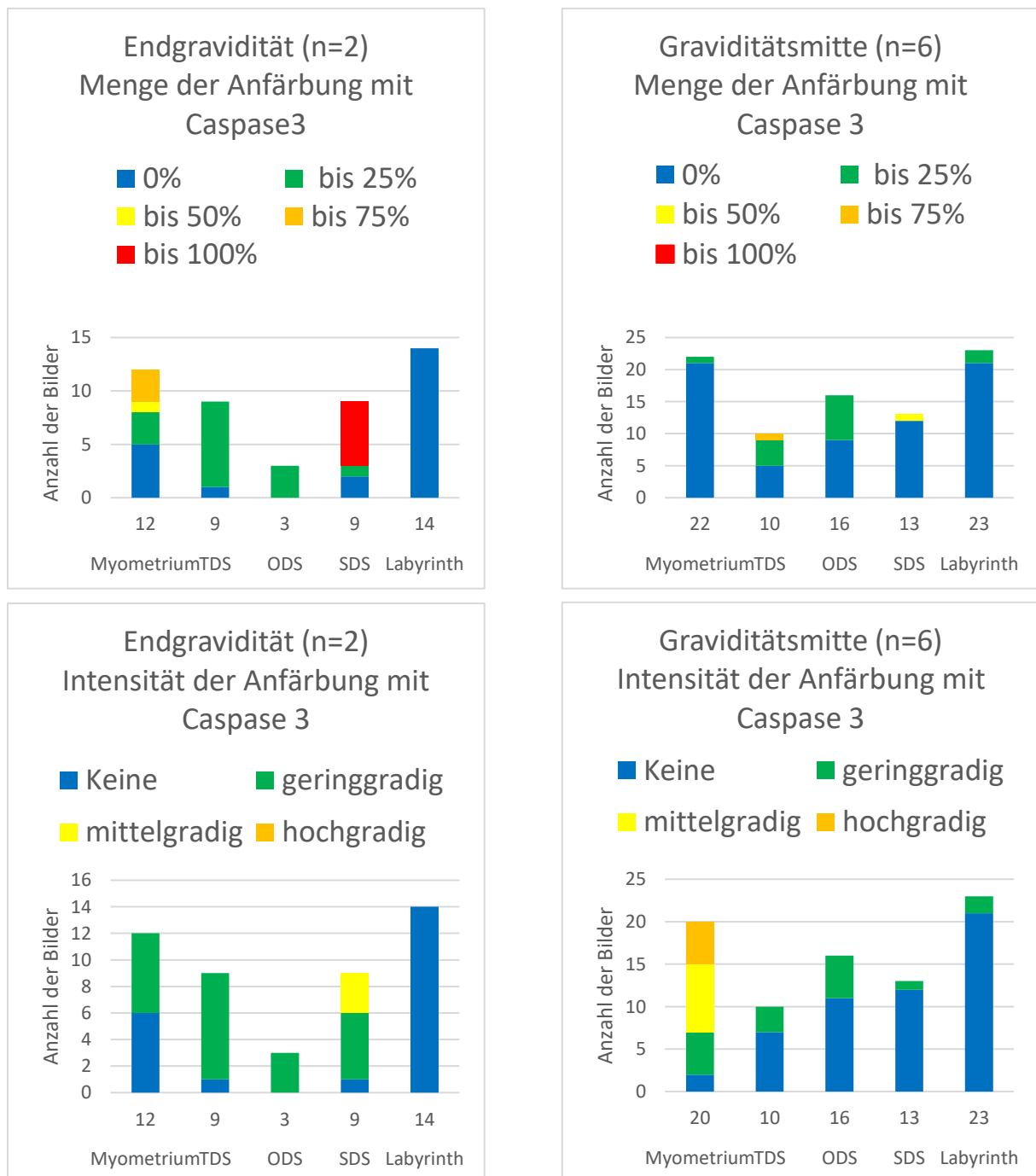


Abb. 27 Graphische Darstellungen der Menge und Intensität der Anfärbung mit Caspase 3 in der Plazenta nach Gruppierung (TDS = tiefe Drüsenschicht, ODS = oberflächliche Drüsenschicht, SDS = Spongiöse Drüsenschicht)

4.5 Detaillierte, qualitative Bildbeschreibung zur Expression von HSP60 (= HSPD1), HSP70, Kinase 67 und Caspase 3 in den Zellen von Plazenta, Gelbkörper und Follikeln

Betrachtet man die Zellexpression in den einzelnen Plazentaschichten und dem Ovargewebe detaillierter, so zeigte sich generell, dass in allen fünf Testgruppen (unabhängig von einer Trächtigkeit oder nicht bzw. in welchem Trächtigkeitsstadium sich die Hündin befand) das Verhältnis der angefärbten Zellen zueinander in den jeweiligen Gewebeschichten unverändert war. Obwohl in jeder Gruppe die Färbungen unterschiedlich stark und intensiv in den einzelnen Geweben exprimiert wurden, hatte dies keinerlei Auswirkung auf das Verhältnis der angefärbten Zelltypen zueinander.

HSP60 wurde im Plazentalabyrinth unabhängig vom Zelltyp gleich stark exprimiert. Der innere Zytotrophoblast war gleich stark angefärbt, wie die Zellen des außen liegenden Synzytiotrophoblast. Auch die Endothelzellen zahlreicher Blutgefäße wurden von HSP60 stark eingefärbt. Gleiches gilt für die Zellen des Myometriums. Sowohl die inneren zirkulären Muskelzellen, als auch die außen liegenden longitudinalen Muskelzellen wiesen beide eine starke Anfärbung mit HSP60 auf. In der tiefen Drüsenschicht waren die tubulären Drüsenzellen der großen Drüsenkammern besonders intensiv angefärbt, aber auch die dazwischengelegenen Bindegewebszellen und die Endothelzellen (sowohl von großen Blutgefäßen, als auch kleinen Kapillaren) zeigten eine starke HSP60-Zellexpression. Alle Zellen des Gelbkörpergewebes zeigten ebenfalls eine starke Expression. Auffällig war allerdings, dass die äußeren Thecaluteinzellen besonders intensiv gefärbt waren, etwas stärker als die inneren Granulosaluteinzellen. Bindegewebs- und Endothelzellen waren etwa gleich intensiv gefärbt, allerdings weniger intensiv, als die Granulosaluteinzellen. Im Follikelgewebe wurde HSP60 unabhängig vom Follikelstadium und unabhängig vom Zelltypus gleich intensiv exprimiert.

HSP70 wurde in den Zellkernen von Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast gleich intensiv exprimiert. Zwar wurden auch in den Endothelzellen von Gefäßen HSP70 exprimiert, jedoch weniger intensiv. Im Myometrium wurde HSP70 in den Zellen von zirkulärer und longitudinaler Muskelschicht gleich exprimiert. In der tiefen Drüsenschicht wurde das Endothelgewebe mengenmäßig weniger und auch weniger intensiv angefärbt. Die tubulären Drüsenzellen wurden vermehrt angefärbt, allerdings mit geringerer Intensität. Die Bindegewebszellen zeigten die stärkste Anfärbung mit HSP70. Im Gelbkörpergewebe konnte sich kein Unterschied innerhalb der einzelnen Zelltypen feststellen lassen. Sowohl die äußeren und inneren Luteinzellen, als auch das Endothel der Blutgefäße und die Bindegewebszellen

waren in jeder Gruppe verhältnismäßig gleich oft und stark angefärbt. HSP70 wurde sowohl in den Granulosazellen, als auch in den Thecazellen in allen Follikelstadien gleich stark und intensiv exprimiert. Vereinzelt konnte in manchen Follikeln eine intensivere Anfärbung von HSP70 beobachtet werden. Dies war allerdings unabhängig vom Follikelstadium und war in allen Testgruppen vertreten.

Die qualitative Bildbeschreibung zu Kinase 67 zeigte, dass die generell geringe Expression etwas stärker in den Zellen des Synzytiotrophoblasten als im Zytotrophoblasten der Plazenta ausfiel. KI67 wurde basierend auf den dokumentierten Bildern in den Endothelzellen nicht exprimiert. Im Myometrium fiel die Expression in den zirkulären und longitudinalen Muskelzellen gleichermaßen gering aus. Auch in den Zellen der tiefen Drüsenschicht war die Expression von KI67 sehr gering ausgefallen. Allerdings zeigte sich, dass jene Zellen, die positiv angefärbt waren, vorwiegend Bindegewebszellen waren. Vereinzelt färbten sich auch tubuläre Drüsenzellen der großen Drüsenkammern an. Endothelzellen wurden, wie bereits im Plazentalabyrinth, nicht angefärbt. Kinase 67 konnte bei den Hündinnen in Endgravidität und den nicht trächtigen Tieren im Gelbkörpergewebe nur vereinzelt in den Granulosaluteinzellen und den Thecaluteinzellen (Verhältnis 1:1) nachgewiesen werden. Nach Auswertung der Bilder konnte keine Expression in Bindegewebe und Endothelzellen des Corpus luteum festgestellt werden. Im Follikelgewebe spielte vor allem das Entwicklungsstadium eine Rolle. Je höher der Reifegrad der Follikel war, umso mehr Zellen zeigten eine Expression von Kinase 67. Weiters waren die inneren Granulosazellen etwas häufiger positiv gefärbt, als die außenliegenden Thecazellen.

Caspase 3 wurde im Plazentalabyrinth de facto nicht exprimiert (Abb. 27). Im Myometrium erfolgte eine gleichermaßen geringe Expression in den Zellen der zirkulären und longitudinalen Muskelschicht. In den tubulären Drüsenzellen der großen Drüsenkammern war die Caspase 3 Expression gering und wenig intensiv, die dazwischenliegenden Bindegewebszellen wurden jedoch nicht angefärbt, ebenso wenig die Endothelzellen der Blutgefäße. Im Gelbkörpergewebe war die Expression von Caspase 3 am stärksten in den Thecaluteinzellen. Die Granulosaluteinzellen waren etwas weniger intensiv angefärbt. Bindegewebszellen und Endothelzellen färbten sich nur mäßig an. Caspase 3 wurde im Follikelgewebe nur gering exprimiert, unabhängig vom Follikelstadium. Bei einer Expression von Caspase 3, waren die Granulosazellen ab dem Tertiärstadium etwas mehr und intensiver angefärbt. In vereinzelt Präparaten waren die Follikel so angeschnitten, dass deren Oozyten dargestellt werden konnten. Diese zeigten eine verhältnismäßig starke Anfärbung mit Caspase 3.

5 Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, erste Erkenntnisse zur spezifischen Expression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 im Gewebe von Plazenta und Ovarien in graviden und nicht graviden Hündinnen zu gewinnen. Außerdem sollte die Untersuchung der Faktoren Kinase 67 und Caspase 3 Aufschluss über das Ausmaß lokaler Apoptose und Proliferation geben. Die Hypothese für diese Studie lautete, dass HSP60 und HSP70 im Verlauf der Frühgravidität, Graviditätsmitte und am Graviditätsende im Plazenta- und Ovargewebe bei graviden Hündinnen spezifisch und anders, als bei nicht-tragenden Hündinnen exprimiert werden. Außerdem sollen Kinase 67 und Caspase 3 an der lokalen Proliferation und Apoptose beteiligt sein.

Die Ergebnisse der ausgewerteten Bilder zum Ovargewebe bei graviden und nicht graviden Hündinnen zeigten eine deutliche Expression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 in beiden Gruppen. HSP60 konnte bereits im Follikelgewebe von Ratten nachgewiesen werden. Besonders stark war die Expression in den frühen Primordialfollikeln, allerdings zeigten auch die präovulatorischen Graaf'schen Follikel eine deutliche Anreicherung mit HSP60 (Paranko, J. et al. 1996). Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass die Follikel aufgrund ihrer starken Zellaktivität ein Schlüsselement enthielten, um importierte mitochondriale Proteine ordnungsgemäß wieder zusammenfalten zu können. Dass der Transport und die Faltung von Proteinen eine der Hauptaufgaben von Hitzeschockproteinen sind (Agashe und Hartl 2000, Bond und Schlesinger 1987, Lindquist 1986, Lindquist und Craig 1988, Macario und Conway de Macario 2005), dürfte die starke Expression im Follikelgewebe der Ratten erklären (Paranko, J. et al. 1996). Diese Pilotstudie zeigt, dass HSP60 sehr stark im Follikelgewebe von Hündinnen exprimiert wird. Da bei allen Säugetieren die Follikulogenese die gleichen Stadien durchläuft (Songsasen und Nagashima 2020), ist anzunehmen, dass auch bei Hündinnen HSP60 als Schlüsselement für die korrekte Proteinfaltung im Follikelgewebe dient. Außerdem konnte auch HSP70 bereits im Follikelgewebe der Ovarien bei mehreren Tierarten, unter anderem bei Ratten (Salveti et al. 2009) oder Kühen (Maniwa et al. 2005), nachgewiesen werden. Allerdings lag der Fokus beider Studien lediglich auf dem Nachweis von HSP70, weshalb keine Ergebnisse zur Funktion und Regulation von Hitzeschockproteinen im Ovargewebe vorliegen. Sirotkin und Bauer (2011) untersuchten die Expression von HSP70 mRNA im Follikelgewebe von Schweinen und auch den Einfluss von Hormonen und äußeren Umwelteinflüssen auf die Produktion von Hitzeschockproteinen im porcinen Ovargewebe. Interessant wäre gewesen, ob die entnommenen Ovarproben von graviden oder nicht graviden Schweinen stammen, diese Information lässt sich aus der Studie nicht entnehmen. Abgesehen davon konnte die lokale

Bildung und Expression von HSP70 mRNA mittels Real-Time PCR im Follikelgewebe der Schweine nachgewiesen werden. Weiters konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Hormone wie FSH die Bildung von HSP70 unterdrücken können, vermutlich als Gegenregulator zu Stresssituationen wie beispielsweise hohe Temperaturen oder auch Fehlernährung (Sirotkin und Bauer 2011). Das FSH bei der Hündin wirkt über die Bindung an spezifische Rezeptoren direkt am Ovar und fördert die Heranreifung von angelegten Primordialfollikeln zu ovulationsreifen, dominanten Graaf'schen Follikeln (Concannon 2011, England et al. 2009). Anhand der immunhistologischen Präparate dieser Diplomarbeit zeigt sich, dass die lokale Expression von HSP70 im Follikelgewebe bei graviden und nicht graviden Hündinnen stark ausgeprägt ist. Da auch beim Schwein FSH-spezifische Rezeptoren direkt am Ovar vorliegen und FSH beim Schwein ebenfalls für die Heranreifung der Follikel verantwortlich ist (Foxcroft et al. 1989), wäre es interessant, inwiefern auch bei der Hündin Gonadotropine die lokale Expression von Hitzeschockproteinen beeinflussen können. Aktuell liegt dazu noch keine Studie vor. Vergleicht man die Ergebnisse der Expression von HSP60 und 70 im Gelbkörpergewebe der Hündinnen so zeigt sich, dass HSP60 quantitativ geringer und HSP70 qualitativ weniger intensiv bei graviden Hündinnen als bei nicht graviden Hündinnen exprimiert wird. Außerdem steigt die Expression von Hitzeschockproteinen im Gelbkörpergewebe zum Graviditätsende hin an. Der Gelbkörper produziert Progesteron und spielt damit eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der caninen Gravidität. Bleibt die ausgebildete Eizelle postovulatorisch unbefruchtet, so kommt es zur Anbildung von Gelbkörpern, die eine ähnliche Lebensdauer wie Graviditätsgelbkörper aufweisen. Zur Luteolyse kommt es durch apoptotische Prozesse, während am Graviditätsende als Vorbereitung auf die Geburt, die PGF2alpha Sekretion aus der fetoplazentären Einheit zur Luteolyse führt (Concannon et al. 1989, Concannon 2009, Concannon 2011, Kowalewski 2014). Mittlerweile ist bei einigen Spezies, wie beispielsweise Ratte oder Mensch, bekannt, dass Hitzeschockproteine auch die Apoptose regulieren (Lanneau et al. 2008). Aus den Ergebnissen dieser Studien lässt sich daher vermuten, dass Hitzeschockproteine auch an der Regulierung der Luteolyse beteiligt sein könnten.

HSP60 und HSP70 wird auch stark im Plazentagewebe gravider Hündinnen exprimiert. Die quantitative Auswertung von HSP70 zeigt, dass die Expression in allen Schichten der Plazenta zum Ende der Gravidität zunimmt. Besonders stark fällt die Expression in den Zellen des Myometriums, der oberflächlichen Drüsenschicht und der spongiösen Drüsenschicht aus. Bei der beschreibenden Auswertung von HSP60 zeigt sich in allen fünf Plazentaschichten eine starke HSP-Expression. Aus der Humanmedizin ist bereits bekannt, dass Hitzeschockproteine

während der Gravidität und Geburt vermutlich über die Regulierung von Apoptose und Proliferation an der Autophagie beteiligt sind (Witkin et al. 2017). Da HSP70 meist den Abbau von Zellen beziehungsweise die Entfaltung von denaturierten Proteinen regulieren soll (Hemmingsen et al. 1988), sowie HSP60 im Zytosol von Körperzellen die Apoptose begünstigen kann (Campanella et al. 2014, Gammazza et al. 2017), ist selbige Funktion auch bei graviden Hündinnen denkbar. Shah et al. (1998) konnten in ihrer Publikation die Expression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 (sowie HSP27 und HSP90) im Plazentagewebe schwangerer Frauen nachweisen. Dabei zeigte sich, dass in allen drei Trimestern der humanen Gravidität Hitzeschockproteine sowohl in der maternalen (aus dem Endometrium gebildet) als auch der fetalen Plazenta (aus dem Trophoblasten gebildet) (Schnorr und Kressin 2011) exprimiert wurden. HSP60 wurde vorwiegend im Nukleus der dezidualen Stromazellen detektiert und die Expression war konstant im Verlauf der Schwangerschaft. HSP70 wurde gleich stark im Nukleus und dem Zytoplasma der Stromazellen nachgewiesen, allerdings nahm die Stärke der Expression zum Ende der Gravidität hin eher ab. Im Zytotrophoblasten wurde ebenfalls HSP60 und HSP70 detektiert, wobei HSP60 über die gesamte Schwangerschaft annähernd gleich stark exprimiert wurde, während die Expression von HSP70 wiederum abnahm. Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit veranschaulichen, dass auch in allen Schichten der caninen Plazenta HSP60 und HSP70 während der gesamten Gravidität exprimiert werden. Im Unterschied zur Studie von Shah et al. (1998) zeigt sich in dieser Diplomarbeit, dass die Expression von HSP70 im Verlauf der Gravidität zu- und nicht abnimmt. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass in der Studie von Shah et al. (1998) gesamt 15 Plazentaprobe zu Verfügung standen, je fünf pro Trimester. Die fünf Plazentaprobe aus der Mitte der Schwangerschaft wurden von Frauen gewonnen, die zwischen der 18. und 20. Woche spontan abortiert hatten. Dass ein Abort durchaus als eine „Stresssituation“ für den Körper angesehen werden kann, und „Stress“ zu einer vermehrten Hitzeschockexpression führt (Agashe und Hartl 2000, Bond und Schlesinger 1987, Lindquist 1986, Lindquist und Craig 1988), könnte erklären, warum die HSP70-Expression in der Plazenta während der Schwangerschaftsmitte bei den Frauen höher war als am Ende der Schwangerschaft. Zwar wurde eine spezielle, stressinduzierte Form von HSP70 (Macario 1995) von Shah et al. (1998) nicht detektiert, dies schließt aber eine vermehrte HSP70 Expression auf Grund des Abortes nicht aus. Die Gewebeprobe der Hündinnen mittlerer Gravidität wurden im Zuge eines Kastrationsprojekts für diese Pilotstudie entnommen. Die Tiere waren vorberichtlich gesund und wurden aus Kontrazeptionsgründen in Vollnarkose kastriert. Eine stressbedingte HSP70 Expression im Plazentagewebe der Hündinnen ist daher unwahrscheinlich. Neben dieser Studie konnten auch andere Studien aus der Humanmedizin

Hitzeschockproteine im weiblichen Reproduktionsgewebe nachweisen. Tabibzadeh und Broome (1999) untersuchten die Expression von Hitzeschockproteinen im Endometrium von Frauen während des Menstruationszyklus. Dabei konnte eine deutlich erhöhte Expression von HSP27, HSP60 und HSP70 während der Ovulation festgestellt werden, was die Autoren vermuten ließ, dass die HSP-Expression von Steroidhormonen abhängig ist. Auch in der humanen Plazenta ist die Expression von Hitzeschockproteinen von Steroidhormonen abhängig, da das Plazentagewebe während der gesamten Schwangerschaft an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt ist (Tabibzadeh und Broome 1999). Bei der Hündin ist bereits bekannt, dass Progesteron vom Gelbkörper gebildet wird und essentiell für die Erhaltung der caninen Gravidität ist (Concannon et al. 1989, Concannon et al. 2001). Manche Autoren vermuten allerdings, dass LH und/oder Prolaktin auch von der Plazenta der Hündin oder dem Embryo sezerniert werden könnten (Verstegen-Onclin und Verstegen 2008). Jedoch konnten diese Annahmen bis dato nicht bestätigt werden und sind derzeit als rein hypothetisch anzusehen. Die Studie von Onclin et al. (2002) zeigt, dass sich die LH-Konzentration bei graviden Hündinnen im Verlauf der Trächtigkeit ändern (Tag 10-40 bei 1,7 ng/ml, Tag 40-65 bei 2,3 ng/ml). In Anbetracht dieser Hypothese kann somit auch ein Zusammenspiel der Sezernierung von Hormonen und der Expression von Hitzeschockproteinen in der caninen Plazenta nicht völlig ausgeschlossen werden. Ozaydin et al. (2016) haben die HSP70-Expression während unterschiedlicher Gestationsstadien in der Plazenta von Mäusen untersucht. Bei der Maus differenzieren sich die Stromazellen bereits am dritten Tag der Gravidität zu Dezidualzellen aus und in der Graviditätsmitte liegt bereits eine voll entwickelte Plazenta hemochorialis vor. Dabei wird, anders als bei der Hündin, die Uterusschleimhaut völlig abgebaut, sodass der Synzytiotrophoblast frei im mütterlichen Blut schwimmt (Schnorr und Kressin 2011). Die Plazenta der Maus wird in vier Schichten unterteilt: die innerste Schicht bildet wie bei der Hündin das Plazentalabyrinth, es folgen eine Verbindungsschicht, eine Große-Zell-Zone (große Trophoblastenzellen) und eine von der mütterlichen Seite gebildete Dezidualschicht (Coan et al. 2004, Hemberger et al. 2001). Die Studie von Ozaydin et al. (2016) zeigt, dass HSP70 in allen Schichten der Plazenta sowohl während der Graviditätsmitte, als auch am Ende der Gravidität annähernd gleich stark exprimiert werden, wobei in den Zellen des Plazentalabyrinths die Expression mit annähernd 95 % am stärksten ausfällt und die Expression zur Dezidua hin abnimmt (Expression bei ca. 80 %). Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit zeigen, dass HSP60 und 70 stärker im Plazentagewebe endgravider Hündinnen, als bei Hündinnen mittlerer Gravidität exprimiert werden, allerdings nicht so stark wie bei Mäusen. Ozaydin et al. (2016) vermuten, dass sich eine unterschiedliche Intensität an HSP-

Expression zwischen Mensch und Maus auf unterschiedliche Plazentaentwicklungen und endokrine Funktionen zurückführen lässt. Da sich der Aufbau der Plazenta der Hündin deutlich von jener der Maus unterscheidet (Schnorr und Kressin 2011), könnte erklären, weshalb die Expression von HSP60 und 70 niedriger als bei Mäusen ausfällt.

In der Pilotstudie von Schäfer-Somi et al. (2019) konnten die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 bereits im Blutserum gravider und nicht gravider Hündinnen nachgewiesen werden. Dabei wurden die Serumkonzentrationen frühgravider Tiere mit denen der nicht trächtigen Tiere jeweils am Tag 7, 14 und 21 nach der Befruchtung verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Serumkonzentrationen von HSP60 und HSP70 an allen drei Stichtagen bei den graviden Tieren geringer als bei den nicht graviden Tieren waren. Die Autoren der Studie vermuteten, dass dieses Ergebnis auf einen Rückgang der lokalen Produktion zurückzuführen ist. Zwar wird während der Präimplantationsphase HSP70 vom Trophoblasten sezerniert, um sich vor oxidativem Stress oder hohen Temperaturen zu schützen, doch eine zu hohe Konzentration von HSP70 würde eher auf eine pathologische Gravidität hindeuten, wie eine Studie aus der Humanmedizin zeigte (Hromadnikova et al. 2016). Während physiologischer Trächtigkeiten könnte HSP70 als apoptoseregulierender Faktor gelten. HSP70 kann die Apoptose über die Blockierung der Kinase 1 oder auf lysosomalem Weg hemmen (Gao et al. 2010, Nylandsted et al. 2004). Eine geringe HSP70 Expression könnte somit wichtiger Faktor für eine kontrollierte Zunahme der Apoptose sein, was wiederum essentiell für den Trophoblasten ist, um mit dem mütterlichen Endometrium Kontakt aufzunehmen (Schäfer-Somi et al. 2019). Für diese Diplomarbeit stand eine Hündin für den Zeitraum der Frühträchtigkeit zur Verfügung. Vergleicht man die Ergebnisse der lokalen Expression von HSP60 und HSP70 im Gelbkörper- und Follikelgewebe der frühgraviden Hündin mit den Ergebnissen der nicht graviden Tieren, so zeigt sich, dass nicht nur die Serumkonzentrationen von HSP60 und 70 während der Frühträchtigkeit niedriger sind (Schäfer-Somi et al. 2019), sondern HSP60 und 70 auch lokal im Gewebe der Ovarien geringer exprimiert wird. Hingegen werden beide Hitzeschockproteine stark im Gelbkörpergewebe und Follikelgewebe nicht trächtiger Hündinnen exprimiert. Aktuell gibt es keine Studien, die sowohl die Serumkonzentration von Hitzeschockproteinen als auch die lokale Expression im Gewebe der weiblichen Keimdrüsen während der frühen Gravidität untersuchten. Vergleicht man allerdings die Pilotstudie von Schäfer-Somi et al. (2019) mit den Ergebnissen dieser Diplomarbeit, so zeichnet sich ab, dass die Serumkonzentrationen an Hitzeschockproteinen mit der lokalen Gewebeexpression positiv korrelieren. Diese Vermutung muss allerdings durch mehr Untersuchungen und Probanden erhärtet werden.

Betrachtet man die Expression von Kinase 67 und Caspase 3 im Ovar- und Plazentagewebe gravider und nicht gravider Hündinnen, so lässt sich erkennen, dass in dieser Arbeit Caspase 3 vorwiegend stark im Gelbkörpergewebe exprimiert wird, sowie im Myometrium der Plazenta zum Ende der Gravidität hin. Kinase 67 wird wiederum überwiegend im Follikelgewebe und dem Plazentalabyrinth exprimiert. Rodrigues et al. (2016) publizierte erste Erkenntnisse zur Expression von Kinase 67 und Caspase 3 in caninen Mammatumoren. Kinase 67 ist ein Non Histone Protein und gilt als lokaler Proliferationsfaktor von Zellen (Inwald et al. 2013, Klopffleisch et al. 2011), Caspase 3 wiederum gehört zur Familie der Cysteinproteasen und beeinflusst über intrinsische und extrinsische Wege die Apoptose (Degterev et al. 2003). In dieser Studie sollte die Expression beider Faktoren Auskunft über die Malignität der Mammatumore geben. Dabei zeigte sich, dass Kinase 67 stärker in malignen Tumoren exprimiert wurde, da die Proliferationsrate der Tumorzellen in malignen Tumoren höher als in benignen Tumoren ist. Caspase 3 wiederum wird stärker in gutartigen Tumoren exprimiert, da die Apoptoserate dieser Tumorzellen deutlich höher als die Proliferationsrate ist. Vergleicht man die Ergebnisse von Rodrigues et al. (2016) mit dieser Diplomarbeit so zeigt sich, dass Caspase 3 stärker im Gelbkörpergewebe nicht tragender Hündinnen exprimiert wird, vermutlich auf Grund der höheren Apoptoserate. Auch die Studie von Lee et al. (2016) zeigte ein ähnliches Ergebnis im Gelbkörpergewebe von Schafen. Es wurde eine hohe Aktivität von Caspase 3 im Corpus luteum von nicht graviden Schafen am Tag 16 des Östruszyklus detektiert, allerdings eine Unterdrückung der Expression von Caspase 3 im Corpus luteum am Tag 16 bei trächtigen Schafen festgestellt. Lee et al. (2016) unterstrichen die Wichtigkeit von Caspase 3 als Apoptosefaktor während der Luteolyse bei nicht graviden Schafen. Anhand der Ergebnisse dieser Pilotstudie kann davon ausgegangen werden, dass Caspase 3 auf Grund der Luteolyse, also dem Abbau des Gelbkörpergewebes, stärker in nicht graviden Hündinnen exprimiert wird. In allen Schichten der Plazenta wird Caspase 3 nur sehr gering exprimiert. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass zum Ende der Gravidität hin Caspase 3 deutlich im Myometrium der Plazenta exprimiert wird. Im letzten Drittel der caninen Trächtigkeit ist die Plazenta morphologisch fertig entwickelt und alle Zellen gänzlich ausdifferenziert, jedoch nimmt die strukturelle Kompaktheit des Myometriums der Plazenta als Vorbereitung auf die Geburt der Welpen zum Graviditätsende hin ab. Bei der Geburt selbst werden diese umstrukturierten Uterusbestandteile (= Decidua) schlussendlich abgestoßen (Aralla et al. 2013, Schnorr und Kressin 2011). Dieser Umbauprozess und Zellabbau des Myometriums am Graviditätsende könnte eine Erklärung sein, weshalb auch in dieser Studie die Expression von Caspase 3 im Myometrium zum Ende der Gravidität hin zunimmt, da Caspase 3 ein

wesentlicher Faktor für den physiologischen Zellabbau, die Apoptose, ist (Degterev et al. 2003). Kinase 67 wird kaum im Gelbkörpergewebe aller Gruppen exprimiert, dafür aber im Follikelgewebe und bei den graviden Hündinnen in allen Schichten der Plazenta. Vor allem zeigt sich ein Anstieg der Kinase 67 Expression zum Ende der Gravidität hin. Da die Plazenta im Verlauf der Gravidität zahlreichen Umbauprozessen unterliegt (Aralla et al. 2013, Miglino et al. 2006), lässt sich vermuten, dass damit auch die Expression des Proliferationsfaktors Kinase 67 zunimmt, da sich die Zellen der Plazenta vermehrt teilen und proliferieren. Weiters durchlaufen die Follikel in der Follikulogenese mehrere Entwicklungsstadien, vom Primordialstadium, bis hin zum ovulationsreifen Graaf'schen Follikel (Porras-Gómez und Moreno-Mendoza 2017, Zuckermann 1951). Daher zeichnet sich das Follikelgewebe durch viele Teilungs- und Proliferationsprozesse aus, was die vermehrte Expression von Kinase 67 erklären könnte. In dieser Arbeit konnte die Expression von Caspase 3 und Kinase 67 in der Plazenta während der Implantationsphase nicht aufgearbeitet werden, da für diese Studie keine Plazentaprobe während der Frühgravidität zur Verfügung standen. Gerade in dieser frühen Phase der Trächtigkeit wird das mütterliche Endometrium vermehrt umgebaut, um die Nidation des Embryos gewährleisten zu können. Die Gebärmutter Schleimhaut durchläuft den Prozess der Dezidualisierung (Su und Fazleabas 2015), das mütterliche Uterusepithel wird gänzlich abgebaut, sodass das Chorionepithel des Trophoblasten direkt an das Endothel der mütterlichen Kapillaren anschließt (Enders und Carter 2012). Demnach wäre die Expression von Caspase 3 und Kinase 67 als Marker für Apoptose und Proliferation in der caninen Plazenta während der frühen Trächtigkeit sicherlich interessant gewesen. Caspase 3 konnte bereits im Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten in der Plazenta von Kaninchen nachgewiesen werden (Liu et al. 2003), Kinase 67 im humanen Trophoblasten (Olvera et al. 2001). Generell ist aber die Expression von Caspase 3 und Kinase 67 während der Implantationsphase in der internationalen Literatur wenig beschrieben, diesbezügliche Ergebnisse bei der graviden Hündin gibt es derzeit noch nicht.

Schäfer-Somi et al. (2020) konnten erstmals HSP70 auch im caninen Synzytiotrophoblasten detektieren. Vor allem in der frühen Phase der Gravidität kommt es zu vielen Umbauprozessen des Endometriums. Die Uterindrüsen des caninen Endometriums schwellen an, produzieren vermehrt Sekret und nehmen eine tubuläre Form an (Aralla et al. 2013). In dieser Phase ist die Mitoserate der Zellen stark erhöht. HSP70 kann dabei die Zellen vor möglicher Denaturierung schützen (Hansen 2007). Eine Erklärung der Expression von HSP70 des Trophoblasten könnte Selbstschutz sein (Schäfer-Somi et al. 2020). Inwiefern Hitzeschockproteine während der Frühgravidität im Endometrium sezerniert werden, wird in dieser Diplomarbeit zwar nicht

bearbeitet, allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Expression von HSP60 und 70 in der Frühgravidität in den Ovarien, ab der Graviditätsmitte zeigt sich außerdem, dass Hitzeschockproteine auch in der Plazenta exprimiert werden.

Mit insgesamt 18 Hündinnen, 132 immunhistochemisch gefärbten Präparaten und über 1.000 ausgewerteten Bildern konnte bereits ein guter, erster Einblick zur Expression von Hitzeschockproteinen bei trächtigen und nicht trächtigen Hündinnen gewonnen werden. Allerdings sollten dieser Pilotstudie noch weitere Studien folgen, um weitere Aussagen zur Expression von Hitzeschockproteinen in der caninen Plazenta und dem Ovargewebe treffen zu können. Die Anzahl der trächtigen ($n = 9$) und nicht trächtigen ($n = 9$) Tiere sind in dieser Studie gleich groß. Dies ist sehr positiv, da sich die Ergebnisse von gravidem und nicht gravidem Ovar- und Plazentagewebe gut und aussagekräftig miteinander vergleichen lassen. Beurteilt man die vorliegenden Ergebnisse, so ist anzunehmen, dass Hitzeschockproteine im Ovargewebe stärker bei nicht graviden, als bei graviden Hündinnen exprimiert werden. Das Verteilungsmuster bei den Gruppen der graviden Hündinnen ist mit einer frühträchtigen Hündin ($n = 1$), sechs Hündinnen ($n = 6$) im Stadium „Graviditätsmitte“ und mit zwei Hündinnen ($n = 2$) ante partu recht unausgeglich und reduziert daher die Aussagekraft der Ergebnisse. Allerdings scheint es, dass die Expression von HSP60 und 70 im Verlauf der Gravidität zunimmt. Künftige Untersuchungen dieser Art mit einer ähnlichen Anzahl an Hündinnen in Frühgravidität, Graviditätsmitte und Endgravidität scheinen sinnvoll zu sein und könnten die Ergebnisse dieser Studie bekräftigen. Da die Anzahl der nicht-tragenden Hündinnen „Metöstrus, nicht gedeckt“ und „Metöstrus, gedeckt“ in dieser Studie annähernd gleich groß war, sind die Ergebnisse für nicht gravide Tiere durchaus aussagekräftig. In beiden Gruppen ist die Expression der Hitzeschockproteine HSP60 und 70 ähnlich stark. Es scheint demnach keinen großen Unterschied zu machen, ob eine Hündin im Metöstrus vor der Probenentnahme gedeckt wurde oder nicht.

In der Veterinärmedizin gibt es aktuell keine Studie zur Expression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 im Plazenta- und Ovargewebe gravider und nicht gravider Hündinnen. Auch die Expression von Caspase 3 als lokaler Apoptosefaktor und Kinase 67 als lokaler Proliferationsfaktor wurde bis dato im Gewebe von Ovarien und Plazenta im Zusammenhang mit der caninen Gravidität wenig untersucht. Da es derzeit noch an vergleichbaren Studien mangelt und die Expression von Hitzeschockproteinen im Plazenta- und Ovargewebe gravider und nicht gravider Hündinnen noch nicht untersucht wurde, können die Ergebnisse dieser

Diplomarbeit derzeit noch nicht mit anderen Ergebnissen verglichen werden, sondern dienen lediglich als erster Richtwert.

Zusammengefasst konnte in dieser Pilotstudie die Hypothese, dass Hitzeschockproteine bei graviden Hündinnen spezifisch und anders als bei nicht graviden Hündinnen exprimiert wird, vereinzelt durchaus bestätigt werden, wie die Ergebnisse der HSP-Expression im Gelbkörpergewebe zeigen. Im Follikelgewebe ist die Expression von HSP60 und 70 bei graviden und nicht graviden Hündinnen eher ausgeglichen. Alles in allem gibt diese Pilotstudie definitiv Anlass dazu, Plazenta- und Ovargewebe weiterer gravider und nicht gravider Hündinnen genauer zu untersuchen, sodass neue, weiterführende Erkenntnisse auf diese Pilotstudie folgen.

6 Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurde die Koexpression der Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 im Gewebe von Ovarien und Plazenta gravider und nicht gravider Hündinnen untersucht. Weiters wurden die Faktoren Kinase 67 und Caspase 3 beurteilt, um eine mögliche Aussage über die lokale Apoptose und Proliferation treffen zu können.

Daher wurde folgende Hypothese aufgestellt: *HSP60 und HSP70 werden im Verlauf der Frühgravidität, Graviditätsmitte und am Graviditätsende im Plazenta- und Ovargewebe gravider Hündinnen spezifisch und anders als bei nicht-tragenden Hündinnen exprimiert und außerdem sind Kinase67 und Caspase3 an der lokalen Apoptose und Proliferation beteiligt, wobei letzteres nur im Falle einer eventuellen Koexpression vermutet werden kann.*

Für diese Studie standen daher 18 vorberichtlich gesunde Hündinnen im Alter zwischen ein und drei Jahren zur Verfügung. Neun Hündinnen waren trächtig und befanden sich in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien und neun Tiere wiesen keine Gravidität auf. Alle Gewebeproben von Plazenta und Ovarien der 18 Hündinnen wurden mittels Immunhistochemie angefärbt, mikroskopisch beurteilt und fotografiert. Anschließend folgte eine statistische Auswertung der positiv gefärbten und negativen Zellen mit dem Computerprogramm FIJI und Microsoft Excel 2016.

Die wesentlichen, quantitativen Endergebnisse dieser Diplomarbeit zeigen, dass der Anteil an HSP70 und Kinase 67 positiven Zellen im Follikelgewebe in allen fünf Versuchsgruppen annähernd gleich groß war (84-100 % und 7,3-14,8 %). Im Gelbkörpergewebe fiel die Expression in allen fünf Gruppen gleichermaßen geringer aus (HSP70: 8-44 %, KI67: 0,6-1 %). Nach der qualitativen, beschreibenden Auswertung zeigte sich, dass die Expression von HSP60 im Follikelgewebe zum Ende der Gravidität hin am stärksten war, im Corpus luteum-Gewebe war die Expression von HSP60 bei nicht trächtigen und trächtigen Tieren annähernd gleich stark. Caspase 3 wurde nur vereinzelt im Follikelgewebe, aber stark im Gelbkörpergewebe exprimiert, wobei Caspase 3 am stärksten bei nicht tragenden Hündinnen exprimiert wurde.

Die Endauswertungen der Plazentaprobe zeigten, dass ein hoher Anteil der Zellen aller Plazentaschichten positiv angefärbt war. HSP70 wurde am stärksten im Myometrium der Plazenta exprimiert (Tag 35-40: 48,64 %, ~Tag 66: 83,67 %), wobei sowohl HSP60, als auch HSP70 in allen Schichten der Plazenta am Graviditätsende stärker exprimiert wurden als noch während der Graviditätsmitte. HSP60 wurde am Ende der Gravidität am stärksten im Plazentalabyrinth exprimiert. Kinase 67 wurde am stärksten in den Zellen der tiefen und

oberflächlichen Drüsenschicht sowie im Plazentalabyrinth exprimiert, Caspase 3 hingegen am stärksten im Myometrium, vor allem zum Ende der Gravidität hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 in Plazenta und Ovarien gravider und nicht gravider Hündinnen deutlich exprimiert werden. Dabei zeigt sich vor allem die Tendenz, dass die Anzahl an exprimierten Hitzeschockproteinen im Plazentagewebe im Verlauf der Trächtigkeit zunimmt. Dies kann als mögliche „Stressantwort“ auf die körperliche Belastung einer graviden Hündin angesehen werden, unter anderem die Vorbereitung des Körpers auf die Geburt der Welpen, die starke Zunahme an Körpergewicht, der umgestellte Hormonhaushalt sowie die Vorbereitung auf die Laktation. Ebenso zeigt sich eine vermehrte Expression von Kinase 67 und Caspase 3 in allen Schichten der Plazenta bei endgraviden Hündinnen. Die gesteigerte Expression von HSP60 und 70 parallel zur Caspase 3 könnte als physiologisches Regulationsmittel während der Geburt und der Plazentalösung dienen. Das Gleiche gilt möglicherweise auch für die Regulierung im Gelbkörpergewebe. Dies erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

Auf diese Pilotstudie sollten weitere immunhistochemische Untersuchungen von Plazenta- und Ovargewebe folgen, um genauere Aussagen zur spezifischen Expression von Hitzeschockproteinen bei graviden und nicht graviden Hündinnen liefern zu können.

7 Summary

In this diploma thesis, the co-expression of the heat shock proteins HSP60 and HSP70 in the tissue of the ovaries and placenta of pregnant and non-pregnant bitches was investigated. Moreover, the factors kinase 67 and caspase 3 were examined in order to draw conclusions on local apoptosis and proliferation.

Therefore, the following hypothesis was pronounced: *HSP60 and HSP70 are expressed in the course of early pregnancy, mid-pregnancy and end of pregnancy in the placenta and ovarian tissue of pregnant bitches specifically and differently than in non-pregnant bitches, and kinase67 and caspase3 are involved in local apoptosis and proliferation; however, the latter can only be assumed in the case of a possible co-expression.*

For this study, 18 healthy bitches one to three years old were used. Nine bitches were pregnant, all of them in different stages of pregnancy and nine animals showed no pregnancy. All tissue samples from the placenta and ovaries of the 18 bitches were stained immunohistochemically, analyzed microscopically and photographed for further evaluation. This was followed by a statistical analysis of the positive and negative cells with the computer program FIJI and Microsoft Excel 2016.

The essential, quantitative results of this thesis show that the percentage of HSP70 and kinase 67 positive cells in the follicular tissue was approximately the same in all five test groups (84-100 % and 7,3-14,8 %). In the corpus luteum, the expression was equally lower in all five groups (HSP70: 8-44 %, KI67: 0,6-1 %). The qualitative, descriptive evaluation demonstrated that the expression of HSP60 in the follicular tissue was strongest towards the end of pregnancy, in the corpus luteum tissue the expression of HSP60 was almost equal in non-pregnant and pregnant animals. Caspase 3 was only sporadically expressed in follicular tissue but highly in the luteal tissue, with caspase 3 being strongest expressed in non-pregnant bitches.

The final evaluation of the placenta samples showed a high percentage of cells from all placental layers stained positively. HSP70 was expressed most strongly in the myometrium of the placenta (day 35-40: 48,64 %, ~day 66: 83,67 %), with both HSP60 and HSP70 being expressed more strongly in all layers of the placenta at the end of pregnancy than during mid-pregnancy. HSP60 was most expressed in the placental labyrinth at the end of pregnancy. Expression of kinase 67 was highest in the cells of the deep and superficial glandular layer and in the placental labyrinth, whereas caspase 3 was most expressed in the myometrium, especially towards the end of pregnancy.

To summarize, heat shock proteins are clearly expressed in the placenta and ovaries of pregnant and non-pregnant bitches. The expression of heat shock proteins in placental tissue increased in the course of pregnancy and this might be a possible "stress response" to the physical strain of a pregnant bitch, like the preparation of the body for the birth of puppies, as well as the strong gain in body weight, the change in the hormone balance, and the preparation for lactation. Furthermore, there is also an increased expression of kinase 67 and caspase 3 in the placental tissues of end-gravid bitches. The increasing expression of HSP60 and 70 in parallel to caspase 3 might be a physiological part of the regulation of parturition and placental separation. Same may be applicable for the corpus luteum regulation. However, this requires more investigations. This pilot study should be followed by further immunohistochemical examinations of placental and ovarian tissues in order to provide more precise information on the specific expression of heat shock proteins in pregnant and non-pregnant bitches.

8 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMH	Anti-Müller Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etyhlendiamintetraessigsäure
FGF	Fibroblast growth Factor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HEK	Humane, embryonale Nierenzellen
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HRP	Horseradish Peroxidase
HSF	Heat Shock Factor
HSP	Heat Shock Protein
IGF	Insulin-like growth Factor
kDa	Kilodalton
KI67	Kinase 67
LH	Luteinisierendes Hormon
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat buffered saline
pH	Potential des Wasserstoffs
PHQ	Pharmaqualität
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TBST	Tris-buffered Saline with Tween
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WEK	Entionisiertes Wasser, kalt

9 Literaturverzeichnis

- Agashe VR, Hartl FU. 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11 (1): 15–25. DOI 10.1006/scdb.1999.0347.
- Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhauakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A. 2007. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research*, 67 (2): 616–625. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-1567.
- Andersen AC, Simpson ME. 1974. The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). *Theriogenology*, 1 (1): 39–42. DOI 10.1016/0093-691x(74)90062-4.
- Aralla M, Groppetti D, Caldarini L, Cremonesi F, Arrighi S. 2013. Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term, *Research in Veterinary Science*, 15–22. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.02.003.
- Baumgartner W. 2014. *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Bloise E, Ciarmela P, Dela Cruz C, Luisi S, Petraglia F, Reis FM. 2019. Activin A in Mammalian Physiology. *Physiological reviews*, 99 (1): 739–780. DOI 10.1152/physrev.00002.2018.
- Bond U, Schlesinger MJ. 1987. *Heat-Shock Proteins and Development*. Molecular Genetics of Development. : Elsevier, 1–29.
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution*, 38 (1): 1–17. DOI 10.1007/BF00175490.
- Bosch TC, Krylow SM, Bode HR, Steele RE. 1988. Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (21): 7927–7931. DOI 10.1073/pnas.85.21.7927.
- Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL, Sigler PB. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, 371 (6498): 578–586. DOI 10.1038/371578a0.
- Campanella C, Bavisotto CC, Gammazza AM, Nikolic D, Rappa F, David S, Cappello F, Bucchieri F, Fais S. 2014. Exosomal Heat Shock Proteins as New Players in Tumour Cell-to-Cell Communication. *Journal of Circulating Biomarkers*, 3: 4. DOI 10.5772/58721.
- Cappello F, Conway de Macario E, Marasà L, Zummo G, Macario AJL. 2008. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 7 (6): 801–809. DOI 10.4161/cbt.7.6.6281.
- Chastant-Maillard S, Viaris de Lesegno C, Chebrou M, Thoumire S, Meylheuc T, Fontbonne A, Chodkiewicz M, Saint-Dizier M, Reynaud K. 2011. The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 23 (3): 391–402. DOI 10.1071/RD10064.
- Chaves, R., Duarte, A. B. G., Rodrigues, G., Celestino, J. J. H., Silva, G. M., Lopes, C. A. P., Almeida, A. P., Donato, M. A. M., Peixoto, C. A., Moura, A. A. A., Lobo, C. H., Locatelli, Y., Mermillod, P., Campello, C. C., Figueiredo, J. R. 2012. The effects of insulin and follicle-stimulating hormone (FSH) during in vitro development of ovarian goat preantral follicles and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. *Biology of Reproduction*, 87 (3): 69. DOI 10.1095/biolreprod.112.099010.
- Chaves, R. N., Matos, M. H. T., Buratini, José, Figueiredo, J. R. 2012. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reproduction, Fertility and Development*, 24 (7): 905–915. DOI 10.1071/RD11318.

- Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL. 1990. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature*, 348 (6300): 455–458. DOI 10.1038/348455a0.
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, 246 (4928): 382–385. DOI 10.1126/science.2799391.
- Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 1988. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332 (6167): 805–810. DOI 10.1038/332805a0.
- Choi DH, Ha JS, Lee WH, Song JK, Kim GY, Park JH, Cha HJ, Lee BJ, Park JW. 2007. Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells. *FEBS letters*, 581 (8): 1649–1656. DOI 10.1016/j.febslet.2007.02.075.
- Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. 2004. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biology of Reproduction*, 70 (6): 1806–1813. DOI 10.1095/biolreprod.103.024166.
- Compton SA, Elmore LW, Haydu K, Jackson-Cook CK, Holt SE. 2006. Induction of nitric oxide synthase-dependent telomere shortening after functional inhibition of Hsp90 in human tumor cells. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (4): 1452–1462. DOI 10.1128/MCB.26.4.1452-1462.2006.
- Concannon P, Rendano V. 1983. Radiographic diagnosis of canine pregnancy: onset of fetal skeletal radiopacity in relation to times of breeding, preovulatory luteinizing hormone release, and parturition. *American Journal of Veterinary Research*, 44 (8): 1506–1511.
- Concannon P, Tsutsui T, Shille V. 2001. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 57: 169–179.
- Concannon PW. 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 Suppl 2: 3–15. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x.
- Concannon PW. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124 (3-4): 200–210. DOI 10.1016/j.anireprosci.2010.08.028.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 39: 3–25.
- Concannon PW, v. d. Castracane, Temple, M., & Montanez, A. 1999. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22 (53): 8543–8567. DOI 10.1038/sj.onc.1207107.
- Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, 332 (6167): 800–805. DOI 10.1038/332800a0.
- Dubaquié Y, Looser R, Rospert S. 1997. Significance of chaperonin 10-mediated inhibition of ATP hydrolysis by chaperonin 60. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (17): 9011–9016. DOI 10.1073/pnas.94.17.9011.
- Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction (Cambridge, England)*, 124 (5): 601–609. DOI 10.1530/rep.0.1240601.
- Durrant B, Pratt N, Russ K, Bolamba D. 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49 (5): 917–932. DOI 10.1016/S0093-691X(98)00041-7.

- Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 57 (3): 507–513. DOI 10.1095/biolreprod57.3.507.
- Enders AC, Carter AM. 2012. The evolving placenta: convergent evolution of variations in the endotheliochorial relationship. *Placenta*, 33 (5): 319–326. DOI 10.1016/j.placenta.2012.02.008.
- England GC, Allen WE. 1989. Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 39: 91–100.
- England GCW, Allen WE. 1990. Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: Diagnosis of early pregnancy and the number of conceptuses. *Journal of Small Animal Practice*, 31 (7): 321–323. DOI 10.1111/j.1748-5827.1990.tb00819.x.
- England GCW, Russo M, Freeman SL. 2009. Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 Suppl 2: 53–58. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01416.x.
- Enriquez AS, Rojo HM, Bhatt JM, Molugu SK, Hildenbrand ZL, Bernal RA. 2017. The human mitochondrial Hsp60 in the APO conformation forms a stable tetradecameric complex. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 16 (13): 1309–1319. DOI 10.1080/15384101.2017.1321180.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, 54 (1): 197–207. DOI 10.1095/biolreprod54.1.197.
- Foxcroft GR, Hunter MG, Grant SA. 1989. The physiology of follicular maturation in the pig. *Acta Physiologica Polonica*, 40 (1): 53–63.
- Fracella F, Rensing L. 1995. Stressproteine: Ihre wachsende Bedeutung in der Medizin. *Die Naturwissenschaften*, 82 (7): 303–309.
- Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. 2014. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 27 (1): 11–18. DOI 10.1293/tox.2013-0060.
- Gammazza AM, Bavisotto CC, David S, Barone R, Rappa F, Campanella C, Conway de Macario E, Cappello F, Macario AJL. 2017. HSP60 is a Ubiquitous Player in the Physiological and Pathogenic Interactions between the Chaperoning and the Immune Systems. *Current Immunology Reviews*, 13 (1). DOI 10.2174/1573395513666170412170540.
- Gao Y, Han C, Huang H, Xin Y, Xu Y, Luo L, Yin Z. 2010. Heat shock protein 70 together with its co-chaperone CHIP inhibits TNF-alpha induced apoptosis by promoting proteasomal degradation of apoptosis signal-regulating kinase1. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 15 (7): 822–833. DOI 10.1007/s10495-010-0495-7.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5 (22): 2592–2601. DOI 10.4161/cc.5.22.3448.
- Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355 (6355): 33–45. DOI 10.1038/355033a0.
- Gurbuxani S, Bruey JM, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jäätelä M, Martin F, Solary E, Garrido C. 2001. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene*, 20 (51): 7478–7485. DOI 10.1038/sj.onc.1204948.
- Hansen PJ. 2007. To be or not to be--determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 68 Suppl 1: S40-8. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.03.013.
- Hemberger M, Cross JC, Ropers HH, Lehrach H, Fundele R, Himmelbauer H. 2001. UniGene cDNA array-based monitoring of transcriptome changes during mouse placental development. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 98 (23): 13126–13131. DOI 10.1073/pnas.231396598.
- Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, 333 (6171): 330–334. DOI 10.1038/333330a0.
- Hlavaty J, Ertl R, Miller I, Gabriel C. 2016. Expression of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1), Progesterin and AdipoQ Receptor 7 (PAQPR7), and Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein (PAIRBP1) in Glioma Spheroids In Vitro. *BioMed Research International*, 2016: 8065830. DOI 10.1155/2016/8065830.
- Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. 2016. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction. *The Indian Journal of Medical Research*, 144 (2): 229–237. DOI 10.4103/0971-5916.195037.
- Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. 2013. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139 (2): 539–552. DOI 10.1007/s10549-013-2560-8.
- Ishida R, Okamoto T, Motojima F, Kubota H, Takahashi H, Tanabe M, Oka T, Kitamura A, Kinjo M, Yoshida M, Otaka M, Grave E, Itoh H. 2018. Physicochemical Properties of the Mammalian Molecular Chaperone HSP60. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2). DOI 10.3390/ijms19020489.
- Josso N. 2019. Women in reproductive science: Anti-Müllerian hormone: a look back and ahead. *Reproduction (Cambridge, England)*, 158 (6): F81-F89. DOI 10.1530/REP-18-0602.
- Kamada M, So A, Muramaki M, Rocchi P, Beraldi E, Gleave M. 2007. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (1): 299–308. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-06-0417.
- Karakas Alkan K, Ceylan A, Alkan H, Ozen D, Bayraktaroglu AG, Kaymaz M. 2019. Immunohistochemical and qPCR determination of the expression and serum level of anti-Müllerian hormone in pre-pubertal, intact and ovarian remnant syndrome detected bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 54 (7): 979–986. DOI 10.1111/rda.13451.
- Kaufmann SH. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today*, 11: 129–136. DOI 10.1016/0167-5699(90)90050-J.
- Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG, Fischer B. 1999. Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biology of Reproduction*, 60 (3): 551–557. DOI 10.1095/biolreprod60.3.551.
- Klopfleisch R, Euler H von, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD. 2011. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary Pathology*, 48 (1): 98–116. DOI 10.1177/0300985810390826.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D. 1998. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, 59 (4): 836–842. DOI 10.1095/biolreprod59.4.836.
- Kowalewski MP. 2014. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproductive Biology*, 14 (2): 89–102. DOI 10.1016/j.repbio.2013.11.004.
- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12 (3): 743–761. DOI 10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x.

- Lee J, Banu SK, McCracken JA, Arosh JA. 2016. Early pregnancy modulates survival and apoptosis pathways in the corpus luteum in sheep. *Reproduction (Cambridge, England)*, 151 (3): 187–202. DOI 10.1530/REP-15-0302.
- Levy-Rimler G, Viitanen P, Weiss C, Sharkia R, Greenberg A, Niv A, Lustig A, Delarea Y, Azem A. 2001. The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. *European Journal of Biochemistry*, 268 (12): 3465–3472. DOI 10.1046/j.1432-1327.2001.02243.x.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151–1191. DOI 10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22: 631–677. DOI 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.
- Lintern-Moore S, Moore GP. 1979. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 20 (4): 773–778. DOI 10.1095/biolreprod20.4.773.
- Liu Z, Sun Q-H, Yang Y, Liu J-M, Peng J-P. 2003. Effect of IFN γ on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta. *Cytokine*, 24 (5): 201–209. DOI 10.1016/j.cyto.2003.09.002.
- Lopate C. 2008. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*, 70 (3): 397–402. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.05.034.
- Macario AJ. 1995. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 25 (2): 59–70. DOI 10.1007/BF02592359.
- Macario AJL, Conway de Macario E. 2005. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *The New England Journal of Medicine*, 353 (14): 1489–1501. DOI 10.1056/NEJMra050111.
- Maniwa J, Izumi S, Isobe N, Terada T. 2005. Studies on substantially increased proteins in follicular fluid of bovine ovarian follicular cysts using 2-D Page and Maldi-Tof. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 3: 23. DOI 10.1186/1477-7827-3-23.
- Melinda E. Toth, Imre Gombos, Miklos Santha. 2015. Heat shock proteins and their role in human diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol.59 (Suppl.1): 121–141.
- Meyers-Wallen VN, Manganaro TF, Kuroda T, Concannon PW, MacLaughlin DT, Donahoe PK. 1991. The critical period for mullerian duct regression in the dog embryo. *Biology of Reproduction*, 45 (4): 626–633. DOI 10.1095/biolreprod45.4.626.
- Miglino MA, Ambrósio CE, dos Santos Martins D, Wenceslau CV, Pfarrer C, Leiser R. 2006. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes, *Theriogenology*, 1699–1702. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.02.027.
- Mizzen LA, Welch WJ. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *The Journal of Cell Biology*, 106 (4): 1105–1116. DOI 10.1083/jcb.106.4.1105.
- Moniruzzaman M, Miyano T. 2010. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals.
- Morimoto RI. 1991. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer cells (Cold Spring Harbor, N.Y. : 1989)*, 3 (8): 295–301.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (19): 7146–7159. DOI 10.1128/MCB.20.19.7146-7159.2000.

- Mosser DD, Morimoto RI. 2004. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 23 (16): 2907–2918. DOI 10.1038/sj.onc.1207529.
- Nagashima JB, Hansen BS, Songsasen N, Travis AJ, Place NJ. 2016. Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition. *Reproduction in Domestic Animals*, 51 (1): 158–164. DOI 10.1111/rda.12660.
- Nagashima JB, Wildt DE, Travis AJ, Songsasen N. 2019. Activin promotes growth and antral cavity expansion in the dog ovarian follicle. *Theriogenology*, 129: 168–177. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.02.018.
- Neudegger T, Verghese J, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Bracher A. 2016. Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23 (2): 140–146. DOI 10.1038/nsmb.3149.
- Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jäättelä M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of Experimental Medicine*, 200 (4): 425–435. DOI 10.1084/jem.20040531.
- Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M. 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (14): 7871–7876. DOI 10.1073/pnas.97.14.7871.
- Olvera M, Harris S, Amezcua CA, McCourty A, Rezk S, Koo C, Felix JC, Brynes RK. 2001. Immunohistochemical expression of cell cycle proteins E2F-1, Cdk-2, Cyclin E, p27(kip1), and Ki-67 in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 14 (10): 1036–1042. DOI 10.1038/modpathol.3880432.
- Onclin K, Murphy B, Verstegen JP. 2002. Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*, 57 (8): 1957–1972. DOI 10.1016/s0093-691x(02)00644-1.
- Ozaydin T, Sur E, Oznurlu Y, Celik I, Uluisik D. 2016. Immunohistochemical distribution of heat shock protein 70 and proliferating cell nuclear antigen in mouse placenta at different gestational stages. *Microscopy Research and Technique*, 79 (4): 251–257. DOI 10.1002/jemt.22624.
- Paranko, J., Seitz, J., Meinhardt, A. 1996. Developmental expression of heat shock protein 60 (HSP60) in the rat testis and ovary: Differentiation, 159–167. DOI 10.1046/j.1432-0436.1996.6030159.x.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304 (3): 505–512. DOI 10.1016/s0006-291x(03)00623-5.
- Peters H, McNatty KP. 1981. The Ovary . By Hannah Peters and Kenneth P. McNatty. Pp. 175. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 66 (1): 87. DOI 10.1113/expphysiol.1981.sp002533.
- Place NJ, Hansen BS, Cheraskin J-L, Cudney SE, Flanders JA, Newmark AD, Barry B, Scarlett JM. 2011. Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23 (3): 524–527. DOI 10.1177/1040638711403428.
- Poole DH, Ocón-Grove OM, Johnson AL. 2016. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granulosa cells. *Theriogenology*, 86 (5): 1353–1360. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.04.078.
- Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. 2017. Neo-oogenesis in mammals. *Zygote (Cambridge, England)*, 25 (4): 404–422. DOI 10.1017/S0967199417000363.

- Pretzer SD. 2008. Canine embryonic and fetal development: a review. *Theriogenology*, 70 (3): 300–303. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.04.029.
- Reynaud K, Chastant-Maillard S, Batard S, Thoumire S, Monget P. 2010. IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: is there a link? *The Journal of Endocrinology*, 206 (1): 85–92. DOI 10.1677/JOE-09-0450.
- Reynaud K, Fontbonne A, Saint-Dizier M, Thoumire S, Marnier C, Tahir MZ, Meylheuc T, Chastant-Maillard S. 2012. Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Suppl 6: 66–69. DOI 10.1111/rda.12055.
- Richardson A, Landry SJ, Georgopoulos C. 1998. The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends in Biochemical Sciences*, 23 (4): 138–143. DOI 10.1016/s0968-0004(98)01193-1.
- Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, 18 (12): 571–573. DOI 10.1007/BF02172188.
- Rodrigues H, Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. 2016. Clinicopathological significance of caspase-3 and Ki-67 expression in canine mammary gland tumours. *Acta Veterinaria Hungarica*, 64 (1): 78–89. DOI 10.1556/004.2016.009.
- Salveti NR, Baravalle C, Mira GA, Gimeno EJ, Dallard BE, Rey F, Ortega HH. 2009. Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (5): 805–814. DOI 10.1111/j.1439-0531.2008.01086.x.
- Samoto T, Maruo T, Ladines-Llave CA, Matsuo H, Deguchi J, Barnea ER, Mochizuki M. 1993. Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endocrine Journal*, 40 (6): 715–726. DOI 10.1507/endocrj.40.715.
- Schäfer-Somi S, Aksoy OA, Ergene O, Darbaz I, Herkner KR, Aslan S. 2019. First detection of heat shock protein 60 and 70 in the serum of early pregnant bitches. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67 (3): 445–455. DOI 10.1556/004.2019.044.
- Schäfer-Somi S, Gabriel C, Aslan S. 2020. Embryo-maternal communication in dogs: Immune system related factors. *Theriogenology*, 150: 382–387. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.02.019.
- Schlesinger MJ. 1990. Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (21): 12111–12114. DOI 10.1016/S0021-9258(19)38314-0.
- Schnorr B, Kressin M. 2011. *Embryologie der Haustiere*. 14 Tabellen. Sechste., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Enke, 276.
- Serafim MKB, Duarte ABG, Silva GM, Souza CEA, Magalhães-Padilha DM, Moura AAA, Silva LDM, Campello CC, Figueiredo JR. 2015. Impact of growth hormone (GH) and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro canine preantral follicle development and estradiol production. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 25 (2): 85–89. DOI 10.1016/j.ghir.2014.12.009.
- Serafim MKB, Silva GM, Duarte ABG, Araújo VR, Silva TFP, Lima AKF, Chaves RN, Campello CC, Silva LDM, Figueiredo JR. 2013. High insulin concentrations promote the in vitro growth and viability of canine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, 25 (6): 927–934. DOI 10.1071/RD12074.
- Shah M, Stanek J, Handwerger S. 1998. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *The Histochemical Journal*, 30 (7): 509–518. DOI 10.1023/A:1003259907014.

- Silva JRV, Figueiredo JR, van den Hurk R. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 71 (8): 1193–1208. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.12.015.
- Sirotkin AV. 2011. Growth factors controlling ovarian functions. *Journal of cellular physiology*, 226 (9): 2222–2225. DOI 10.1002/jcp.22588.
- Sirotkin AV, Bauer M. 2011. Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones. *Cell stress & chaperones*, 16 (4): 379–387. DOI 10.1007/s12192-010-0252-4.
- Songsasen N, Fickes A, Pukazhenthil BS, Wildt DE. 2009. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 Suppl 2: 65–70. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01424.x.
- Songsasen N, Nagashima J. 2020. Intraovarian regulation of folliculogenesis in the dog: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 55 Suppl 2: 66–73. DOI 10.1111/rda.13657.
- Su R-W, Fazleabas AT. 2015. Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 216: 189–213. DOI 10.1007/978-3-319-15856-3_10.
- Tabibzadeh S, Broome J. 1999. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 7 (1-2): 5–9. DOI 10.1155/S1064744999000022.
- Toal RL, Walker MA, Henry GA. 1986. A comparison of real-time ultrasound, palpation and radiography in pregnancy detection and litter size determination in the bitch. *Veterinary Radiology*, 27 (4): 102–108. DOI 10.1111/j.1740-8261.1986.tb00013.x.
- Tsutsui T, Stewart DR. 1991. Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *The Journal of veterinary medical science*, 53 (6): 1025–1029. DOI 10.1292/jvms.53.1025.
- van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63 (6): 1717–1751. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005.
- Verstegen-Onclin K, Verstegen J. 2008. Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology*, 70 (3): 291–299. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.04.038.
- Vilasi S, Carrotta R, Mangione MR, Campanella C, Librizzi F, Randazzo L, Martorana V, Marino Gammazza A, Ortore MG, Vilasi A, Pocsfalvi G, Burgio G, Corona D, Palumbo Piccionello A, Zummo G, Bulone D, Conway de Macario E, Macario AJL, San Biagio PL, Cappello F. 2014. Human Hsp60 with its mitochondrial import signal occurs in solution as heptamers and tetradecamers remarkably stable over a wide range of concentrations. *PloS one*, 9 (5): e97657. DOI 10.1371/journal.pone.0097657.
- Welch WJ, Mizzen LA. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *The Journal of Cell Biology*, 106 (4): 1117–1130. DOI 10.1083/jcb.106.4.1117.
- Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. 1999. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, 748–751. DOI: 10.1016/s0741-5214(99)70329-0.
- Wildt DE, Levinson CJ, Seager SW. 1977. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *The Anatomical Record*, 189 (3): 443–449. DOI 10.1002/ar.1091890305.
- Wildt DE, Panko WB, Chakraborty PK, Seager SW. 1979. Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction*, 20 (3): 648–658. DOI 10.1095/biolreprod20.3.648.
- Wimsatt WA. 1975. Some comparative aspects of implantation. *Biology of Reproduction*, 12 (1): 1–40. DOI 10.1095/biolreprod12.1.1.

- Witkin SS, Kanninen TT, Sisti G. 2017. The Role of Hsp70 in the Regulation of Autophagy in Gametogenesis, Pregnancy, and Parturition. In: MacPhee DJ, Hrsg. The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive System Development and Function. Cham: Springer International Publishing, 117–127.
- Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen V, Vannerson L, Concannon PW. 1992. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. *American Journal of Veterinary Research*, 53 (3): 342–351.
- Young RA. 1990. Stress proteins and immunology. *Annual review of immunology*, 8: 401–420. DOI 10.1146/annurev.iy.08.040190.002153.
- Zettervall S., Shuja F., Schermerhorn M., Hrsg. 2017. Primer on cerebrovascular diseases. Zweite., aktualisierte Auflage. Place of publication not identified: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Zhao J, Taverne MAM, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. 2002. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. *Zygote* (Cambridge, England), 10 (1): 85–94. DOI 10.1017/s0967199402002125.
- Zlotnik I. 1994. Comparative study of spermatogenesis and oogenesis in dog, cat and rabbit. The University of Edinburgh, Department of Zoology.
- Zuckermann S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res.*, 63–109.

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Plazenta des Hundes im fortgeschrittenen Stadium	4
Abb. 2 Entwicklungsstadien der Follikel in Ovarien der Säugetiere (Moniruzzaman und Miyano 2010).....	6
Abb. 3 Follikulogenese und Ovulation bei Säugetieren (Songsasen und Nagashima 2020)	6
Abb. 4 Schematische Darstellung vollständig entwickelter Fruchthüllen mit umliegender Gürtelplazenta (Schnorr und Kressin 2011)	10
Abb. 5 Bildliche Darstellung der Funktionen von Hitzeschockproteinen (Whitley et al. 1999)...	11
Abb. 6 Graphische Darstellung des Alters der beprobten Hündinnen	17
Abb. 7 Graphische Darstellung des Gewichts der beprobten Hündinnen	17
Abb. 8 Western Blot - Analyse (HSP 60).....	20
Abb. 9 Western Blot Analyse (HSP 70)	21
Abb. 10 Immunhistochemische Färbemethode	22
Abb. 11 Immunhistochemisch angefärbtes Follikelgewebe einer Hündin in Endgravidität	30
Abb. 12 Immunhistochemisch angefärbtes Gelbkörpergewebe einer Hündin in Endgravidität. 31	
Abb. 13 Immunhistochemisch angefärbtes Plazentalabyrinth einer Hündin in Endgravidität... 32	
Abb. 14 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von HSP70 in den Ovarien nach Gruppierung	33
Abb. 15 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von HSP70 in der Plazenta nach Gruppierung	34
Abb. 16 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von KI67 in den Ovarien nach Gruppierung	35
Abb. 17 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von KI67 in der Plazenta nach Gruppierung	36
Abb. 18 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit HSPD1 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung	38
Abb. 19 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit HSPD1 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung.....	38
Abb. 20 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit HSPD1 im Follikelgewebe nach Gruppierung	39
Abb. 21 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit HSPD1 im Follikelgewebe nach Gruppierung	39
Abb. 22 Graphische Darstellungen der Menge und Intensität der Anfärbung mit HSPD1 in der Plazenta nach Gruppierung	40
Abb. 23 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit Caspase 3 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung.....	42
Abb. 24 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit Caspase 3 im Gelbkörpergewebe nach Gruppierung.....	42
Abb. 25 Graphische Darstellungen der Menge der Anfärbung mit Caspase 3 im Follikelgewebe nach Gruppierung	43
Abb. 26 Graphische Darstellungen der Intensität der Anfärbung mit Caspase 3 im Follikelgewebe nach Gruppierung.....	43
Abb. 27 Graphische Darstellungen der Menge und Intensität der Anfärbung mit Caspase 3 in der Plazenta nach Gruppierung (TDS = Tiefe Drüsenschicht, ODS = Oberfl. Drüsenschicht, SDS = Spongiöse Drüsenschicht).....	44

11 Anhang

Number	Name	Status	Tage	Gewebe- proben	Rasse	Alter in Monaten	Gewicht (kg)	Ort der Probenentnahmen
1	Şaziye	Diöstrus	15	Ovar, UT	Mischling	18	24	Ondokuz Mayıs University, Türkei
2	Karam	Diöstrus	15	CL, UT	Mischling	18	21	Ondokuz Mayıs University, Türkei
3	Gece	Diöstrus	15	Ovar, UT	Mischling	24	16	Ondokuz Mayıs University, Türkei
4	Robin	Diöstrus	15	Ovar, UT	King Charles Spaniel	48	13	Ondokuz Mayıs University, Türkei
5	Bardo	Trächtigkeit	16-18	Ovar, UT	Mischling	24	16	Ondokuz Mayıs University, Türkei
6	Fıstık	Trächtigkeit	30-35	CL, PL, UT	Mischling	30	12	Ondokuz Mayıs University, Türkei
7	Albeni	Trächtigkeit	30-35	CL, PL, UT	Mischling	36	24	Ondokuz Mayıs University, Türkei
8	Damak	Trächtigkeit	30-35	CL, PL, UT	Mischling	18	26	Ondokuz Mayıs University, Türkei
9	Tobleron	Trächtigkeit	35-40	Ovar, PL, UT	Mischling	36	18	Ondokuz Mayıs University, Türkei
10	Godiva	Trächtigkeit	35-40	Ovar, PL, UT	Mischling	36	22	Ondokuz Mayıs University, Türkei
11	Fıttık	Trächtigkeit	35-40	CL, PL, UT	Terrier	120	9	Ondokuz Mayıs University, Türkei
12	Dost	befruchtet-nicht trächtig	10-12	Ovar, UT	Mischling	10	22	Ondokuz Mayıs University, Türkei
13	Zeytin	befruchtet-nicht trächtig	10-12	CL, UT	Mischling	48	16	Ondokuz Mayıs University, Türkei

14	Rasha	befruchtet-nicht trächtig	10-12	CL, UT	Mischling	30	18	Ondokuz Mayıs University, Türkei
15	Rex	befruchtet-nicht trächtig	10-12	CL, UT	Mischling	8	12	Ondokuz Mayıs University, Türkei
16	Suzan	befruchtet-nicht trächtig	10-12	CL, UT	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	Ondokuz Mayıs University, Türkei
17	Lola	Trächtigkeit - Kaiserschnitt	~66	Ovar, PL, Uterus	Franz. Bulldogge	34	10	Veterinärmedizinische Universität Wien
18	Boncuk	Trächtigkeit - Kaiserschnitt	~66	Ovar, PL, Uterus	Yorkshire Terrier	12	2,5	Veterinärmedizinische Universität Wien

CL = Corpus luteum, PL = Plazenta, UT = Uterus