

Aus der  
Frauenklinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. W. Janni

**Regulation des VEGF-Systems  
in endometrialen Stromazellen:  
Untersuchungen zur mRNA-Expression der  
Rezeptoren VEGFR1 und sFlt-1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Anne Kathrin Volkmer

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Jan-Steffen Krüssel  
Korreferent: PD Dr. rer. nat. Dr. med. Günther Giers

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ang-1/-2	Angiopoietin-1/-2
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementary DNA
DAB	Diaminobenzidin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DEPC	Dyethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serum
Ig	Immunglobulin
IGFBP-1	Insuline-Like Growth Factor Binding Protein-1
IGFBP-rP1	IGFPB-related Protein-1
ILGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
KDR	Fetal Liver Kinase Insert Domain Receptor

LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	Messenger-RNA
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
P	Progesteron
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PRL	Prolaktin
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotation Per Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR zur Amplifikation von RNA; vor der PCR erfolgt initial eine Umschreibung der DNA in RNA durch Reverse Transkriptase
sFlt-1	Soluble VEGFR1
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TGF- $\alpha$	Transforming Receptor Growth Factor- $\alpha$
TIE-2	Angiopoietinrezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1	Fms-Like Thyrosinkinase-1

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Physiologie des Endometriums und des menstruellen Zyklus .....	2
1.1.1.	Das Endometrium .....	2
1.1.2.	Der Menstruationszyklus.....	3
1.2.	Physiologie der frühen Embryonalentwicklung und der embryonalen Implantation .....	5
1.2.1.	Präimplantation .....	5
1.2.2.	Embryonale Implantation .....	6
1.3.	Endometriale Rezeptivität und molekulare Grundlagen der Implantation .....	7
1.3.1.	Hormonelle Faktoren .....	7
1.3.2.	Dezidualisierung .....	8
1.4.	Angiogenese bei der embryonalen Implantation .....	9
1.5.	Das Vascular-Endothelial-Growth-Factor-(VEGF-) System .....	10
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1.	Arbeiten mit primären endometrialen Stromazellen .....	15
2.1.1.	Zellkulturmedien.....	15
2.1.2.	Extraktion der Zellen aus nativem Gewebe .....	16
2.1.3.	Passagieren der Zellen .....	17
2.1.4.	Dezidualisierung der Stromazellen .....	17
2.1.5.	Zellkulturexperimente.....	18
2.2.	Histologische Techniken.....	19
2.2.1.	Immunhistochemische Färbung von Zell-Monolayern .....	19
2.3.	Arbeiten mit RNA aus endometrialen Stromazellen .....	20
2.3.1.	RNA Isolierung aus Zellkulturen .....	20
2.3.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	21
2.3.3.	Reverse Transkription von extrahierter RNA .....	21
2.3.4.	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) .....	22
2.3.5.	Kontrolle der reversen Transkription durch $\beta$ -Actin PCR.....	23
2.3.6.	Kontrolle der Dezidualisierung durch Prolaktin-PCR und Multiplex PCR .....	25
2.3.7.	PCR der VEGF-Rezeptoren.....	26
2.3.8.	Kompetitive PCR der VEGF-Rezeptoren.....	26
2.4.	Agarosegelelektrophorese.....	29
2.5.	Datenanalyse.....	30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1.	Kontrolle der Reinheit der endometrialen Stromazellkulturen .....	31

3.2.	β-Actin Expression der endometrialen Stromazellen .....	31
3.3.	Dezidualisierungsnachweis .....	32
3.4.	Expression der VEGF-Rezeptoren in endometrialen Stromazellen unter dem Einfluss von Östrogen und Progesteron sowie VEGF.....	34
3.4.1.	Nachweis der VEGF-Rezeptoren in endometrialen Stromazellen durch PCR .....	34
3.4.2.	Nachweis der VEGF-Rezeptoren in endometrialen Stromazellen durch kompetitive PCR unter dem Einfluss von Östrogen und Progesteron sowie VEGF.....	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>53</b>
	<b>Herrn Professor Dr. med. J.S. Krüssel danke ich für die Überlassung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Für seine uneingeschränkte Unterstützung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Seine fachliche Kompetenz und sein Engagement werden mir immer ein Vorbild sein.....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>54</b>

## 1. Einleitung

Unerfüllter Kinderwunsch betrifft in Europa schätzungsweise 12-15% der Paare im reproduktionsfähigen Alter. Verschiedene Methoden stehen bei der Behandlung von ungewollter Kinderlosigkeit durch die Reproduktionsmedizin zur Verfügung. Die Techniken der assistierten Reproduktion reichen vom reinen Zyklusmonitoring mit Bestimmung des Ovulationstermins und Empfehlung zum Geschlechtsverkehr am optimalen Konzeptionszeitpunkt über die leichte Stimulationsbehandlung mit medikamentös induzierter Ovulation und anschließender intrauteriner Insemination von aufbereiteten Spermien bis hin zur in vitro Fertilisation (IVF).

Die assistierte Reproduktion hat vielen Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch geholfen, jedoch führen nach erfolgreicher Fertilisierung nur durchschnittlich 25% der Embryotransfers zu einer erfolgreichen Schwangerschaft, die „baby-take-home“-Rate (Anzahl der Geburten pro Anzahl der durchgeführten Behandlungen [%]) liegt sogar nur bei durchschnittlich 20% [Deutsches IVF-Register (DIR), 2008]. Um diese Rate verbessern zu können, wird die menschliche Reproduktion extensiv erforscht.

Nach erfolgter Befruchtung müssen verschiedene Grundvoraussetzungen für die Implantation, den Beginn einer intrauterinen Schwangerschaft, erfüllt sein. Während der Embryo in vier bis fünf Tagen durch die Tuba uterina wandert und einen physiologischen Reifungsprozess durchläuft, entsteht im Uterus das empfangsbereite Endometrium. Dieser Vorgang benötigt eine genaue Synchronisation von Blastozystenreifung und der Vorbereitung des Endometriums und schon kleine Abweichungen von diesem Zeitplan können eine erfolgreiche Implantation verhindern.

Während des Menstruationszyklus wird das Endometrium auf die mögliche Implantation eines Embryos vorbereitet, dies umfasst den zyklischen Auf- und Umbau des Gewebes sowie die Sekretion verschiedener endometrialer Proteine. Die Entstehung eines dichten Netzwerks an Blutgefäßen, ausgehend von den nach der Menstruation noch vorhandenen Gefäßstümpfen des Endometriums, spielt dabei eine entscheidende Rolle. Neben dem Ovar ist die Gebärmutter Schleimhaut das einzige Organ im adulten Organismus, in dem physiologisch Angiogenese stattfindet. Angiogenese ist definiert als Aussprossung neuer Blutgefäße durch Teilung und Migration aus bereits bestehenden Endothelzellen und tritt sonst nur bei der Embryonalentwicklung

oder unter pathologischen Bedingungen wie z.B. beim Wachstum von Tumoren auf [63][102].

Auch für die Implantation ist Angiogenese unabdingbar. Für eine suffiziente Nährstoff- und Sauerstoffversorgung muss der Embryo Anschluss an das mütterliche Gefäßsystem finden und der uteroplazentare Kreislauf entstehen [52].

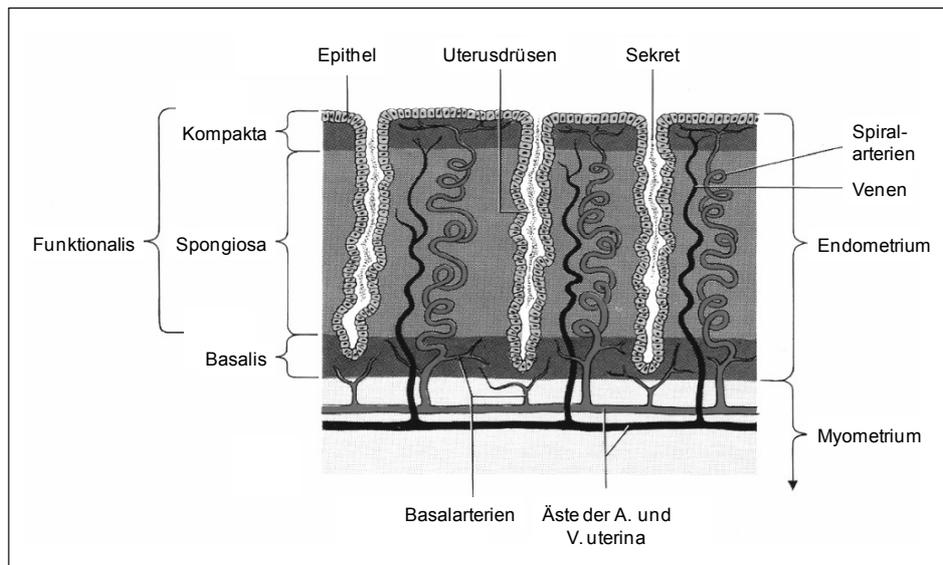
Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der durch viele verschiedene Faktoren reguliert wird. Das Wissen über die Angiogenese im zyklischen Endometrium, bei der embryonalen Implantation und die bei der Implantation stattfindende embryonale-maternale Kommunikation ist trotz seiner großen Bedeutung limitiert. Die Erforschung der molekularen Zusammenhänge soll zu einem besseren Verständnis beitragen und wird zur Verbesserung der Implantations- und Schwangerschaftsraten bei der assistierten Reproduktion, Entwicklung von neuen Kontrazeptionsstrategien und zur Prävention bzw. Therapie von extrauterinen Graviditäten beitragen.

## **1.1. Physiologie des Endometriums und des menstruellen Zyklus**

### **1.1.1. Das Endometrium**

Das Endometrium ist die Schleimhaut, die das Cavum uteri auskleidet, es sitzt auf einer Schicht glatter Muskulatur, dem Myometrium. Es besteht hauptsächlich aus einer epithelialen Zellpopulation, welche sich in das Oberflächenepithel und die verschiedenen glandulären, epithelialen Zellen unterteilt, sowie aus einer speziellen Art von Fibroblasten, dem Stroma. Die Stromazellen haben die Fähigkeit, sich in Dezidualzellen zu transformieren, wenn die Implantation eines Embryos beginnt [3].

Morphologisch und funktionell wird das Endometrium in zwei Schichten unterteilt, die Zona basalis und die Zona funktionalis, die ohne scharfe Grenzen ineinander übergehen (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Schematischer Aufbau des humanen Endometriums [59]**

Die Basalis liegt als dünne Schicht direkt dem Myometrium an. Sie ist zellreicher als der restliche Teil des Endometriums und enthält die Endabschnitte der Uterusdrüsen. Die Basalis hat eine eigene Blutversorgung und wird während der Menstruation nicht abgestoßen. Die Funktionalis liegt über der Basalis und unterteilt sich wiederum in die etwas dickere Zona Spongiosa und die dünnere, oberflächliche Zona Kompakta. Die Schicht der Spongiosa ist durch ödematöses Stroma und erweiterte und gewundene Drüsenkanäle charakterisiert, die Kompakta besteht dahingegen hauptsächlich aus dichtgepackten, um die Drüsenhäuse gruppierten Stromazellen [84].

Die zyklischen Veränderungen des Endometriums spielen sich in der Funktionalis ab, sie löst sich bei der Menstruation und bei der Geburt von der Basalis ab und wird dann im Verlauf des Menstruationszyklus wieder aufgebaut.

Im ganzen Endometrium verteilt finden sich proliferierende Blutgefäße. Die basal liegenden Arterien verzweigen sich in der Funktionalis in die terminalen Spiralarterien auf, die dann in periglanduläre und subepitheliale Kapillaren übergehen.

### 1.1.2. Der Menstruationszyklus

Während der Menstruation löst sich die Funktionalis von der unteren Schicht, der Basalis ab. Als Beginn des Menstruationszyklus wird der erste Tag der Menstruation

definiert. Der reguläre Menstruationszyklus beträgt  $28 \pm 2$  Tage und wird in die Sekretions- und Proliferationsphase unterteilt. Die Proliferationsphase umfasst die erste Hälfte des Zyklus (ca. Tag 5- Tag 14) und dient dem Aufbau des Endometriums. Es verdickt sich um das Zwei- bis Dreifache, die Stromazellen proliferieren stark und es kommt zur Bildung eines neuen Oberflächenepithels und neuer Drüsenzellen aus den in der Zona Basalis enthaltenen Drüsenstümpfen. Auch die Spiralarterien wachsen von den in der Basalis ausgehenden Arterien. Die Proliferationsphase entspricht zeitlich der Follikelphase des ovariellen Zyklus, ungefähr am Tag 14 findet der Eisprung statt.

Es folgt die Sekretionsphase, die von der Ovulation bis zur menstruellen Abstoßung der Uterusschleimhaut dauert. In dieser Phase setzt sich das Wachstum der Uterusdrüsen fort, die Proliferation der Endothelzellen und das Wachstum der Spiralarterien dauern an. Von den Uterusdrüsen wird ein glykogenreiches Sekret abgesondert, welches die erweiterten und geknäulten Drüsenschläuche ausfüllt, man nennt dies auch sekretorische Transformation. Glykogen und Lipide werden zudem in den Stromazellen eingelagert, was zu einer weiteren Verdickung des Endometriums führt. Die Sekretionsphase entspricht zeitlich der Lutealphase des ovariellen Zyklus. Sie entspricht dem Zeitpunkt für die Vorbereitung des Endometriums auf die embryonale Implantation. Ovuliert eine Oozyte und wird befruchtet, so implantiert sich der entstandene Embryo in der Regel um den sechsten Tag der Sekretionsphase, also um den 20. Tag des Menstruationszyklus, in das Endometrium. Erfolgt keine Befruchtung, so kommt es zur Regression des sekretorisch transformierten Endometriums und dieses wird unter Erhalt der Zona basalis in Form der Menstruationsblutung abgestoßen.

Hormonell gesteuert wird der Zyklus vor allem durch die im Ovar gebildeten Steroidhormone Östradiol und Progesteron. In der Proliferationsphase bilden und sezernieren die Granulosazellen des wachsenden Follikels vermehrt Östradiol, welches die Proliferation des Endometriums bewirkt. In der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus kommt es mit der Bildung des Corpus luteum zur Sekretion von Progesteron, welches zur Ausbildung eines rezeptiven Endometriums durch sekretorische Differenzierung der endometrialen Zellen führt. Findet keine Befruchtung statt, so degeneriert das Corpus luteum um Tag 12 bis 14 nach der Ovulation, wodurch die Progesteron-

ron- und Östrogenspiegel sinken und es kommt zum enzymatischen Abbau des Endometriums. Es folgt die Menstruation [16][67].

## **1.2. Physiologie der frühen Embryonalentwicklung und der embryonalen Implantation**

### **1.2.1. Präimplantation**

Die Fertilisierung der Oozyte findet ca. 6-12 Stunden nach der Ovulation in der Ampulla tubae uterinae statt. Die daraus entstehende Zygote wandelt sich über in ca. 12-stündlichem Abstand synchronisiert in allen Zellen stattfindend vier Furchungsteilungen in die 12- bis 16-zellige sogenannte Morula um. Nach dem 8-Zellstadium verlieren die Blastomeren (Zellen des Embryos) ihre Fähigkeit zur Totipotenz, es differenzieren sich der spätere embryonale Anteil (Embryoblast) und der plazentare Anteil (Trophoblast) [64]. Der Beginn dieser Differenzierung lässt sich durch die Expression von humanem Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG) bestimmen.  $\beta$ -HCG konnte bereits im 8-Zell-Embryo nachgewiesen werden [7], es ist somit eines der frühesten Produkte des Embryos. Ab der dritten Furchungsteilung beginnt die Aktivierung des embryonalen Genoms mit Transkription und Translation von embryonaler mRNA. Die Blastomere produzieren mit zunehmender eigener Genaktivität schon Peptide und Proteine, welche auch sezerniert werden [77]. Solche frühen embryonalen Signale konnten unter anderem für VEGF und das Interleukin-1-System auf m-RNA-Ebene nachgewiesen werden [45][49][77].

Nach drei bis vier Tagen erreicht der Embryo das Cavum uteri [11], es kommt zur Kompaktion der einzelnen Blastomere zu einem dichten Verband, der Morula (32-zellig). In diesem Stadium lassen sich lichtmikroskopisch keine einzelnen Zellen mehr abgrenzen.

Mit weiterer Zellteilung bildet sich die so genannte Blastozyste, die durch eine innere Masse (Embryoblast), dem späteren Embryo und eine äußere Zellschicht (Trophoblast), dem später extraembryonalen Gewebe, gekennzeichnet ist. Bevor der Embryo sich an der Uteruswand anhaftet, schlüpft er am fünften bis sechsten Tag nach der Befruchtung, indem er seine Hülle, die Zona pellucida, mit Hilfe perforierender Trophoblastenfortsätze aufsprengt [11], daraufhin beginnt die Phase der Implantation.

### 1.2.2. Embryonale Implantation

Am sechsten bis siebten Tag nach der Ovulation implantiert sich der Embryo im Blastozystenstadium im Endometrium [5], dieser dynamische Vorgang ist neun bis zehn Tage post conceptionem beendet.

Der Ablauf der Implantation wird in drei Phasen unterteilt: 1. Apposition, 2. Adhäsion und 3. Invasion [77].

Die Apposition stellt die erste, instabile Positionierung des Embryos an der Uteruswand dar. Der Trophoblastenteil der Blastozyste differenziert sich in einen den Embryo direkt umgebenden Anteil, den Zytotrophoblasten und in einen in das endometriale Stroma wachsenden Anteil, den Synzytiotrophoblasten. Bei der Apposition kommt es bereits zu Kontakt der Mikrovilli des polarisierten Trophoblasten mit den Pinopodien des Endometriums. Als nächster Schritt folgt die stabile Adhäsion, die durch zunehmende Interaktion zwischen der Blastozyste und dem Epithel des Uterus gekennzeichnet ist. Kurz danach beginnt die Invasion des Embryos, dabei durchdringt der Synzytiotrophoblast die Epithelschicht und die Basalmembran des Endometriums, um sich im uterinen Stroma einzunisten. Schließlich dringt er durch das gesamte Endometrium [68]. Dieser Prozess setzt den Trophoblasten in direkten Kontakt mit maternalem Blut und resultiert in der Bildung des uteroplazentaren Kreislaufs [64].

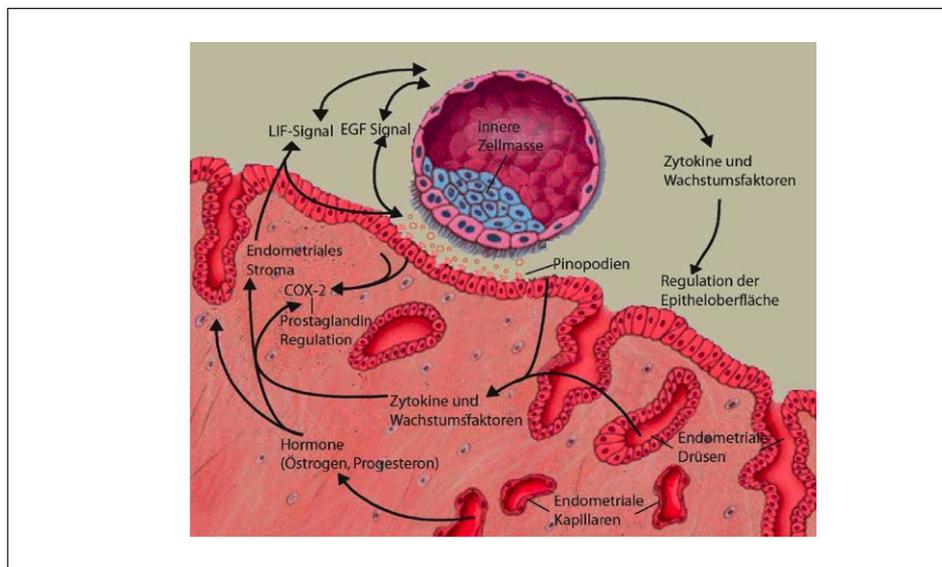
Am zehnten Tag nach der Befruchtung ist der Embryo komplett im uterinen Stroma eingebettet und die Implantationsstelle wieder mit Uterusepithel bedeckt [64].

In der ersten Phase der Implantation wird der Embryo hauptsächlich durch Osmose und Diffusion zwischen Embryo und extrazellulärer Matrix des endometrialen Stromas ernährt. Dazu dezidualisieren die Stromazellen. Sie vergrößern sich stark und nehmen reichlich Lipide und Glykogen auf. Diese Versorgung durch das sogenannte histiotrophe Prinzip geht über in die hämatotrophe Ernährung [35].

Um die Implantation erfolgreich abzuschließen und die Frühschwangerschaft aufrecht zu erhalten, ist also der Anschluss des Embryos an das maternale Gefäßsystems notwendig [52], die Induktion von Angiogenese durch den Embryo ist zwingend erforderlich. Am neunten Tag nach der Ovulation bilden sich im Synzytiotrophoblas-

ten lakunäre Hohlräume, welche mit maternalem Blut aus den Spiralarterien und mit dem Sekret der Uterusdrüsen gefüllt werden. Im weiteren Verlauf vereinigen sich die Lakunen mit den Uterusgefäßen und am zwölften Tag nach der Ovulation entsteht der uteroplazentare Kreislauf, welcher dem Durchfluss des mütterlichen Blutes durch das plazentare Lakunensystem entspricht [59].

Die Schritte der Implantation sind Folge eines komplexen embryomaternalen Dialogs, welcher teilweise durch verschiedene molekulare Mechanismen mit parakrinen oder autokrinen Effekten erklärt werden kann (siehe Abb. 2).



**Abb. 2: Präimplantationsblastozyste bei der Implantation [77]**

### 1.3. Endometriale Rezeptivität und molekulare Grundlagen der Implantation

Das Endometrium wird als rezeptiv bezeichnet, wenn sich die Blastozyste einnisten kann [71]. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Zeitpunkt bei einem normalen 28-Tage-Zyklus um den 20-24. Tag des Menstruationszyklus liegt [5].

#### 1.3.1. Hormonelle Faktoren

Das Endometrium ist das klassische Erfolgsorgan für Östradiol und Progesteron. Die zyklische Vorbereitung des Endometriums für die Implantation und der weitere Erhalt der Schwangerschaft werden unter anderem durch die im Ovar, die im sich entwi-

ckelnden Follikel und später die im Corpus luteum gebildeten Steroidhormone reguliert [8].

17 $\beta$ -Östradiol dient präovulatorisch dazu, die uterinen Zellen zur Proliferation und Differenzierung anzuregen. Seine Wirkung wird über Östrogenrezeptoren vermittelt. Diese finden sich in maximaler Dichte in der Proliferationsphase und nehmen nach der Ovulation unter dem Einfluss von Progesteron ab [51][76]. Das von den Granulosazellen des sich entwickelnden Follikels gebildete Östradiol stimuliert das Wachstum und die Zellteilung, um die vaskulären und epithelialen Komponenten des Endometriums zu erhöhen [35]. Ein so vorbereitetes Endometrium kann unter dem Einfluss von Progesteron weiter umgewandelt werden [64].

In der zweiten Zyklushälfte erfolgen durch das im Corpus luteum vermehrt gebildete Progesteron die sekretorische Differenzierung der endometrialen Zellen und der Zustrom von immunkompetenten Zellen. Zudem spielt Progesteron eine essentielle Rolle für die Dezidualisierung der Stromazellen [77] und induziert die Sekretion von Glykoproteinen, Wachstumsfaktoren, Enzymen, Molekülen der Extrazellulären Matrix und deren Rezeptoren. Diese haben sowohl auf die Physiologie des Embryos als auch auf die des Endometriums Einfluss [4][17][37]. Wie genau Progesteron die Umbauprozesse im Rahmen der Dezidualisierung beeinflusst, ist noch nicht hinreichend geklärt. Es wirkt einerseits über seine nukleären Rezeptoren (PR) und zum anderen modulieren lokal exprimierte Faktoren wie z.B. Prostaglandin E<sub>2</sub>, Luteinisierendes Hormon (LH) und Cortisol Releasing Hormone (CRH) über einen Second-messenger-Pathway mittels zyklischer Adenosinmonophosphatase (cAMP) die Progesteronwirkung [77]. Progesteron ist für den Vorgang der Implantation und den Erhalt der Schwangerschaft essentiell. Eine Lutealinsuffizienz, welche eine unzureichende Progesteronproduktion in der zweiten Zyklushälfte beinhaltet, führt zu Verlust einer eventuell schon entstandenen Frühgravidität und kann Ursache von habituellen Aborten sein [2].

### 1.3.2. Dezidualisierung

Der Dezidualisierungsvorgang setzt um den 23. bis ca. 28. Zyklustag ein und beschreibt einen endometrialen Differenzierungsvorgang, der sowohl die Funktion als auch die Morphologie der Stromazellen des Endometriums umfasst. Die Zellen ver-

ändern Ihre Form zu einem langgestreckten, netzartigen Verband und bilden im Falle eines Schwangerschaftseintritts die Dezidua. In der Dezidua kommt es zu einer Infiltration durch invasive Zytotrophoblastenzellen embryonaler Herkunft. Die dezidualisierten Stromazellen sezernieren unter anderem eine Reihe von Produkten, die sogenannten dezidualen Marker: insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-related protein-1 (IGFBP-rP1) und Prolaktin [25][50]. Prolaktin ist ein Peptidhormon, welches im wesentlichen vom Hypophysenvorderlappen und zu einem kleineren Anteil von anderen Geweben sezerniert wird, das Endometrium ist eines dieser extrahypophysären Gewebe [9]. Prolaktin und sein Rezeptor werden während der späten Sekretionsphase sezerniert [34], Prolaktin bleibt auch im Falle einer Schwangerschaft erhöht. Es wird diskutiert, dass durch Dezidualisierung die Stromazellen des Endometriums vor toxischen Sauerstoffradikalen geschützt werden [87]. Somit wird deren Akkumulation, die zu Gewebsschäden und letztendlich zum Abscheren des Endometriums führt, aufgehoben [88]. Der zeitliche Zusammenhang während des Zyklus von Progesteronanstieg und dem Auftreten der Prolaktinsekretion lässt eine progesteronabhängige Prolaktinsekretion vermuten [97]. Endometriales Prolaktin ist jedoch nicht nur ein Marker für die Dezidualisierung, es konnte gezeigt werden, dass sein Fehlen zu Störungen im Reproduktionsvorgang führt [21].

#### **1.4. Angiogenese bei der embryonalen Implantation**

Für eine erfolgreiche Implantation und die Aufrechterhaltung einer intakten Frühschwangerschaft ist der Anschluss des Embryos an das maternale Gefäßsystems notwendig. Die Induktion von Angiogenese durch den Embryo bzw. embryonales Gewebe ist zwingend erforderlich. Angiogenese beschreibt das Aussprosseln neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Endothelzellen und spielt eine wichtige Rolle für die schwangerschaftsassozierten Veränderungen im Endometrium. Die Uterusgefäße, das Endometrium, die Dezidua und die Plazenta sind potente Quellen angiogenetischer Wachstumsfaktoren [32][74].

Eine Familie der Wachstumsfaktoren im endometrialen Gewebe stellen die Angiopoietine dar, dazu gehören Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2) sowie deren Rezeptor TIE-2, den sie mit gleicher Affinität binden. Ang-1 wird im adulten Organismus weitverbreitet exprimiert, während Ang-2 eher an Orten, an denen Angi-

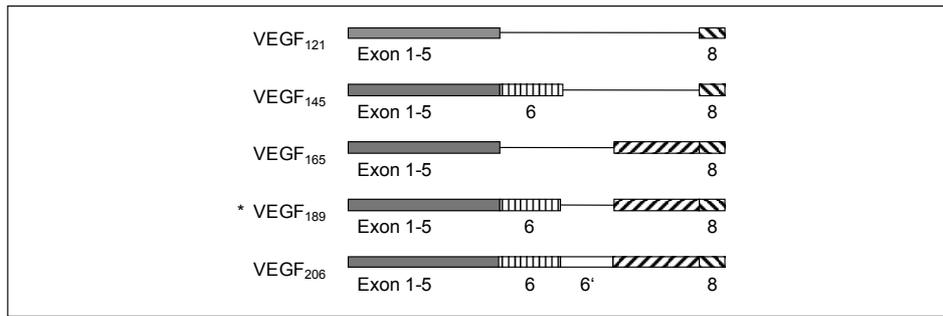
ogenese stattfindet, zu finden ist wie z.B. in Ovarien, im Uterus und der Plazenta [14][55]. Während Ang-1 eher für die Aufrechterhaltung eines intakten Gefäßsystems und bei vaskulären Umbauprozessen eine Rolle spielt [22], fungiert Ang-2 als sein funktioneller Antagonist und führt zum Verlust von Zell-Zellkontakten und ermöglicht so einen Einfluss von Angiogenesefaktoren wie z.B. VEGF [55]. Die Ergebnisse aktueller Forschung bestätigen, dass die Angiopietine unter anderem Angiogenese-prozesse regulieren und somit für die Prozesse im Gefäßsystem der Dezidua bei der Implantation mit verantwortlich sind [69].

Einen weiteren Angiogenesefaktor stellt die Gruppe des Vascular-Endothelial-Growth-Factor-(VEGF-) Systems dar, dessen Rezeptor-Regulation in den endometri-alen Stromazellen Gegenstand dieser Arbeit ist, die weitere Einblicke in die Funktion des VEGF Systems bei der Embryoimplantation geben soll.

### **1.5. Das Vascular-Endothelial-Growth-Factor-(VEGF-) System**

Vascular endothelial growth factor (VEGF), auch „vaskulärer Permeabilitätsfaktor“ genannt [40], wurde 1989 erstmals als Wachstumsfaktor mit hohem angiogeneti-schem Potential und hoher Spezifität für Endothelzellen charakterisiert [20][23]. Das humane VEGF-Gen (VEGF-A) ist auf dem Chromosom 6p12-p21 lokalisiert. Weitere Liganden der VEGF-Familie (VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D) und Placental Growth Factor (PlGF) konnten identifiziert werden [38][103].

Es handelt sich um ein Heparin-bindendes dimeres Glykoprotein (34-43 kDa) [36][62], durch alternatives Spleissen entstehen fünf gewebe- und funktionspezifi-sche mRNA-Isoformen [40][53][94]. Diese kodieren beim Menschen für Proteine mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>). Alle Isoformen enthalten die Exons 1-5 sowie das Exon 8, das Einfügen verschiedener Kombinationen der Exons 6 und 7 unterscheidet die Isoformen (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der 5 Isoformen der VEGF-A Familie des Menschen**

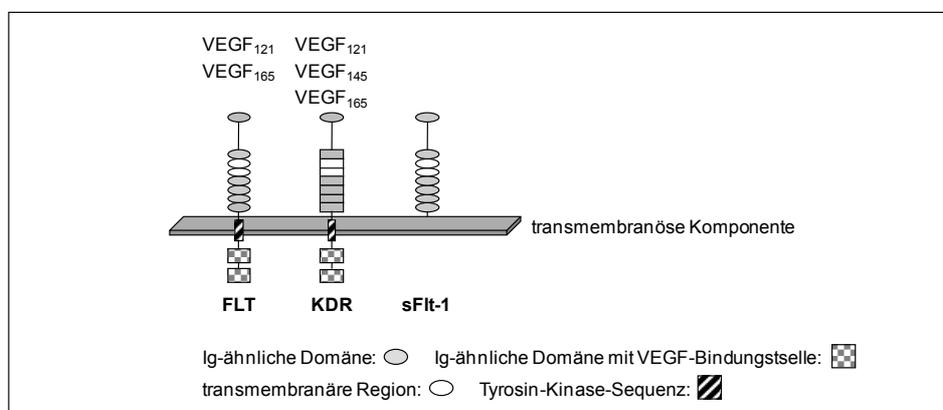
Ein wichtiges biologisches Unterscheidungsmerkmal der VEGF-Isoformen ist Ihre Fähigkeit, Heparan bzw. Heparansulfat zu binden. Die Heparinbindungsdomänen sind auf den Exons 6 und 7 lokalisiert. VEGF<sub>189</sub>, und VEGF<sub>206</sub> sind durch beide Exons mit den Heparinbindungsdomänen fest an Heparin bzw. Heparan-Sulfat-Proteoglykane der Zelloberflächen bzw. der Extrazellulären Matrix (ECM) gebunden. VEGF<sub>145</sub> und VEGF<sub>165</sub> wird die Bindung an die ECM durch das Vorhandensein von Exon 6 oder Exon 7 ermöglicht, VEGF<sub>121</sub>, fehlen beide Exons, sie sind somit frei bewegliche Formen [28][61][80], die biologisch aktiver als die gebundenen Formen sind [13][65].

VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> werden beim Menschen am häufigsten exprimiert, vorzugsweise ihre mRNA wird im menschlichen Endometrium gefunden [95]. VEGF<sub>189</sub> ist seltener und VEGF<sub>206</sub> kommt vor allem im embryonalen Gewebe vor.

Sowohl *in vivo* als auch mit Hilfe von *in vitro*-Modellen konnte das hohe angiogenetische Potential und eine antiapoptotische Wirkung von VEGF nachgewiesen werden [53], diese Wirkung trifft zwar vor allem auf vaskuläre Endothelzellen zu, in verschiedenen Studien konnten diese Effekte auch auf andere Zelltypen gezeigt werden. VEGF erhöht zudem die Gefäßpermeabilität und durch eine Steigerung der Stickstoff-Monoxid- (NO-) Abgabe die Vasodilatation [44]. Es spielt eine Rolle im Prozess physiologischer Angiogenese wie zum Beispiel der Wundheilung, der Regeneration des Endometriums, der Plazentation und der Embryoimplantation. Es konnte auch gezeigt werden, dass Blastozysten VEGF-mRNA exprimieren, was dem Embryo die Induktion von Angiogenese im implantationsbereiten Endometriums ermöglichen

könnte [45]. Im Gegensatz dazu steht die pathologische Angiogenese zum Beispiel bei der Entstehung und Metastasierung von Tumoren, Retinopathien, rheumatoider Arthritis sowie chronischen Entzündungen. Onkologische Therapiekonzepte machen sich diese Wirkung zunutze und wirken antiangiogenetisch. Dabei wird indirekt das Tumorwachstum gehemmt, welches auf Angiogenese angewiesen ist [36][42]. VEGF kommt diese Schlüsselfunktion der Regulation der physiologischen und pathologischen Angiogenese sowohl im embryonalen als auch adulten Organismus zu.

Bereits 1990 erschienen die ersten Veröffentlichungen zu möglichen VEGF-Rezeptoren [70][98] (siehe Abb. 4). Beim Menschen wurden auf molekulargenetischer Ebene drei VEGF-Rezeptoren identifiziert, die VEGF mit hoher Affinität und Spezifität binden. Dabei handelt es sich um zwei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen: VEGFR-1 (fms-like tyrosinkinase-1, VEGFR1) und VEGFR-2 (fetal liver kinase-1/kinase insert domain receptor, Flk-1/KDR) [19][56][15]. VEGFR1 und KDR enthalten beide eine transmembranöse Komponente, sieben extrazelluläre Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen und im zytoplasmatischen Teil eine Tyrosin-Kinase-Sequenz, welche durch eine Kinase-insert-Domäne unterbrochen wird [81][92]. Es existiert ebenfalls ein löslicher zirkulierender Rezeptor: soluble VEGFR1 (sFlt-1) [41], welcher durch alternatives Spleissen von VEGFR1 entsteht. sFlt-1 fehlt die Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domäne, die transmembranöse Domäne und die intrazelluläre Komponente des VEGFR1. sFlt-1 agiert als spezifischer Antagonist zu VEGF, indem er die Bindung an VEGFR1 und KDR mit hoher Affinität kompetitiv hemmt und auf diese Weise seine Bioverfügbarkeit *in vivo* beeinflusst [20].



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur der VEGF-Rezeptoren sowie deren Interaktion mit den VEGF-Isoformen**

VEGFR1 und KDR weisen eine 33%-ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz auf [93]. Rezeptor-Thyrosinkinase sind beteiligt bei der Phosphorylierung bei der Signalübertragung. Bindet VEGF an seine Rezeptoren, bewirkt dies eine Thyrosinphosphorylierung intrazellulärer Funktionsproteine und damit eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration [26]. Durch diesen Signalweg aktivieren sie in den Zielproteinen direkt das Zellwachstum und die Differenzierung. Die Rezeptoren binden die VEGF-Isoformen selektiv und mit unterschiedlicher Affinität, was die Vielfalt ihrer biologischen Funktionen demonstriert [101]. Die Affinität zu VEGFR1 ist 10-fach höher als zu KDR [15][57][73][91][99].

VEGFR1 und KDR werden an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert [18][43], konnten jedoch auch in einigen anderen Zelltypen nachgewiesen werden. So wurden sie in Trophoblastzellen der normalen Plazenta in allen Trimestern der Schwangerschaft nachgewiesen [6][10][26] und kommen zudem in Monozyten, Mesangiumzellen der Niere, Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen vor [1][12][89]. VEGF und seine Rezeptoren konnten in fast allen Teilen des weiblichen Reproduktionssystems nachgewiesen werden. Im menschlichen Endometrium wird VEGF in allen Zelltypen und in allen Phasen des Menstruationszyklus exprimiert [24], es gibt zyklische Schwankungen mit einem Maximum in der Sekretionsphase [82], also dem Zeitpunkt der embryonalen Implantation, dies könnte einen gemeinsamen Östrogen und Progesteroneffekt suggerieren [54][86]. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die VEGF-Produktion im humanen Endometrium durch Östrogen stimuliert wird [27]. In uterinen Tumorzellreihen dagegen wird zudem eine negative Regulation durch Östrogen beschrieben [85], die VEGF-Induktion durch Steroidhormone scheint somit gewebe- und zellspezifisch zu sein [31]. Es konnte gezeigt werden, dass einige bedeutende Wachstumsfaktoren wie z.B. epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (ILGF-1), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) und inflammatorische Zytokine durch eine Steigerung der VEGF mRNA-Expression regulatorische Einflüsse haben [62]. Während der Menstruation entsteht durch die Vasokonstriktion der Aa. spirales eine lokale Hypoxie, welche die Sekretion von VEGF triggert [72][79].

Bei der Embryoimplantation und in der Frühschwangerschaft spielt Hypoxie eine wichtige Rolle. Messungen im Bereich der Implantationsstelle vor der 10. Schwangerschaftswoche haben gezeigt, dass der Sauerstoffgehalt ca. 3% beträgt und nach diesem Zeitpunkt stark ansteigt [75]. Die hypoxische Umgebung bietet dem Trophoblasten und dem frühen Embryo einen gewissen Schutz vor toxischen Einflüssen von den bei oxidativen Reaktionen frei werdenden Sauerstoffradikalen [78]. Da VEGF durch Hypoxie vermehrt sezerniert wird [72][79], ist es gut möglich, dass VEGF auch so eine große Rolle bei der Implantation und in der Frühschwangerschaft spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass sFlt-1 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Präeklampsie zukommt. Bei Frauen die im weiteren Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie entwickelten, konnte während des zweiten Trimesters im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften eine erhöhte Serumkonzentration von sFlt-1 nachgewiesen werden [83]. Die antiangiogenetische Wirkung von sFlt-1 konnte im Mausmodell als Inhibitor für peritoneale Endometrioseläsionen nachgewiesen werden [30][60].

VEGFR1 und KDR werden im Verlauf des Menstruationszyklus auf nahezu konstantem Level exprimiert. KDR zeigt ein Maximum in der Proliferationsphase, was einen  $E_2$ -Effekt suggeriert. Die Expression des Antagonisten sFlt-1 ist während der mittleren Sekretionsphase stark verringert, etwa dreimal geringer als in der Proliferationsphase, was die maternalen endometrialen Rezeptoren für vom Embryo sezernierte angiogenetische Stimuli sensitiviert [47]. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen VEGF mit seinen Rezeptoren VEGFR1 und sFlt-1 und deren Bedeutung bei der embryonalen Implantation ist noch unzureichend verstanden und wurde so zum Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit. Wir postulieren, dass VEGF für den embryo-maternalen-Dialog eine wichtige Rolle spielt und dass der Trophoblast durch VEGF-Sekretion die Rezeptivität des Endometriums reguliert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Arbeiten mit primären endometrialen Stromazellen

Patientinnen, die sich aus Gründen nicht-maligner Erkrankungen einer Hysteroskopie unterzogen, wurden um ihre Teilnahme an dieser Untersuchung gebeten.

Die ausgewählten Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung alle im reproduktionsfähigen Alter und hatten einen regelmäßigen Menstruationszyklus. Die Biopsien entstammen dem Endometrium der Proliferationsphase.

Alle Patientinnen, die sich durch Überlassung einer Endometriumbiopsie an dieser Untersuchung beteiligten, wurden vorher schriftlich über das Forschungsprojekt aufgeklärt und unterzeichneten eine entsprechende Einverständniserklärung. Die Aufklärung und die Einverständniserklärung waren zuvor von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt worden.

Den Patientinnen wurde im Rahmen der Hysteroskopie eine Endometriumbiopsie durch Strickkürettage mit einer Novak-Kürette (Novak, Palo Alto, USA) entnommen. Das entnommene Gewebe wurde in Sammelmedium überführt und dann direkt für die Primärzellkultur verwendet.

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank (Gelaire BSB3, Sydney, Australia) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturschalen (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) in einem begasteten Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.1.1. Zellkulturmedien

Die bei der Zellkultur verwendeten Medien und Medienzusätze wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

##### Sammelmedium:

DMEM (Dulbecco's modified eagles medium mit 100 mg/l Glucose und dem Indikatorfarbstoff Phenolrot, Gibco, Carlsbad, USA), Fungizone (0,5µg/ml Amphotericin B), Antibiotika-Lösung (50µg/ml Penicillin/Streptomycin 50µg/ml)

#### Collagenasemedium:

DMEM, 1mg/ml Collagenase A (Boehringer Mannheim, Deutschland), 0,2 mg/ml DNAse (Sigma, St. Louis, USA) Fungizone (0,5µg/ml Amphotericin B), Antibiotika-Lösung (50µg/ml Penicillin/Streptomycin)

#### Wachstumsmedium:

70% DMEM, 20% MCDB 105, 10% gestripptes FCS (hitzeinaktiviert), Fungizone (2µg/ml Amphotericin B), Antibiotika-Lösung (10µg/ml Penicillin/Streptomycin) Glutamax 2mM L-Alanyl-L-Glutamin) und 5 µg/ml Insulin

#### Experimentmedium: (serumfrei)

70% DMEM, 20% MCDB 105, Fungizone (2µg/ml Amphotericin B), Antibiotika-Lösung (10µg/ml Penicillin/Streptomycin), 2mM Glutamax (L-Alanyl-L-Glutamin) und 5 µg/ml Insulin, 50 µg/ml Ascorbinsäure, 10 µg/ml Transferrin, 20 ng/ml EGF

#### 2.1.2. Extraktion der Zellen aus nativem Gewebe

Das operativ gewonnene Endometrium wurde dreimal jeweils in 10 ml DMEM-Medium gewaschen, um die Kontamination mit Blut und Schleim zu reduzieren. Dann wurde das Gewebe auf einer 10 cm Kulturschale mit zwei sterilen Skalpellens in ca. 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Gewebefragmente wurden mit einer 25 ml Pipette (Greiner Bio-One, Monroe, USA) aufgesaugt und in 10 ml Collagenasemedium in ein 50ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) gegeben. Der Verdau des Gewebes durch das Enzym Collagenase erfolgte je nach Menge an Gewebe über einen Zeitraum von zwei bis vier Stunden bei ständigem Rotieren in einem auf 37°C geheizten Ofen mit Rotor (Mini Oven, MWG Biotech, High Point, USA). Der Collagenase-Verdau wurde nach ca. drei Stunden beendet, wenn die Lösung trüb erschien und keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Das Röhrchen mit der Zellsuspension wurde einmal kräftig geschüttelt, damit die Zellen sich vollständig voneinander lösten. Dann wurde es 5 Minuten stehen gelassen, wobei sich die größeren Epithelzellen und die Drüsenfragmente absetzen und die kleineren Stromazellen im Überstand verblieben. Der Überstand mit den Stromazellen wurde abgenommen und durch einen Nylon-Filter mit einer Porengröße von 70µm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Das

Pellet aus Epithelzellen und Drüsenfragmenten wurde zweimal mit je 10 ml DMEM-Medium gewaschen, und der Überstand in dem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt.

Die gesammelte 30 ml Stromazellfraktion wurde durch einen zweiten Nylon-Filter mit einer Porengröße von 40µm gegeben und dann 8 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und auf einer 10 cm Kulturschale (Bodenfläche: 58 cm<sup>3</sup>, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) ausplattiert. Etwa 90 Minuten nach dem Ausplattieren wurde das Medium gewechselt, um eventuelle Kontaminationen mit Epithelzellen zu verringern, welche erst zu einem späteren Zeitpunkt adhärent werden [33]. Wie zuvor gezeigt werden konnte, enthalten auf diese Weise separierte Stromazellen des humanen Endometriums weniger als 0,1 % Epithel- oder Endothelzellen [29][33]. Bis zum Erreichen der Konfluenz wurde jeden zweiten Tag das Medium gewechselt. Bei kleinen Endometriumproben wurde zunächst eine kleinere Zellkulturschale gewählt um Zell-Zell-Kontakte besser zu ermöglichen. Mit Erreichen der Konfluenz wurden dann wie unter 2.1.3. beschrieben die Zellen auf eine 10 cm Kulturschale passagiert und danach wie unter 2.1.3 beschrieben weiter behandelt.

#### 2.1.3. Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung passagiert. Hierzu wurde nach Erreichen der Konfluenz das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS (Phosphate-Buffered Saline, Gibco, Eggenstein, Deutschland) gespült und mit 3 ml/EDTA-Lösung (1x Trypsin/EDTA in HBSS mit Indikatorfarbstoff Phenolrot) für 5 bis 10 Minuten, bis die Zellen sich von der Platte lösten, im Brutschrank inkubiert. Die vom Gefäßboden abgelösten Zellen wurden aufgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 7ml Wachstumsmedium, zur Inaktivierung des Trypsins, überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurden die Zellen in 12 ml Wachstumsmedium gründlich resuspendiert und jeweils 2 ml der Suspension auf eine 3,5cm Kulturschale (Bodenfläche: 11,78 cm<sup>3</sup>) ausgesät.

#### 2.1.4. Dezidualisierung der Stromazellen

Um Zellkulturexperimente unter physiologischen Bedingungen des Endometriums der Sekretionsphase durchführen zu können, wurden die Stromazellen *in vitro* dezidualisiert. Dazu wurden sie bis zum Erreichen der Konfluenz in Wachstumsmedium

kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen mit 2 ml Serum-freies Experimentmedium unter Zusatz von physiologischen Konzentrationen [33] an Östradiol ( $10^{-8}\text{M}$ ) und Progesteron ( $10^{-6}\text{M}$ ; beides Sigma-Aldrich, München, Deutschland) kultiviert, das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt [29][33]. Die Dezidualisierung wurde mit Prolaktin- Multiplex-PCR überprüft (Abb 9). Nach 12 Tagen Kultur in Experimentmedium waren die Zellen dezidualisiert.

### 2.1.5. Zellkulturexperimente

Nach der Dezidualisierung wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in Experimentmedium, welchem VEGF in einer Konzentration von 10ng/ml und VEGF-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde, inkubiert. Um die eventuelle Wirkung des VEGF zu inhibieren, wurde der VEGF-AK hinzugegeben. Die VEGF-Antikörperkonzentrationen können Tabelle 1 entnommen werden.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Zellkulturexperimente**

	<b>Konditionen</b>					
	1	2	3	4	5	6
<b>Experimentmedium</b>	+	+	+	+	+	+
<b>E<sub>2</sub>P</b>	-	+	+	+	+	+
<b>VEGF (10ng/ml)</b>	-	-	+	+	+	+
<b>α-VEGF-AK (µg/ml)</b>	-	-	-	0,05	0,1	0,25

Nach 24 Stunden wurde das Medium von der Platte entfernt und die Zellen mit Trizol-Reagenz (Gibco, Invitrogen, Calsbad, USA) zur Extraktion der RNA lysiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.2. Histologische Techniken

### 2.2.1. Immunhistochemische Färbung von Zell-Monolayern

Zur Kontrolle der Reinheit der aus Endometrium extrahierten Stromazellen wurde eine immunhistochemische Färbung der Zellen mit dem epithel-spezifischen Protein Zytokeratin durchgeführt.

Die Stromazellen wurden hierfür bis zur Konfluenz auf Zellkulturobjektträgern (Lab-Tek Chamberslides, Nunc, Rochester, USA) kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und auf dem Objektträger fixiert. Dazu wurden die Objektträger 10 min in eiskaltem Aceton inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 1 min in PBS inkubiert.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode und dem Farbstoff Diaminobezidin (DAB). Dabei wird an den spezifischen Primärantikörper zunächst ein biotinylierter Zweitantikörper gebunden. Die Bindung erfolgt über die tierspezifische Ig-Kette des Primärantikörpers. Über den Zweitantikörper findet dann die Nachweisreaktion mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (ABC-Peroxidase-Komplex) statt. Als Farbstoff und Peroxidase-Substrat wurde DAB eingesetzt.

Der verwendeten Primärantikörper wurden von der Firma Dako (Carpinteria, USA) bezogen. Alle anderen Nachweisreagenzien stammten von der Firma Vector, (Burlingame, USA) und wurden nach Gebrauchsanleitung der jeweiligen Firma verwendet. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger, zur vollständigen Entfernung der zuvor verwendeten Reagenzien, dreimalig für 5 Minuten in PBS gewaschen. Für diese Waschschrte, ebenso wie für die Xylol-Behandlung und die Behandlung mit Ethanol wurden die Objektträger in Glasgondeln gestellt und in dem jeweiligen Lösungsmittel bei Raumtemperatur (RT) unter ständigem, leichtem Schütteln inkubiert.

Nach Entnahme der Objektträger aus dem Aufbewahrungsmedium, wurden diese zweimal jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde durch 10-minütige Behandlung mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in PBS bei Raumtemperatur die endogene Peroxidase der Zellen blockiert, um eine unspe-

zifische Färbung durch diese Enzyme zu vermeiden. Im Anschluss daran erfolgte bei RT eine 20-minütige Inkubation in Normalserum, welches 1:50 mit 1,5% BSA/PBS verdünnt wurde. Das verwendete Serum muss dabei von dem gleichen Tier stammen, wie der biotinylierte Zweitantikörper.

Danach wurden die Objektträger für ca. 18 Stunden bei 4°C mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert. Folgender Primärantikörper wurde verwendet: Monoclonal mouse Anti-Human Cytokeratin (M0821, Dako, Denmark). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte die Behandlung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Dieser wurde 1:100 mit 1,5% PBS verdünnt und für 20 Minuten bei RT auf die Objektträger gegeben. Als nächstes wurden die Zellen 30 Minuten bei RT mit dem ABC-Peroxidase-Komplex inkubiert. Darauf folgte ebenfalls bei Raumtemperatur eine 5-minütige Färbung mit dem DAB-Farbstoff. Anschließend wurden die Zellkerne durch kurzes Eintauchen der Objektträger in Meyers Hämalaun-Lösung gegengefärbt. Die Objektträger wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und für 10 Minuten in Xylol inkubiert. Zum Schluss wurde auf die einzelnen Objektträger Eukitt-Eindeckmedium gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland).

### **2.3. Arbeiten mit RNA aus endometrialen Stromazellen**

Um bei der RNA-Isolierung Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden, wurde das dabei verwendete Wasser mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Hierzu wurde steriles Wasser mit DEPC im Verhältnis 1:1000 (0,1% v/v) gemischt, über Nacht bei 17°C inkubiert und anschließend autoklaviert. Für das Arbeiten mit RNA wurden Einweg-Plastik-Material und Aerosol-dichte Pipetten-Spitzen (Biozym, Oldendorf, Deutschland) verwendet. Es wurden dabei immer Einweghandschuhe getragen.

#### **2.3.1. RNA Isolierung aus Zellkulturen**

Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Medium der Zellen abgesaugt und 1ml Trizol auf die Platten gegeben. Durch mehrmaliges Pipettieren wurden die Zellen von der Platte gelöst und homogenisiert.

Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200µl Chloroform zugegeben und die Proben für ca. 15 Sekunden vorsichtig geschüttelt. Nach 2-3 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm) pelletiert, mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 4°C und 7500 rpm). Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde das RNA Pellet für 10 bis 15 Minuten bei RT getrocknet und in 20µl DEPC/H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (Biophotometer, Eppendorf) wie unter 2.3.2 beschrieben. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

### 2.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die RNA wurde im Spektralphotometer (Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch Messung der optischen Dichte (OD) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden nach folgenden Grundlagen berechnet:

$$\text{ds RNA: } OD_{260} = 1 = 50\mu\text{g/ml}$$

Hinweis zur Reinheit einer Nukleinsäurepräparation wurde aus dem Quotienten der gemessenen optischen Dichten erhalten. Eine reine Nukleinsäure zeichnet sich durch ein OD 260/280 – Verhältnis von 1.68 bis 2.0 aus. Die Reinheitsgrenzen der in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäuren betragen 1.61 bis 1.81.

### 2.3.3. Reverse Transkription von extrahierter RNA

Eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion ist die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Sie wird eingesetzt, um mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) RNA in cDNA („complementary“ DNA) umzuschreiben. Die cDNA kann anschließend als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden.

Bei der cDNA Synthese aus RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Einsatz von Oligo-dT<sub>16</sub> jeweils 1µg Gesamt-RNA in cDNA transkribiert. Die RNA

wurde zu einem Reaktionsgemisch, das aus MgCl<sub>2</sub>, PCR-Puffer, Oligo-dT<sub>16</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, RNase-Inhibitor und MuLV Reverse Transkriptase (GeneAmp RNA PCR Core KIT, Perkin-Elmer, Foster City, California, USA) bestand, gegeben. Die Mengen und die endgültigen Konzentrationen der Reagenzien sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Oligo-dT<sub>16</sub> sich an das polyA<sup>+</sup>- Ende der RNA anlagert.

Dann wurde 1 Stunde bei 42°C inkubiert (Thermocycler T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) und anschließend durch 5 Minuten bei 99°C die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die cDNA Proben wurden mit 80µl DEPC/H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C gelagert.

**Tabelle 2: Zusammensetzung und Konzentration des RT-Reaktionsgemisches.**

	Volumen	Konzentration
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2µl	2mM
10x PCR-Puffer	2µl	1x
Oligo-dT <sub>16</sub>	1µl	2,5µM
dNTPs (je 20mM)	1µl	je 1mM
RNase-Inhibitor	1µl	0,5IU/µl
Reverse Transkriptase	1µl	0,75 IU/µl
RNA in DEPC-H <sub>2</sub> O	10µl	1µg
Gesamtvolumen	20µl	

#### 2.3.4. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um einen genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Es können Fragmente mit einer Länge von über 20.000-40.000 Basenpaaren (20-40 kbp) vervielfältigt werden. Als Matrize (template) kommen genomische DNA, cDNA, Plasmid-DNA und virale DNA in Frage.

Die benötigten grundlegenden Komponenten, die für eine PCR benötigt werden, sind: original-DNA („template“), zwei Primer, um auf beiden DNA-Einzelsträngen den Startpunkt für die DNA-Synthese festzulegen, DNA-Polymerase (z.B. taq-Polymerase), Nukleotide (dNTPs), Pufferlösung

In einem so genannten Thermocycler wird die PCR durchgeführt, dieser Prozess besteht aus einer Anzahl von 30- 50 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der DNA
2. Hybridisierung
3. Elongation

#### 2.3.5. Kontrolle der reversen Transkription durch $\beta$ -Actin PCR

Durch Amplifikation des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -Actin wurde der Erfolg der reversen Transkription der endometrialen RNA kontrolliert.

Die PCR wurde in 50  $\mu$ l Ansätzen in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (PCR Softtubes, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Sie enthielten jeweils 5  $\mu$ l cDNA-Lösung, PCR-Reaktionspuffer, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 100mM dNTP-SET Eppendorf, Hamburg, Deutschland), 5'- und 3'-Primer sowie Taq-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom).

Die genauen Mengen und Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Primer für die  $\beta$ -Actin PCR sind Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der  $\beta$ -Actin-PCR**

Reagenzien	Volumen	Konzentration
cDNA	5 $\mu$ l	---
10xPCR-Puffer	5 $\mu$ l	1x
25 mM Mg-Cl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l	2 $\mu$ M
dNTPs (je 10 mM)	2 $\mu$ l	5mM
5'-Primer	2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
3'-Primer	2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Taq -DNA-Polymerase	0,2 $\mu$ l	1IU
H <sub>2</sub> O steril	29,8 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l	

**Tabelle 4: Primer zur Amplifikation von  $\beta$ -Actin, VEGFR1, sFlt-1 und PRL**

RNA	Primer Nr	Fragmentlänge	3'/5'-Ende	Oligonukleotidsequenz
<b><math>\beta</math>-Actin</b>	#1	798bp	5'	5' -ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG -3'
	#2		3'	5' -CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC -5'
<b>VEGFR1</b>	#47	655bp	5'	5' -GCA CCT TGG TTG TGG CTG ACT -3'
	#51	485bp	3'	5' -CCC TTC TGG TTG GTG GCT TTG -3'
			3'	5' -CCC TTC TGG TTG GTG GCT TTG GAG GTT TCG CAG
			floating	GAG GTA TGG -3'
<b>sFlt-1</b>	#47	643bp	5'	5' -GCA CCT TGG TTG TGG CTG ACT -3'
	#48	475bp	3'	5' -GAG CCC GGG GGT CTC ATT ATT -3'
			3'	5' -GAG CCC GGG GGT CTC ATT ATT GCC TTT TTG TTG
			floating	CAG TGC TCA -3'
<b>PRL</b>	#157		5'	5' -GCT TCT GTA TCA TCT GGT CAC G -3'
	#158		3'	5' -TGC GTA GGT AGT GGA GCA G -3'

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Es wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der cDNA-Fragmente gewählt: 3 min bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der DNA, in jedem Zyklus 45 sec bei 94°C, 45 sec bei

54°C und 45 sec bei 72°C, abschließend weitere 5 min bei 72°C, um den Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen. Für die Amplifikation der  $\beta$ -Actin cDNA in humanen endometrialen Stromazellkulturen erfolgten 30 Zyklen. Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben bis zur gelelektrischen Auftrennung bei -20°C gelagert.

### 2.3.6. Kontrolle der Dezidualisierung durch Prolaktin-PCR und Multiplex PCR

Durch Amplifikation des Prolaktins wurde der Erfolg der Dezidualisierung kontrolliert. Prolaktin (PRL) ist ein Peptidhormon, welches größtenteils vom Hypophysenvorderlappen sezerniert wird. Das Endometrium ist eines der extrahypophysären Gewebe, die Prolaktin sezernieren [9]. Dezidualisierte Stromazellen der späten Sekretionsphase produzieren Prolaktin während des Menstruationszyklus sowie während einer Schwangerschaft [100].

Durch qualitative RT-PCR wurde die Dezidualisierung der Stromazellen kontrolliert. Die PCR wurde in 50  $\mu$ l Ansätzen in 0,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert. Sie enthielten jeweils 5  $\mu$ l cDNA-Lösung, PCR-Reaktionspuffer, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 100mM dNTP-SET von Eppendorf), 5'- und 3'- Primer sowie Taq-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

Die genauen Mengen und Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die Primer für die PRL-PCR sind Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Prolaktin-PCR**

Reagenzien	Volumen	Konzentration
cDNA	5 $\mu$ l	---
5x PCR-Puffer	5 $\mu$ l	1x
25 mM Mg-Cl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l	2 $\mu$ M
dNTPs (je 10 mM)	2 $\mu$ l	5mM
5'-Primer	2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
3'-Primer	2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Taq-Polymerase	0,2 $\mu$ l	1 IU
H <sub>2</sub> O steril	31,8 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l	

Die mRNA Expression von Prolaktin wurde zusätzlich mittels einer Multiplex PCR untersucht. Dabei wurden 5µl cDNA der Endometriumbiopsien in einem PCR-Ansatz mit den gleichen Mengen an Primern für PRL und β-Actin (je 2µl der 5'- und 3'- Primer) amplifiziert. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches entsprach dem Ansatz der β-Actin PCR (Tabelle 3).

### 2.3.7. PCR der VEGF-Rezeptoren

Der qualitative Nachweis der cDNA der VEGF-Rezeptoren erfolgte mit PCR. Die PCR wurde in 50 µl Ansätzen in 0,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert. Sie enthielten jeweils 5 µl cDNA-Lösung, PCR-Reaktionspuffer, dNTP's (100mM), 5'- und 3'- Primer sowie Taq-Polymerase .

Die genauen Mengen und Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die Primer für die PCRs sind Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der VEGFR1/sFlt-1-PCR**

Reagenzien	Volumen	Konzentrationen
cDNA	5µl	---
10x PCR-Puffer	5µl	
dNTPs (5µM)	5µl	je 1mM
5'-Primer (5µM)	2µl	0,2µM
3'-Primer (5µM)	2µl	0,2µM
Taq-Polymerase	0,2µl	1IU
H <sub>2</sub> O steril	33,8µl	
Gesamtvolumen	50µl	

### 2.3.8. Kompetitive PCR der VEGF-Rezeptoren

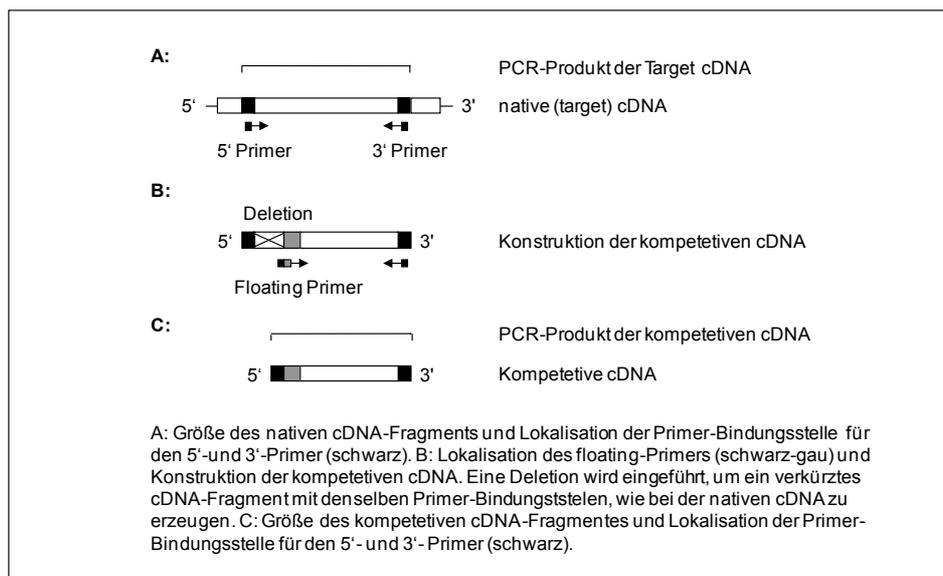
Durch kompetitive PCR kann der cDNA-Gehalt und damit im Rückschluss auch der mRNA-Gehalt einer unbekannt Probe quantitativ ermittelt werden [96].

In einer modifizierten Anwendung der kompetitiven PCR [48] wird der cDNA-Gehalt lediglich semiquantitativ erfasst, jedoch ist auch hier ein Vergleich der mRNA-Expression mehrere Proben, wie z.B. der Expression eines Gens im Endometrium möglich.

Bei der modifizierten Methode wird zunächst ein kompetitives cDNA-Fragment (Kompetitor) hergestellt. Dieses entspricht in einer Sequenz zum Großteil der nativen cDNA (Target) und enthält die gleichen Primer-Bindungsstellen. Allerdings enthält es innerhalb des zu amplifizierenden Fragments eine Deletion (siehe Abb.5), so dass es nach Amplifikation aufgrund der Größe von dem target Fragment unterschieden werden kann. Nach einer PCR mit der nativen cDNA unbekanntes Gehaltes und einer definierten Menge an kompetitiver cDNA kann die Menge an target-DNA über das Verhältnis von Kompetitor zu Target semiquantitativ bestimmt werden.

### 2.3.8.1. Synthese des Kompetitors

Für die Herstellung des Kompetitors wird zunächst für jedes zu untersuchende Gen ein so genannter *floating*-Primer konstruiert. Bei diesem Primer wird der eigentliche 5'- oder 3'- Primer mit einer kurzen Sequenz, die innerhalb des zu amplifizierenden Fragments liegt, kombiniert [48] (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Konstruktion der kompetitiven cDNA**

Mit dem 5'-floating-Primer und dem regulären 3'- Primer bzw. mit dem 3'-floating-Primer und dem regulären 5'- Primer wurde die Gesamt-cDNA einer Endometriumbiopsie amplifiziert. Diese PCR führt zu einem kompetitiven cDNA Fragment mit einer Deletion gegenüber der nativen cDNA, welches aber dennoch die regulären 5'- und 3'-Bindungsstellen der Primer besitzt.

### 2.3.8.2. Ansatz der kompetitiven PCR

Durch kompetitive PCR wurde die Expression der cDNA der Komponenten VEGFR1, sFlt-1 im Endometrium der Proliferationsphase quantitativ bestimmt.

Für die kompetitiven PCR wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß ein 50µl Reaktionsgemisch mit 5 µl target cDNA, einer definierten Menge an kompetitiver cDNA, PCR-Puffer, dNTP's, 5'- und 3'-Primer und Taq-Polymerase angesetzt. Die genauen Mengen der Reagenzien sind Tabelle 7 zu entnehmen, die Menge an Kompetitor der Tabelle 8.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der kompetitiven PCR**

Reagenzien	Volumen	Konzentration
Target cDNA	5µl	---
Kompetitor	X µl	X fmol/µl
10x PCR-Puffer	5µl	
dNTPs (5µM)	5µl	je 1mM
5'-Primer (5µM)	2µl	0,2µM
3'-Primer (5µM)	2µl	0,2µM
Taq-Polymerase	0,2µl	1 IU
H <sub>2</sub> O steril	31,8µl	
Gesamtvolumen	50µl	

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel mit den folgenden Parametern: 5 min bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der DNA, 45 sec bei 94°C, 45 sec bei *annealing*-Temperatur und 45 sec. bei 72°C in jedem Zyklus, abschließend weitere 5 min bei 72°C, um den Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen.

Die *annealing* -Temperaturen der jeweiligen Primer und die Anzahl der Zyklen für die kompetitiven PCR's sind Tabelle 8 zu entnehmen.

**Tabelle 8: Menge an kompetitiver cDNA und Anzahl der Zyklen der kompetitiven PCR sowie Annealingtemperatur der jeweiligen Primer**

mRNA	Menge an kompetitiver cDNA / PCR	Anzahl der PCR-Zyklen	Annealing-Temperatur der Primer [°C]
VEGFR1	0,002fmol/µl	40	58
sFlt-1	0,001fmol/µl	40	58

Nach der Reaktion wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des GelDoc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) analysiert (siehe 2.5).

#### 2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Produkte der PCR und der kompetitiven PCR wurden mittels horizontaler Gelelektrophorese untersucht. Diese wurde mit 2%igen Agarosegelen in einer H5-Elektrophoresekammer (Gibco, Eggenstein, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Pufferlösung aus 89mM Tris, 2mM EDTA und 89mM Borsäure (1x TBE-Puffer) in H<sub>2</sub>O angefertigt. Zur Herstellung des Gels wurden 2g Agarose (Sigma-Aldrich, München) in 100 ml dieses Puffers in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf ca. 70°C wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben und die Lösung in die Gelkammer gegossen. Um die Länge der aufgetragenen cDNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde nach Auskühlen des Gels zusätzlich zu den Proben ein 100bp DNA-Standard (Gibco BRL) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 90 bis 110 Volt für 30 bis 50 Minuten.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Agarosegele mit Hilfe des GelDoc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) analysiert und eine Fotodokumentation angefertigt. Bei der Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) wird die Fluoreszenz des interkalierten Agens angeregt, wodurch die DNA-Fragmente nachgewiesen werden können. Größenkalkulationen und densitometrische Analysen der cDNA-Banden wurden mit Hilfe der Molecular Analyst Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) durchgeführt.

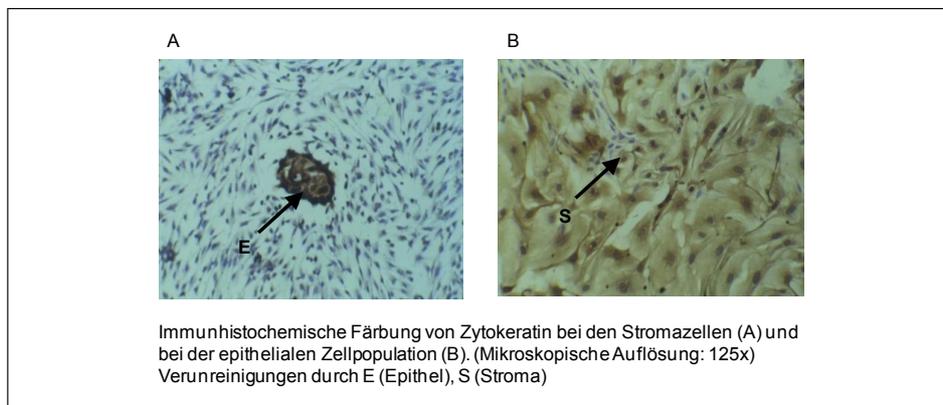
## 2.5. Datenanalyse

Es wurde wie unter 2.4 beschrieben eine Fotodokumentation angefertigt und densitometrische Analysen der cDNA-Bandenintensität durchgeführt. Anhand des Quotienten der Bandenintensitäten der target-cDNA-Bande und der kompetitiven cDNA-Bande konnte die Menge an target cDNA semiquantitativ ausgewertet. Wir verwendeten Excel zur statistischen Analyse mit dem Students t- Test  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Kontrolle der Reinheit der endometrialen Stromazellkulturen

Insgesamt wurden Endometriumbiopsien von 28 Patientinnen nach der unter 2.1 beschriebenen Methode gewonnen und kultiviert. 19 Proben zeigten ausreichendes Wachstum und keine Anzeichen von Kontamination. Abb. 6 zeigt stellvertretend, dass die aus dem Endometrium extrahierten Stromazellen nur sehr gering mit Epithelzellen verunreinigt waren.



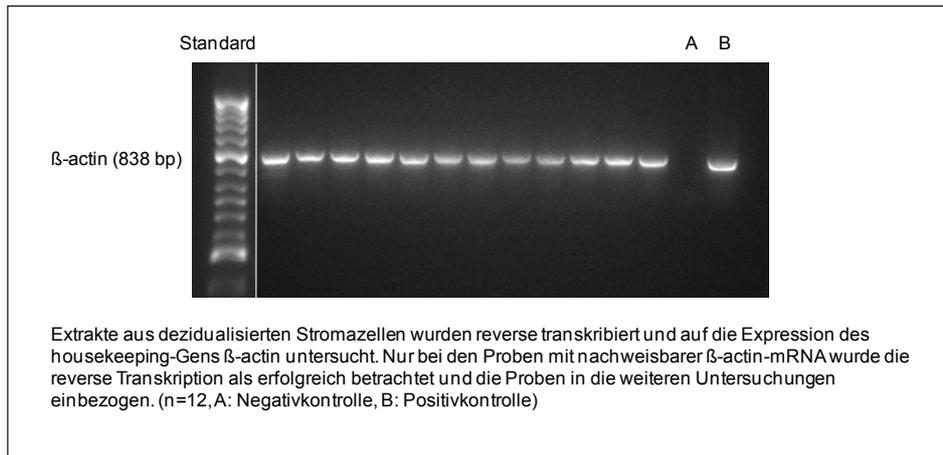
**Abb. 6: Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin**

#### 3.2. $\beta$ -Actin Expression der endometrialen Stromazellen

Es wurden 19 Gewebeproben des Endometriums reverse transkribiert und auf die Expression des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -Actin untersucht.

Bei insgesamt 17 der 19 Stromazellproben, die bei der Reaktion eingesetzt wurden, konnte die mRNA von  $\beta$ -Actin nachgewiesen werden.

Abb. 7 zeigt repräsentativ an 12 Stromazellproben die Bande der  $\beta$ -Actin cDNA bei 838 bp.

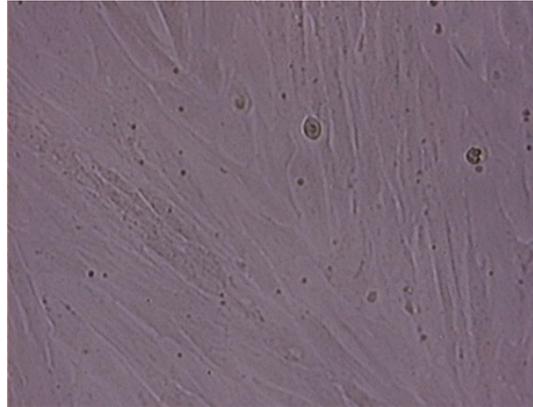


**Abb. 7: PCR  $\beta$ -Actin-mRNA**

Nur bei den Proben mit nachweisbarer  $\beta$ -Actin mRNA wurde die reverse Transkription als erfolgreich betrachtet und die cDNA in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

### 3.3. Dezidualisierungsnachweis

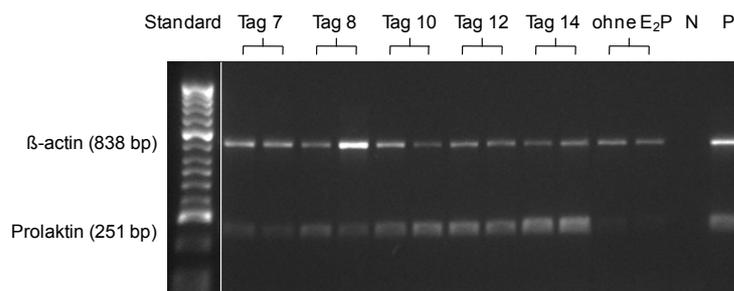
Um Zellkulturexperimente unter physiologischen Bedingungen des Endometriums der Sekretionsphase durchführen zu können, wurden die Stromazellen dezidualisiert. Abb. 8 zeigt repräsentativ Stromazellen, die durch die Dezidualisierung eine langgestreckte Morphologie erhalten, sie bilden einen dichten Zellverband.



Dezidualisierte Stromazellen des humanen Endometriums nach 12-tägiger Inkubation mit Experimentmedium unter Zusatz von physiologischen Konzentrationen an Östradiol ( $10^{-8}\text{M}$ ) und Progesteron ( $10^{-6}\text{M}$ ) (mikroskopische Auflösung 200x)

**Abb. 8: Dezidualisierte Stromazellen des humanen Endometriums**

Neben der morphologischen Kontrolle wurde stellvertretend an 3 Zellproben durch Nachweis der Prolaktin-mRNA der Erfolg der Dezidualisierung gemessen. Die Multiplex-PCR zeigte, dass die Prolaktinexpression mit zunehmender Inkubationszeit der Zellen mit 2 ml Serum-freiem Experimentmedium unter Zusatz von physiologischen Konzentrationen an Östradiol ( $10^{-8}\text{M}$ ) und Progesteron ( $10^{-6}\text{M}$ ) zunimmt (siehe Abb. 9).



Nachweis der Dezidualisierung der Stromazellen anhand der Prolaktinproduktion. Mit zunehmender Inkubationszeit (Tag 7 bis Tag 14) mit 2 ml Serum-freiem Experimentmedium unter Zusatz von physiologischen Konzentrationen an Östradiol ( $10^{-8}\text{M}$ ) und Progesteron ( $10^{-6}\text{M}$ ) nimmt die Prolaktinexpression zu (n=12, N: Negativkontrolle, P: Positivkontrolle)

**Abb. 9: PRL-Multiplex- PCR**

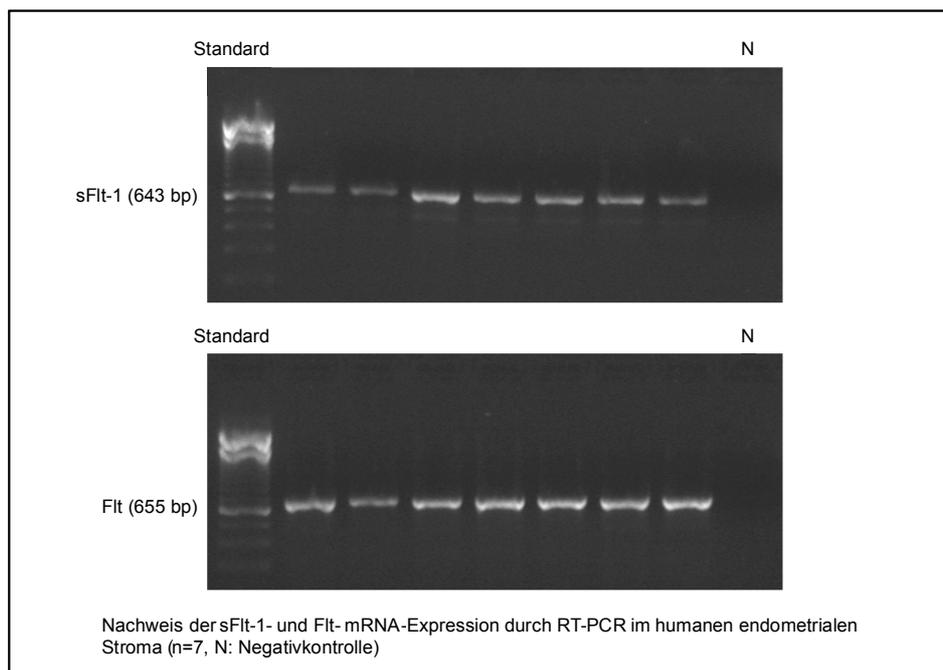
Alle verwendeten Zellproben wurden somit 12 Tage lang inkubiert, um die Zellkulturexperimente unter physiologischen Bedingungen des dezidualisierten Endometriums durchführen zu können.

### 3.4. Expression der VEGF-Rezeptoren in endometrialen Stromazellen unter dem Einfluss von Östrogen und Progesteron sowie VEGF.

3.4.1. Nachweis der VEGF-Rezeptoren in endometrialen Stromazellen durch PCR  
Insgesamt wurden endometriale Stromazellen von 17 Patientinnen auf die mRNA-Expression von VEGF-Rezeptoren untersucht.

Bei Stromazellkulturen von 8 Patientinnen konnte in allen Experimentansätzen (siehe Tabelle 1) ein qualitativer Nachweis für die mRNA-Expression von VEGFR1 und in 12 Proben der entsprechende Nachweis für sFlt-1 erbracht werden.

Abb. 10 zeigt repräsentativ an 7 Stromazellproben die PCR-Produkte von sFlt-1 und VEGFR1.

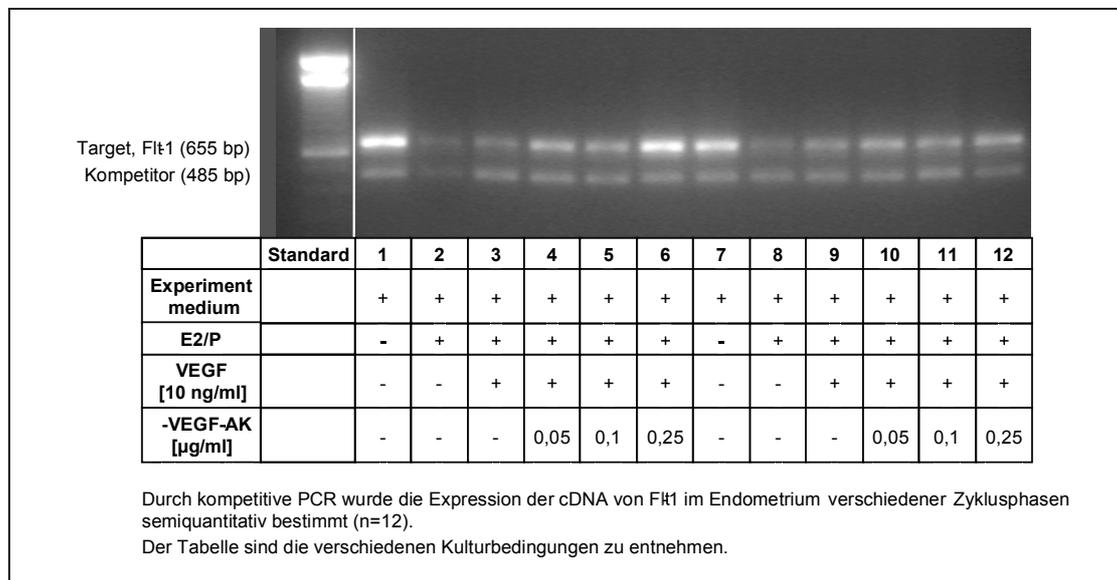


**Abb. 10: PCR sFlt-1 und PCR VEGFR1**

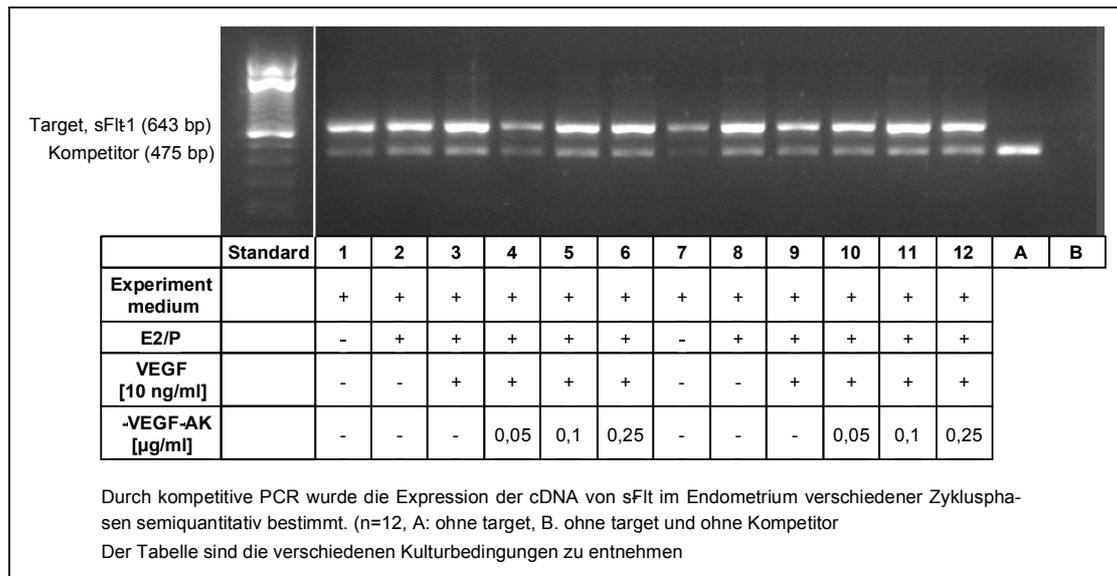
### 3.4.2. Nachweis der VEGF-Rezeptoren in endometrialen Stromazellen durch kompetitive PCR unter dem Einfluss von Östrogen und Progesteron sowie VEGF

Die mRNA konnten Mittels einer kompetitiven PCR aus allen Zellkulturansätzen von 4 Patientinnen für VEGFR1 bzw. 10 Patientinnen für sFlt-1 ausgewertet werden (Zusammensetzung siehe Tabelle 1).

Abb. 11 und Abb. 12 zeigen repräsentativ die PCR-Produkte von VEGFR1 und sFlt-1 nach kompetitiver PCR. Die VEGFR1-Bande ist bei 655 bp zu sehen, die VEGFR1-Kompetitor-Bande bei 485bp und die Target und Kompetitor-Bande von sFlt-1 bei 643 bp und 475 bp.



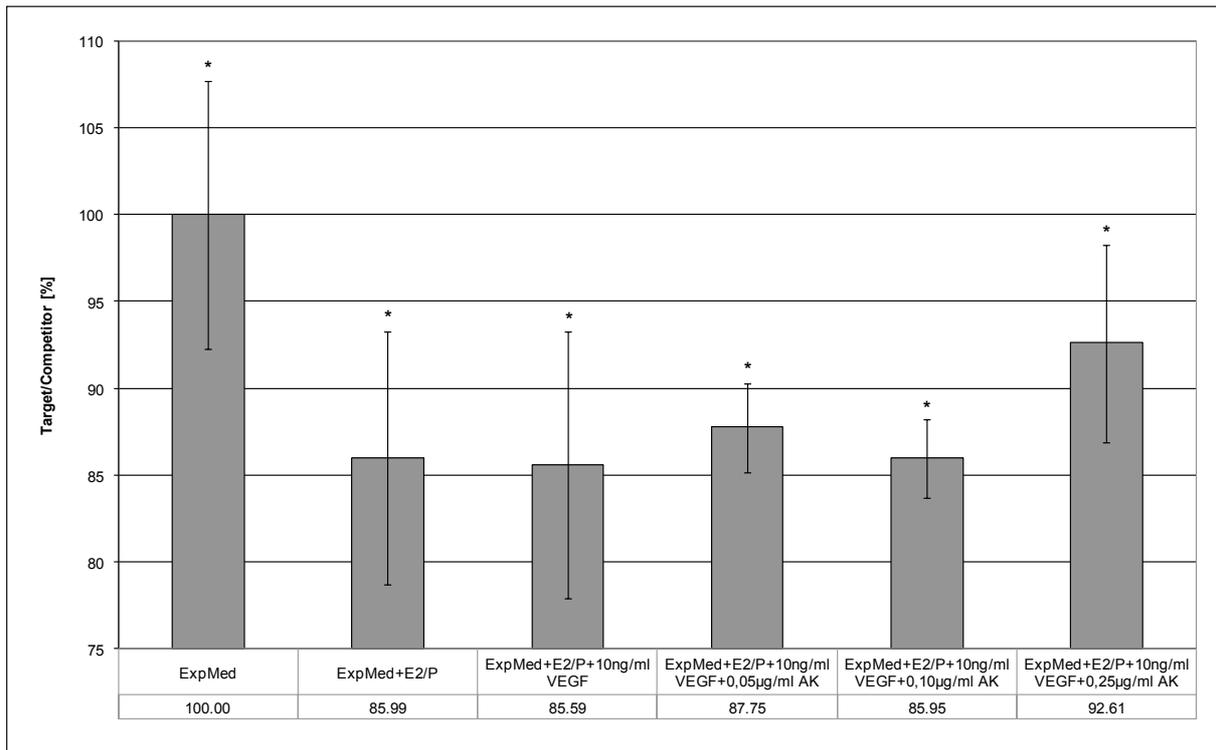
**Abb. 11: Kompetitive PCR VEGFR1**



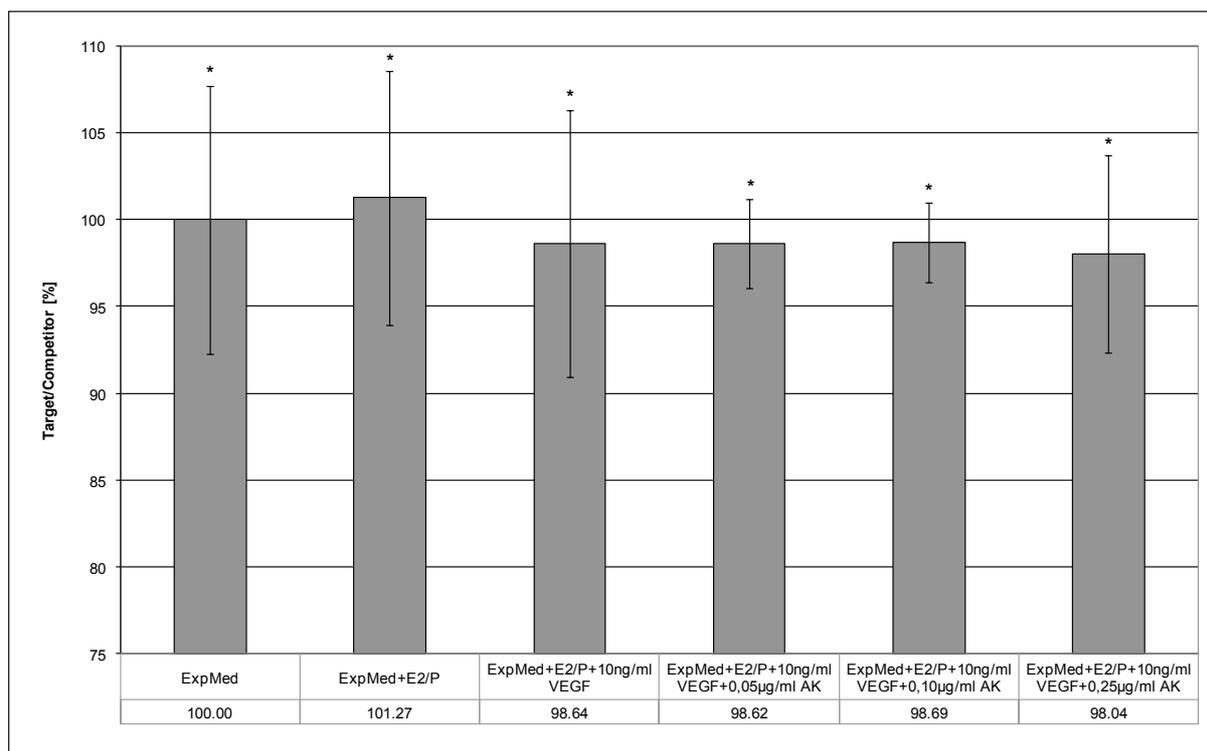
**Abb. 12: Kompetitive PCR sFlt-1**

Bei der VEGFR1 kompetitiven PCR wurden 0,002fmol/µl Kompetitor zugesetzt im Vergleich zur sFlt-1 kompetitiven PCR, in der 0,001fmol/µl zugesetzt wurde. Der mRNA-Gehalt des Rezeptors VEGFR1 beträgt also in menschlichen endometrialen Stromazellen ungefähr das Doppelte des mRNA-Gehaltes des Rezeptors sFlt-1.

Jede der Biopsieproben wurde insgesamt zweimal mit kompetitiver PCR auf die Expression von VEGFR1 und sFlt-1 untersucht und die Mittelwerte der Target/Kompetitor Verhältnisse gebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test.



**Abb. 13: VEGFR1 mRNA-Expression, dargestellt als Target/Kompetitor-Verhältnis [%], \* =  $p < 0.005$**



**Abb. 14: sFlt-1 mRNA-Expression, dargestellt als Target/Kompetitor-Verhältnis [%], \* =  $p < 0.005$**

Es konnte gezeigt werden, dass  $E_2P$  die mRNA-Expression von VEGFR1 signifikant senkt. Eine zusätzliche VEGF-Substitution dagegen hatte keinen weiteren Effekt. Die Zugabe von VEGF-AK bewirkt einen spezifischen Effekt: mit zunehmender Konzentration des Antikörpers steigt die Expression der VEGFR1-mRNA.

Während in dieser Arbeit für die Expression der VEGFR1-mRNA oben genannten Ergebnisse zusammengefasst werden konnten, zeigt sich für die Expression der mRNA des Antagonisten sFlt-1 keine Änderung durch die Zugabe von  $E_2P$ . Ebenso hat die Substitution von VEGF und VEGF-AK keinen regulierenden Einfluss auf die sFlt-1-mRNA Expression.

## 4. Diskussion

VEGF ist sowohl bei der physiologischen Angiogenese im weiblichen Reproduktionssystem als auch bei der pathologischen Angiogenese wie zum Beispiel beim Tumorstromawachstum oder der Endometriose [30][60] von entscheidender Bedeutung. Es wird beschrieben, dass VEGF für den feto-maternalen-Dialog vor und während der Implantation essentiell ist [46][77]. Beim Menschen wurden drei VEGF-Rezeptoren identifiziert: VEGFR1 und KDR, die VEGF mit hoher Spezifität binden sowie ein löslicher, zirkulierender Rezeptor: sFlt-1, der als spezifischer Antagonist zu VEGF agiert [15][19][56].

Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen VEGF mit seinen Rezeptoren VEGFR1 und sFlt-1 und deren Bedeutung bei der embryonalen Implantation ist unzureichend geklärt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten zum besseren Verständnis der im Rahmen der Implantation notwendigen endometrialen Angiogenese beitragen und für die Behandlung von Erkrankungen wie zum Beispiel der Präeklampsie oder der Endometriose von Bedeutung werden.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Expression von VEGF Rezeptor VEGFR1 und sFlt-1 in humanen, endometrialen Stromazellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Stroma der mRNA-Gehalt des VEGF-Rezeptors VEGFR1 annähernd doppelt so hoch ist wie der Gehalt an sFlt-1, dem spezifischen VEGF-Antagonisten. Während Östradiol und Progesteron die VEGFR1-Expression senkten, hatte VEGF dagegen keinen direkten regulierenden Effekt. Die Zugabe des VEGF-Antikörpers bewirkte einen Anstieg der VEGFR1-mRNA-Expression. Für den Antagonisten sFlt-1 dagegen ließ sich kein regulierender Einfluss durch Östradiol und Progesteron detektieren. Auch VEGF und die Zugabe des VEGF-Antikörpers übten keine Regulation auf die sFlt-1 Expression aus. Zusammenfassend könnten der Wachstumsfaktor VEGF und seine Rezeptoren bei den Mechanismen der embryonalen Implantation eine wichtige Rolle spielen.

Die unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Expression der VEGF-Rezeptoren im humanen Endometrium werden kontrovers diskutiert. Sugino *et al* haben gezeigt, dass die VEGF-Expression in endometrialen Stromazellen auf mRNA-Ebene durch den Einfluss von Östrogen und Progesteron

ansteigt, während die VEGFR1-Expression dadurch nicht beeinflusst wird. Die Immunfärbung für VEGFR1 von diesen dezidualisierten Stromazellen ist nur geringfügig [86].

Eine andere Arbeitsgruppe konnte an Endometriumpuben von Schweinen zeigen, dass VEGF und VEGFR1 während des Menstruationszyklus auf konstantem Level exprimiert werden. Diese Endometriumpuben wurden jedoch nicht in die Stroma- und Epithelfraktionen separiert. In derselben Arbeit wurde durch immunhistochemische Färbung ein deutlicher Nachweis für VEGF und VEGFR1 in Drüsenzellen und Gefäßen geführt, wohingegen die Anfärbung in Stromazellen uneinheitlich war. Durch Östrogen- und Progesteroneinfluss stieg die VEGF-Expression, die VEGFR1-Expression dagegen bleibt unbeeinflusst [39][86]. Die Arbeit von Möller *et al* beschreibt dies ebenso [58]. Es wurde eine schwache VEGF und VEGFR1-Expression in endometrialen Stromazellen detektiert. Dies unterstreicht die These der hier vorgelegten Arbeit, dass nicht die endometrialen Stromazellen die Regulation der VEGF-Rezeptor-Expression vornehmen, sondern die Epithelzellen der endometrialen Drüsen oder der Gefäße.

Krüssel *et al.* zeigten ein konstantes Expressionslevel von VEGFR1 während des Menstruationszyklus und für s-Flt 1 einen bis zu 3-fachen Expressionsanstieg während der mittleren und späten Proliferationsphase [47]. Im Vergleich zu der hier vorgelegten Arbeit wurden die Zellproben aus den unterschiedlichen Zyklusphasen gewonnen und sofort für die RNA-Präparation aufbereitet. Zudem wurden komplette Endometriumpuben verwendet.

Es besteht die Möglichkeit, dass VEGF die Rezeptorregulation nicht über autokrine Mechanismen steuert, sondern dass diese durch andere Faktoren als die Steroidhormone modifiziert wird. So ist es zum Beispiel möglich, dass VEGF mit anderen Faktoren wie zum Beispiel Hypoxie oder Zytokinen agiert [66][79]. Ein „Schwangerenmodell“ im Menschen zur Untersuchung dieser Mechanismen könnte einen besseren Einblick in die Beeinflussung der Embryoimplantation im humanen Endometrium geben, ist jedoch *in vivo* nahezu unmöglich.

Ergänzend zum molekulargenetischen Nachweis der VEGF-Rezeptor-Expression auf mRNA-Ebene könnten Untersuchungen auf Proteinebene, wie immunhistochemische

Verfahren und Western-blot-Analysen, Aussagen darüber treffen, wie viel mRNA translatiert wird und ob funktionsfähige Proteine exprimiert werden. Die Zellkultur wurde in der vorgelegten Arbeit als Modell favorisiert, da ein aktives Eingreifen in das zu untersuchende System möglich ist, wie zum Beispiel die durch Inkubation mit Östradiol und Progesteron erreichte Dezidualisierung. Die Immunhistochemie hat dagegen eher einen deskriptiven Charakter.

Es wird beschrieben, dass die Funktion und die möglichen Signalwirkungen von VEGFR1 wenigstens teilweise abhängig vom „Donor“, und vom Zelltyp sind [19]. Die Herkunft der Stromazellen könnte zusätzlich Differenzen der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erklären. Die Proben für diese Arbeit wurden von Patientinnen unterschiedlichen Alters, Herkunft und Anamnese, wie zum Beispiel präoperativer Medikamenteneinnahme gewonnen. Zudem konnte nicht bei allen Patientinnen von einer gesicherten Reproduktionsfähigkeit ausgegangen werden, da auch Biopsien von Nullipara verwendet wurden. In anderen Arbeiten wurde dies berücksichtigt [58].

Unterschiede der angewendeten Methoden und Materialien erklären ebenfalls differierende Ergebnisse. In der hier vorgelegten Arbeit wurden nach einer etablierten Methode Stromazellkulturen aus Endometriumbiopsien angelegt [33]. Durch unterschiedliche Passagezahl und Zellkulturmedien könnten sich die Zellen in einem unterschiedlichen Differenzierungsstadium befinden, was eventuell verschiedene Resultate bedingt.

Um die Zellkulturexperimente unter physiologischen Bedingungen des Endometriums der Sekretionsphase durchführen zu können, wurden die Stromazellen *in vitro* dezidualisiert [33]. Der Beginn der Dezidualisierung, nachgewiesen mit IGFBP-1 mRNA-Expression, wird in anderen Arbeitsgruppen ab dem Tag 12 der Inkubation mit Östradiol ( $10^{-8}$  M) und Progesteron ( $10^{-6}$  M) beschrieben. Darauf folgt ein weiterer Anstieg der IGFBP-1 mRNA-Expression. Die Zellen wurden dort schließlich 23 Tage inkubiert [66][87]. In der hier vorgelegten Arbeit wurde eine Inkubationsdauer von 12 Tagen festgelegt. Nach Überschreiten dieser Zeit kam es zudem häufig zu einem Ablösen der Zellen von der Kulturschale. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine zu kurz gewählte Inkubationszeit zu unvollständiger Dezidualisierung führen und somit die vorgelegten Ergebnisse verfälschen könnte. Tarantino *et al* be-

schreiben sogar einen lokalen Faktor, der vom „Conceptus“ abgegeben wird und den Dezidualisierungsvorgang von Stromazellen erst abschließt [90].

Die Untersuchung der VEGF-Rezeptorexpression und deren Regulation in anderen Zellpopulationen des humanen Endometriums, wie den glatten Muskelzellen und den Endothelzellen der Gefäße könnte als Gegenstand weiterer Arbeiten dienen, um die endometriale Angiogenese, das hormonabhängige Gefäßwachstum, als auch pathologischen Vorgänge, wie zum Beispiel die Präeklampsie oder uterine Blutungsstörungen, besser zu verstehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass VEGF und seine Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Embryoimplantation zukommt. Wir vermuten, dass die Regulation von VEGF Rezeptoren im rezeptiven Endometrium nicht überwiegend durch die endometrialen Stromazellen vermittelt wird, sondern durch andere Zelltypen, wie zum Beispiel durch das Epithel der Drüsen oder Endothelzellen der endometrialen Gefäße.

## 5. Zusammenfassung

Der Wachstumsfaktor VEGF ist bei der physiologischen Angiogenese im weiblichen Reproduktionssystem von entscheidender Bedeutung. Im menschlichen Endometrium wird VEGF in allen Zelltypen und in allen Phasen des Menstruationszyklus exprimiert mit einem Maximum in der Sekretionsphase also dem Zeitpunkt der embryonalen Implantation. VEGF spielt auch eine Rolle bei der pathologischen Angiogenese. Die Regulation von VEGF und seinen Rezeptoren VEGFR1 und sFlt-1 während der embryonalen Implantation ist bisher unzureichend geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation des VEGF-Systems in endometrialen Stromazellen auf der Ebene der mRNA-Expression der Rezeptoren VEGFR1 und sFlt-1 zu untersuchen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Estradiol und Progesteron senken die mRNA-Expression von VEGFR1 signifikant, eine zusätzliche VEGF-Substitution dagegen hat keinen weiteren Effekt. Die Zugabe von VEGF-AK bewirkt einen spezifischen Effekt. Mit zunehmender Konzentration des Antikörpers steigt die Expression der VEGFR1-mRNA.
2. Die Expression der mRNA des Antagonisten sFlt-1 zeigt keine Änderung durch die Zugabe von E<sub>2</sub>P. Ebenso hat die Ko-Inkubation von VEGF und VEGF-AK keinen regulierenden Einfluss auf die sFlt-1-mRNA Expression.
3. Wir vermuten, dass die Regulation von VEGF Rezeptoren im rezeptiven Endometrium nicht überwiegend durch die endometrialen Stromazellen vermittelt wird, sondern durch andere Zelltypen, wie zum Beispiel durch das Epithel der Drüsen oder Endothelzellen der endometrialen Gefäße.

Erkenntnisse zur Regulation des VEGF-Systems könnten zur Verbesserung der Bedingungen in der assistierten Reproduktion dienen. Zudem könnten sie den Angriffspunkt neuer Therapiekonzepte zur Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen wie der Tumorgenese, der Präeklampsie oder der Endometriose darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Barleon B, Sozzani S, Zhou D et al. Migratin of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-3343.
2. Baulieu E. Contraception and other clinical applications of RU-486, an antiprogestone at the receptor. *Science* 1989; 245: 1351-1351.
3. Beier-Hellwig K, Sterzik K, Beier HM. Molekulare und zellbiologische Aspekte der endometrialen Rezeptivität und ihre Diagnostik. *Der Gynäkologe* 1998; 4: 325-338.
4. Bell SC. Secretory proteins of the endometrium-potential markers for endometrial dysfunction. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 1989; 3: 271-
5. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537-542.
6. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. Cellular localization of Vascular endothelial Growth Factor in Ovine Placents and Fetal membranes. *Placenta* 2000; 21: 203-209.
7. Bonduelle ML, Dodd R, Libaers I et al. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Human Reproduction* 1988; 3: 909-914.
8. Brenner RM, West NB. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annual Reviews of Physiology* 1975; 37: 273-
9. Brosens J, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual Prolactin Expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4809-4820.
10. Burton GJ, Reshetnikova OS, Milanov AP et al. Stereological Evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress. *Journal of vascular research* 1996; 33: 181-194.
11. Buster J, Bustillo M, Rodi I et al. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1985; 153: 211-217.
12. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA et al. Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and chorioncarcinoma cells. *Biol.Reprod.* 1994; 51: 524-530.
13. Cohen T, Gitay-Goren H, Sharon R et al. VEGF-121 a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lackig heparin binding ability, requires cell-surface heparan-sulfates for efficient binding to the VEGF receptors

- of human melanoa cells. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270: 11322-11326.
14. Davis S, Aldrich TH, Jones PF et al. Isolationngiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretiontrap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-1169.
  15. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H et al. The fms-like thyrosin kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989-991.
  16. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schulze-Mosgau A, Schneider KTM, Weiss J. *Gynäkologie und Geburtshilfe* 2007. Springer,
  17. Fazleabas AT, Hild-Petito S, Verhage HG. Secretory proteins and growth factors of th baboon (*Papio anubis*) uterus: potential roles in pregnancy. *Cell Biology International* 1994; 18: 1145-
  18. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 1997; 18: 4-25.
  19. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003; 9: 669-676.
  20. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 161: 851-858.
  21. Garzia E, Borgato S, Cozzi V et al. Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Human Reproduction* 2004; 19: 1911-1916.
  22. Geva E, Jaffe RB. Role of Angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstetrical and gynecological survey* 2000; 55: 511-519.
  23. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and chracterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proceedings of the national Academy of science of the United States of America* 1989; 86: 7311-7315.
  24. Graubert MD, Ortega MA, Kessel B et al. Vascular repair after menstruation involves regulation of vascular endothelial growth factor-receptor phosphorylation by sFLT-1. *The American Journal of pathology* 2001; 158: 1399-1410.
  25. Harada M, Osuga Y, Takemura Y et al. Mechanical strech upregulates IGfBP-1 secretion from decidualized endometrial stromal cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006; 290: 268-272.

26. Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W. Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1998; 123: 259-265.
27. Herve MA, Meduri G, Petit FG et al. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *Journal of Endocrinology* 2006; 188: 91-99.
28. Houck KA, Ferrara N, Winer J et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 1991; 5: 1814-
29. Huang H-Y, Wenm Y, Irwin JC et al. Cytokine-Mediated Regulation of 92-Kilodalton Type IV Collagenase, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Human Endometrial Stromal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 1998; 83: 1721-1729.
30. Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 2003; 88: 2889-2899.
31. Hyder SM. The role of steroid hormones on the regulation of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Pathology* 2002; 161: 345-346.
32. Hyder SM, Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Molecular Endocrinology* 1999; 13: 806-811.
33. Irwin JC, Kirk D, King D et al. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril* 1989; 52: 761-768.
34. Jabbour HN, Critchley HOD, Boddy SC. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: Janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 1998; 83: 2545-2553.
35. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sack limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus- a review. *Placenta* 2003; 24: 86-93.
36. Jensen R. Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review. *Surgical neurology* 1998; 49: 189-196.
37. Joshi SG. Progestin-regulated proteins of the human endometrium. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1983; 1: 221-

38. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *Journal of cellular physiology* 1997; 173: 211-215.
39. Kaczmarek M, Waclawik A, Blitek A et al. Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor System in the porcine endometrium throughout the estrous cycle and early pregnancy. *Molekular Reproduction and Development* 2008; 75: 362-372.
40. Keck PJ, Hauser S.D., Krivi G. Vascular permeability factor, an endothelial mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1312.
41. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the national Academy of science of the United States of America* 1993; 90: 10705-10709.
42. Kirstein MN, Moore MM, Dudek AZ. Review of selected patents for cancer therapy targeting tumor angiogenesis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006; 1: 153-161.
43. Kranz A, Mayr U, Frank H et al. The coronary endothelium: A target for VEGF. Human artery endothelial cells express functional receptor for VEGF in vitro and in vivo. *Laboratory investigations* 1999; 79: 985-991.
44. Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 265: 636-639.
45. Krüssel JS, Behr B, Milki AA et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 57-63.
46. Krüssel JS, Bielfeld P, Mary Lake P et al. Regulation of embryonic implantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; 110: 2-9.
47. Krüssel JS, Casan EM, Raga F et al. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor transmembrane receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5: 452-458.
48. Krüssel JS, Huang H-Y, Simon C. Single Blastomers within human preimplantation embryos express different amounts of messenger ribonucleid acid for  $\beta$ -actin and interleukin-1 receptor type I. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1998; 83: 953-959.
49. Krüssel JS, Simon C, Rubio M.C. Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 1998; 13: 2206-2211.

50. Kutsukake M, Ishihara R, Yoshie M et al. Involvement insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 in dezidualization of human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* 2007; 13: 737-743.
51. Lessey BA, Killam AP, Metzger DA et al. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1988; 67: 334-340.
52. Lessey BA, Lovely LP. Implantation. in: Keel, B. A., May, J. V., and De Jonge, C. J. (Hrsg.), *Handbook of the Assisted Reproduction Laboratory* 2000. Informa Healthcare, London. 34-35.
53. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenetic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
54. Lockwood CJ, Krikum G, Goo AB et al. Differential effects of thrombin and hypoxia on endometrial stroma and glandular epithelial cells vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002; 87: 4280-4286.
55. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for TIE2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
56. Matthews W, Jordan CT, Gavi M et al. A receptor tyrosin kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hemopoetic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proceedings of the national Academy of science of the United States of America* 1991; 88: 9026-9030.
57. Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835-846.
58. Möller B, Rasmussen C, Lindblom B et al. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 65-72.
59. Moore KL, Persaud TVN, Lütjen-Drecoll E. *Embryologie* 2001. Schattauer, Stuttgart. 128-132.
60. Nap AW, Griffioen AW, Dunselmann GA. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 2004; 89: 1089-1095.
61. Neufeld G, Cohen T, Gitay-Goren H et al. Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer metastasis reviews* 1996; 15: 153-158.
62. Neufeld G, Cohnen T, Gengrinovitch S et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Official publication of the Federation of American Societis for experimental Biology* 1999; 13: 9-22.

63. Nieder C, Wiedenmann N, Andratschke NH et al. Radiation therapy plus angiogenesis inhibition with bevacizumab: rationale and initial experience. *Reviews on recent clinical trials* 2007; 2: 163-168.
64. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345: 1400-1407.
65. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subendothelial matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular biology of the cell* 1993; 4: 1317-1326.
66. Patterson C, Perrella MA, Endege WO et al. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor- $\alpha$  in cultured human vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 496-
67. Pfeleiderer A, Breckwoldt M, Gerhard M. Gynäkologie und Geburtshilfe 2007. Stuttgart.
68. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB et al. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 1981; 2: 303-316.
69. Plaisier M, Rodriguez S, Willems F et al. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertility and Sterility* 2007; 88: 176-187.
70. Plouet J, Moukadir H. Characterization of the receptor of vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *Journal of biological chemistry* 1990; 265: 22071-22074.
71. Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Annals of the New York Academy of sciences* 1986; 476: 36-42.
72. Punyadeera C, Thijssen VL, Tchaikovski S et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor ligands and receptors during menstruation and post-menstrual repair of human endometrium. *Molecular Human Reproduction* 2006; 12: 367-375.
73. Quinn TP, Peters KG, De Vries C et al. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the national Academy of science of the United States of America* 1993; 90: 7533-7537.
74. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive System. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 1992; 6: 886-892.

75. Rodesch F, Simon P, Donner C et al. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissue during early pregnancy. *Obstetrical and gynecological survey* 1992; 80: 283-285.
76. Savouret JF, Chaucherau A, Misrahi M et al. The progesterone receptor. Biological effects of progestins and antiprogestins. *Human Reproduction* 1994; 9: 1-7.
77. Schanz A, Hess A, Shahin A et al. Molekulare Mechanismen der Embryoimplantation im Endometrium. *Der Gynäkologe* 2004; 37: 123-127.
78. Schneider H, Raio L, Knöfler M. Präimplantation, Implantation und Plazentation: Bedeutung für den Schwangerschaftsverlauf. in: Schneider, H., Husslein, P., and Schneider, K. T. M. (Hrsg.), *Die Geburtshilfe* 2006. Springer, Berlin. 11-11.
79. Sharkey AM, Day A, McPherson A et al. Vascular endothelial growth factor expression is regulated by hypoxia. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 2000; 85: 402-409.
80. Shibuya M. Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Advances in cancer research* 1995; 67: 281-316.
81. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor tyrosin kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5: 519-524.
82. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1996; 81: 3112-3118.
83. Shin-Young K, Hyun-Mee R, Jae-Hyug Y et al. Increased sFlt-1 PIGF Ratio in women who subsequently develop preeclampsia. *Journal of Korean medical science* 2007; 22: 873-877.
84. Sinowatz F, Seitz J, Bergmann M et al. *Embryologie des Menschen*. .. 1999;
85. Stoner M, Wang F, Wormke M et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in HEC1A endometrial cancer cells through interactions of estrogen receptor alpha and Sp3 proteins. *Journal of biological chemistry* 2000; 275: 22769-22779.
86. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 2002; 123: 379-387.

87. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S et al. Induction of superoxide dismutase by decidualization in human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* 2000; 6: 178-184.
88. Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S et al. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction* 1996; 11: 1073-1078.
89. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K et al. Protein tyrosin kinase expressed in glomeruli and cultured glomerular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 209: 218-226.
90. Tarantino S, Verhage HG, Fazleabas AT. Regulation of insulin-like growth factor-binding proteins in the baboon (*Papio anubis*) uterus during early pregnancy. *Endocrinology* 1992; 130: 2354-2362.
91. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrio ME et al. Identification of the KDR tyrosin kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; 187: 1586-
92. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosin kinase. *Oncogene* 1991; 6: 1677-1683.
93. Terman BI, Dougher-Vermazen M. Biological Properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer metastasis rev* 1996; 15: 159-163.
94. Tischer E, Mitchell R, Hartmann T et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266: 11947-11954.
95. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA et al. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertility and Sterility* 1996; 66: 72-80.
96. Tsai SJ, Wiltbank MC. Quantification of mRNA using kompetitive RT/PCR with standard curve methodology. *Biotechniques* 1996;
97. Tseng L, Mazela J. Prolactin and its receptor in human endometrium. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1999; 17: 7-23.
98. Vaisman N, Gospodariwicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of biological chemistry* 1990; 265: 19461-19466.
99. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A et al. Different signal transducing properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of biological chemistry* 1994; 269: 26988-26995.

100. Wang JD, Zhu JB, Shi WL et al. Immunocytochemical colocalization of progesterone receptor and prolactin in individual stromal cells of human decidua. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 1994; 79: 293-297.
101. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular diversity* 2006; 10: 515-527.
102. Zhang J, Lu A, Beech D et al. Targeting the VEGF pathway: antiangiogenic strategies in the treatment of non-small lung cancer. *Cancer Therapy* 2007; 5: 273-286.
103. Zygmunt M, Herr F, Münstedt C et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; 110: 10-18.

## 7. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. J.S. Krüssel danke ich für die Überlassung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Für seine uneingeschränkte Unterstützung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Seine fachliche Kompetenz und sein Engagement werden mir immer ein Vorbild sein.

Bei meinem Korreferenten PD Dr. G. Giers bedanke ich mich sehr für seine Unterstützung.

Frau Dr. med. A. Schanz und Herrn Dr. rer. nat. J. Hirchenhain danke ich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten. Sie haben geduldig manchen „Umweg“ toleriert, um mich immer wieder in selbstständigem Arbeiten zu bestärken.

Bei Frau Dr. rer. nat. D. M. Baston-Büst bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Arbeiten im endokrinologischen Labor. Dieser Dank gilt auch Frau Dr. med. A. Hess, beide haben mich durch ihre Faszination für „die Forschung“ besonders motiviert. Ich danke allen Labormitarbeitern für die stetige Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge und ihre fruchtbaren Ideen.

Ein besonderer Dank gilt Julia K., Sandra, Kerstin und Julia T., die mich stets geduldig unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Rosa Maria und Hans-Peter Volkmer bedanken, ohne sie wären die Erfüllung meines Berufswunsches und diese Arbeit nicht möglich geworden. Meinen Geschwistern Jens-Peter, Niels-Christian und Sven-Michael danke ich sehr, sie sind einzigartig. Die Unterstützung meiner Familie und ihr Rückhalt sind mir in allen Lebenslagen eine unvergleichliche Hilfe.

## 8. Lebenslauf

Anne-Kathrin Volkmer  
geboren am 13. August 1978 in Düsseldorf

### Hochschulausbildung

10/98 – 10/99	Studium der Humanmedizin (vorklinische Ausbildung) Freie Universität Berlin, Berlin
10/99 – 05/06	Studium der Humanmedizin (vorklinische und klinische Ausbildung) Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf, Düsseldorf
03/02	Ärztliche Vorprüfung
03/03	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/05	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/06	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Düsseldorf, den 13.12.2010

Anne-Kathrin Volkmer