

Untersuchungen zur Rolle der angiogenetischen Wachstumsfaktoren
VEGF und Angiopoietin im zyklischen Endometrium und bei der
embryonalen Implantation

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Isabelle Huse, geb. Sonnerat
aus Müllheim

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans- Georg Bender

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 2003

INHALT

1 EINLEITUNG	1
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 Präimplantationsentwicklung	5
1.2.2 Embryonale Implantation	7
1.3 Endometriale Rezeptivität und molekulare Grundlagen der Implantation	9
1.4 Angiogenese im Endometrium und bei der embryonalen Implantation	12
1.5 Das <i>vascular endothelial growth factor</i> - (VEGF-) System	14
1.6 Die Angiopoietine.....	20
1.7 Wissenschaftliche Fragestellungen.....	24
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Maus Zygoten und Präimplantationsembryonen	26
2.1.1 Versuchstiere	26
2.1.2 Gewinnung der Zygoten und Präimplantationsembryonen.....	26
2.1.3 <i>In vitro</i> Kultur von Präimplantationsembryonen.....	28
2.1.4 Poolen von Embryonen in Uteri	28
2.2 Biopsiematerial	29
2.3 Zellkultur	29
2.3.1 Zellkulturmedien	30
2.3.2 Extraktion der Zellen aus nativem Gewebe	30
2.3.3 Passagieren der Zellen.....	32
2.3.4 Kryokonservierung der Zellen	32
2.3.5 Dezidualisierung der Stromazellen	32
2.3.6 Zellkulturexperimente	33
2.4 Arbeiten mit RNA	33
2.4.1 Isolierung von RNA aus Gewebe	33
2.4.2 RNA Isolierung aus Zellkulturen	34
2.5 Reverse Transkription.....	34
2.5.1 Reverse Transkription von extrahierter RNA	34
2.5.2 Reverse Transkription embryonaler RNA	35
2.6 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	37
2.6.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	37
2.6.2 Kontrolle der reversen Transkription durch β -Actin PCR	40
2.6.3 Kompetitive PCR	41
2.6.3.1 Synthese des Kompetitors	41
2.6.3.2 Ansatz der kompetitiven PCR	42
2.6.4 Nested PCR	44
2.6.5 Multiplex PCR.....	46
2.7 Agarosegel-Elektrophorese	47
2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	47

2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.10 DNA-Sequenzierung	48
2.11 Histologische Techniken	48
2.11.1 Paraffinschnitte.....	48
2.11.2 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten	49
2.11.3 Immunhistochemie an Zell-Monolayern	50
2.12 Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA).....	50
3 ERGEBNISSE	52
3.1 β -Actin-Expression der Maus-Präimplantationsembryonen.....	52
3.2 mRNA-Expression des VEGF-Systems in Präimplantationsembryonen der Maus	53
3.3 Expressionsmuster der VEGF-Isoformen in Maus-Embryonen	55
3.4 Expression des VEGF ₁₆₄ spezifischen Rezeptors Neuropilin-1 in Embryonen der Maus	59
3.5 Ang-1 und Ang-2 Expression in Maus-Präimplantationsembryonen	59
3.6 Expression des VEGF-Systems, Neuropilin-1 und der Angiopoietine in Zygoten der Maus	61
3.7 VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 Protein-Expression im System Embryo- Endometrium bei der Maus	62
3.8 VEGF-Protein im Kulturmedium von Maus-Embryonen.....	64
3.9 Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors Tie-2 im zyklischen Endometrium.....	65
3.9.1 Nachweis von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 im Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen durch kompetitive PCR	65
3.9.2 Untersuchung der Ang-1 und Ang-2 mRNA-Expression in menschlichem Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen durch Multiplex-PCR	69
3.9.3 Ang-1 und Ang-2 Expression in endometrialen Epithel- und Stromazellen	71
3.10 Protein-Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 im zyklischen Endometrium	72
3.11 Endometriale Neuropilin-1 Expression im Verlauf des Menstruationszyklus	75
3.12 Regulation der endometrialen Ang-1, Ang-2 und Tie-2 Expression durch die Steroidhormone.....	77
3.13 Wirkung von <i>human chorionic gonadotropin</i> (HCG) auf die endometriale Expression von VEGF, Ang-1, Ang-2 und Tie-2	82
3.14 Einfluss von IL-1 β auf die Expression des VEGF-Systems dezidualisierter Stromazellen	85
4 DISKUSSION	88
4.1 Expression des VEGF-Systems in Maus-Präimplantationsembryonen.....	89
4.2 Expressionsmuster der VEGF-Isoformen in Präimplantationsembryonen der Maus	94
4.3 Expression und zyklische Regulation des VEGF ₁₆₄ spezifischen Rezeptors Neuropilin-1 im menschlichen Endometrium	96
4.4 mRNA-Expression von Neuropilin-1 in Maus-Präimplantationsembryonen.....	98

4.5 Expression der Angiopoietine 1 und 2 und ihres Rezeptors Tie-2 im zyklischen Endometrium	99
4.6 mRNA-Expression von Ang-1 und Ang-2 in Präimplantationsembryonen der Maus	102
4.7 Einfluss von <i>human chorionic gonadotropin</i> (HCG) auf die endometriale mRNA-Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren	103
4.8 Einfluss des Zytokins IL-1 β auf die mRNA-Expression des VEGF-Systems in dezidualisierten Stromazellen	106
4.9 VEGF und die Angiopoietine bei der Angiogenese im zyklischen Endometrium und im Rahmen der embryonalen Implantation	108
5 ZUSAMMENFASSUNG	111
6 LITERATUR	113

1 EINLEITUNG

In den westlichen Industrienationen ist ungefähr jedes neunte Paar im fortpflanzungsfähigen Alter von unerfülltem Kinderwunsch betroffen. Zur Behandlung der ungewollten Kinderlosigkeit werden eine Vielzahl von Techniken der assistierten Reproduktion (ART) eingesetzt. Das Spektrum dieser Methoden reicht von der Beobachtung des menstruellen Zyklus mit Bestimmung des Ovulationszeitpunktes und Empfehlung zum Geschlechtsverkehr am optimalen Konzeptionszeitpunkt über milde Stimulationsbehandlungen mit intrauteriner Insemination der aufbereiteten Spermien nach medikamentös induzierter Ovulation bis hin zur künstlichen Befruchtung (*in vitro* Fertilisation, IVF). Im Rahmen der IVF ist eine erfolgreiche Fertilisierung in nahezu allen Fällen zu erreichen. Dennoch sind die Schwangerschaftsraten und die „baby-take-home“-Raten unbefriedigend niedrig. Nur bei durchschnittlich 24,5% kommt es nach einem Embryonentransfer zu einer klinischen Schwangerschaft. Die „baby-take-home“-Rate liegt sogar nur bei durchschnittlich 15% (Deutsches IVF-Register [DIR], 2000).

Der Eintritt einer intrauterinen Schwangerschaft beim Menschen beruht nach erfolgreicher Befruchtung auf zwei grundlegenden Voraussetzungen: der physiologischen Reifung des Embryos während der 4-5 Tage des Transportes durch den Eileiter und der zeitgerechten Entwicklung eines rezeptiven Endometriums (Gebärmutterschleimhaut). Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann der Embryo implantieren und die Schwangerschaft aufrecht erhalten werden.

Das Endometrium wird in jedem menstruellen Zyklus auf die Implantation eines Embryos vorbereitet. Der zyklische Aufbau des Gewebes umfasst die Proliferation und Differenzierung der endometrialen Zellen sowie die Sekretion bestimmter endometrialer Proteine. Ein wichtiger Aspekt dieses Aufbaus ist die Bildung eines dichten Netzwerkes an Blutgefäßen, ausgehend von den nach der Menstruation noch vorhandenen Gefäßstümpfen. Das Endometrium ist damit neben dem Ovar das einzige Gewebe des adulten Organismus, in dem unter physiologischen Bedingungen Angiogenese stattfindet. Angiogenese, das Wachstum neuer Blutgefäße durch Teilung und Migration von Endothelzellen, tritt sonst nur unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. beim Wachstum von Tumoren, sowie in der Embryonalentwicklung auf.

Auch bei der embryonalen Implantation ist Angiogenese zwingend erforderlich. Der Embryo muss bei der Implantation zunächst das Epithel des Endometriums durchdringen, um sich dann im endometrialen Stroma einnisten zu können.

Zum erfolgreichen Abschluss der Implantation muss der Embryo schließlich Anschluss an die maternalen Gefäße finden und die Plazenta ausbilden. Nur so kann seine Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gewährleistet und die Schwangerschaft aufrecht erhalten werden.

Trotz der großen Bedeutung der Angiogenese im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation sind die molekularen Mechanismen dieser angiogenetischen Prozesse und die bei der Implantation stattfindende Embryo-maternale Kommunikation bislang noch weitestgehend unverstanden. Die Erforschung dieser molekularen Zusammenhänge wird zu einem besseren Verständnis der Rezeptivität des Endometriums und des Implantationsprozesses beitragen. Dadurch könnten sich Ansätze zur Verbesserung der Implantations- und Schwangerschaftsraten in der klinischen Praxis der assistierten Reproduktion (IVF) ergeben, ebenso wie Möglichkeiten zur Prävention und Therapie von extrauterinen Schwangerschaften.

1.1 Physiologie des Endometriums und des menstruellen Zyklus

1.1.1 Das Endometrium

Das Endometrium bildet die Schleimhaut, die das Cavum uteri auskleidet. Es sitzt auf einer Schicht glatter Muskulatur, dem Myometrium und besteht hauptsächlich aus einer epithelialen Zellpopulation, wobei man das Oberflächenepithel und die verschiedenen glandulären, epithelialen Zellen unterscheidet, sowie aus einer speziellen Art von Fibroblasten, dem Stroma. Diese spezialisierten Zellen haben die Fähigkeit sich schnell in Deziduazellen zu transformieren, wenn ein Embryo zu implantieren beginnt. Man bezeichnet sie daher auch als Prädezidualzellen (Beier-Hellwig *et al.* 1998).

Das Endometrium lässt sich morphologisch und funktionell in zwei Schichten gliedern, die ohne scharfe Grenze ineinander übergehen (Abb. 1). Unmittelbar dem Myometrium folgt eine dünne, basale Schicht, die Basalis. Diese ist zellreicher als der übrige Anteil des Endometriums und enthält die Endabschnitte der Uterusdrüsen. Die Basalis hat eine eigene Blutversorgung und wird während der Menstruation nicht abgestoßen. Über ihr liegt die Funktionalis, die sich wiederum in eine etwas dickere Zona Spongiosa und in eine dünne, oberflächliche Zona Kompakta unterteilt. Die Spongiosaschicht ist durch ein ödematöses Stroma, sowie durch erweiterte und gewundene Drüsenschläuche charakterisiert, wohingegen die Kompakta hauptsächlich aus dicht gepackten, um die Drüsenhäuse herum gruppierten Stromazellen besteht (Sinowatz *et al.* 1999).

In der Funktionalis spielen sich die zyklischen Veränderung des Endometriums ab. Sie löst sich bei der Menstruation und bei der Geburt von der Basalis ab und wird dann im Verlauf des Menstruationszyklus wieder aufgebaut.

Über das ganze Endometrium verteilt finden sich üppig proliferierende Blutgefäße (Abb. 1). Die basal liegenden Arterien zweigen sich in der Funktionalis in die terminalen Spiralarterien auf, die dann in periglanduläre und subepitheliale Kapillaren übergehen.

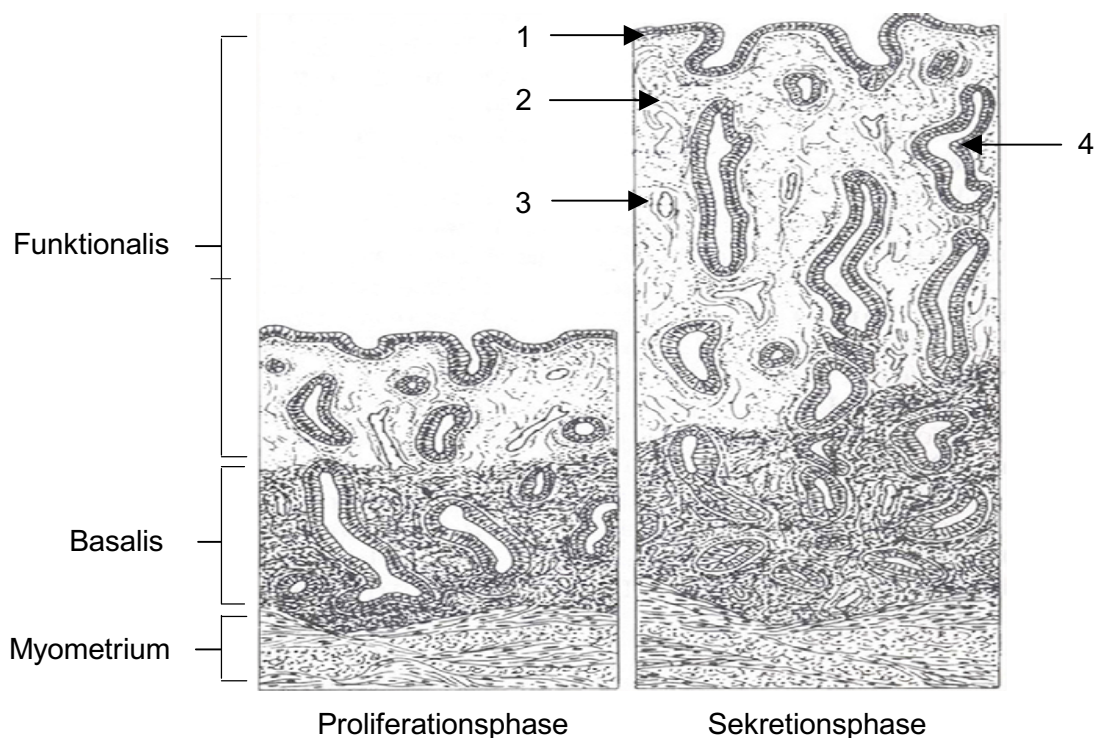


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Endometriums der Proliferationsphase und der Sekretionsphase, modifiziert nach Sinowatz *et al.* 1999. 1: Oberflächenepithel, 2: Bindegewebe (Stroma), 3: Kapillaren, 4: Uterusdrüsen.

1.1.2 Der Menstruationszyklus

Bei der Menstruation löst sich die oberflächliche Schicht des Endometriums, die Funktionalis, von der unteren Schicht, der Basalis, ab. Der 1. Tag der Menstruation wird allgemein als der Beginn des Menstruationszyklus definiert. Die Länge des regulären Menstruationszyklus beträgt 28 ± 2 Tage. Er wird in die Proliferationsphase und in die Sekretionsphase der Uterusschleimhaut unterteilt.

Die Proliferationsphase umfasst die erste Hälfte des Zyklus und dient dem Aufbau des Endometriums. Dieses 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 vorhandenen Drüsenstümpfen. Auch die Spiralarterien wachsen ausgehend von den Arterien der Basalis. Die Proliferationsphase entspricht zeitlich der Follikelphase des ovariellen Zyklus.

Auf sie folgt die Sekretionsphase, die von der Ovulation bis zur menstruellen Abstoßung der Uterusschleimhaut reicht. In dieser Phase des Zyklus setzt sich das Wachstum der Uterusdrüsen fort, die Proliferation der Endothelzellen und das Wachstum der Spiralarterien dauert an. Die Uterusdrüsen sondern ein glykogenreiches Sekret ab, welches die erweiterten und geknäulten Drüsenschläuche ausfüllt. Daher bezeichnet man diese Veränderungen des Endometriums auch als sekretorische Transformation. Zur gleichen Zeit lagern die Stromazellen Lipide und Glykogen ein, so dass es zu einer weiteren Verdickung des Endometriums kommt. Die Sekretionsphase entspricht zeitlich der Lutealphase des ovariellen Zyklus. Sie dient der Vorbereitung des Endometriums auf die Einnistung eines Embryos. Wird eine Oozyte ovuliert und befruchtet, so implantiert sich der entstandene Embryo in der Regel um den 6. Tag der Sekretionsphase bzw. um den 20. Tag des Menstruationszyklus in das Endometrium. Bei Ausbleiben der Befruchtung kommt es am Ende der Sekretionsphase zur Regression des sekretorisch-transformierten Endometriums, das in kurzer Zeit zerfällt und bei Erhalt der Zona basalis in Form der Menstruation abgestoßen wird.

Der Menstruationszyklus wird maßgeblich durch die im Ovar gebildeten Steroidhormone Östradiol und Progesteron gesteuert. In der ersten Hälfte des Zyklus, der Proliferations- oder Follikelphase, bilden und sezernieren die Granulosazellen des wachsenden Follikels verstärkt Östradiol. Dies bewirkt die Proliferation des Endometriums. Nach der Ovulation kommt es in der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus mit der Ausbildung des Corpus Luteum zu einer stark erhöhten Sekretion von Progesteron. Diese wiederum führt zur sekretorischen Differenzierung der endometrialen Zellen und somit zur Ausbildung eines rezeptiven Endometriums. Bleibt eine Konzeption aus, so degeneriert das Corpus Luteum etwa 12 bis 14 Tage nach der Ovulation. Dadurch sinken die Progesteron- und Östrogenkonzentrationen und es kommt zum enzymatischen Abbau des Endometriums und zur Menstruation.

1.2 Physiologie der frühen Embryonalentwicklung und der embryonalen Implantation

1.2.1 Präimplantationsentwicklung

Die Verschmelzung eines Spermiums mit einer reifen Eizelle findet in der Ampulle des Eileiters statt. Einige Stunden vor der Ovulation (Eisprung) vollzieht die Oozyte die erste meiotische Teilung, eine Reduktionsteilung, bei der der Chromosomensatz halbiert wird. Es bilden sich die sekundäre Oozyte mit einem haploiden Chromosomensatz und der erste Polkörper, der mit einem ebenfalls haploiden Chromosomensatz ausgestoßen wird. Bis zur Ovulation (Eisprung) verbleibt die Eizelle im Metaphase II-Stadium.

Erst mit dem Eindringen des Spermiums in den Zelleib der Eizelle (Ooplasma), vollzieht sich die zweite meiotische Teilung und die befruchtete Eizelle (Zygote), sowie der zweite Polkörper entstehen.

Ungefähr 12 bis 24 Stunden nach Aufhebung des Metaphase II-Arrests lässt sich die im Gang befindliche Fertilisierung durch das Vorhandensein zweier Vorkerne (Pronuklei) morphologisch verifizieren (Abb. 2). Zwischen 24 und 36 Stunden nach Eindringen des Spermiums kommt es zu der ersten Zellteilung und damit zum kompletten Abschluss der Befruchtung.

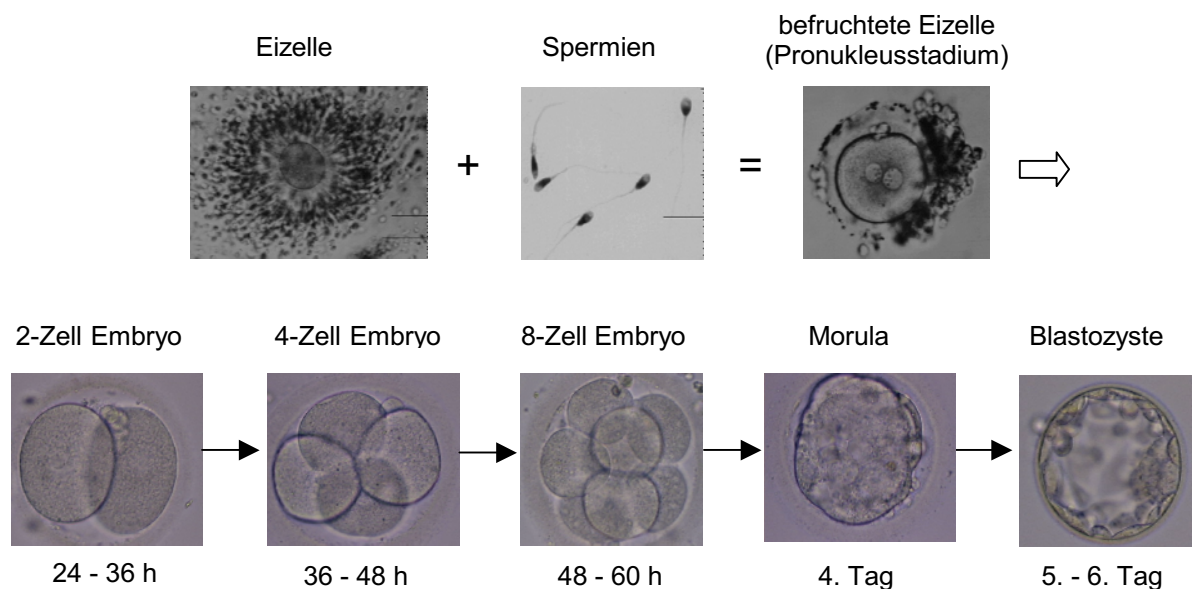


Abbildung 2: Gameten, Zygote und Präimplantationsembryonen des Menschen. Aufnahmen aus dem IVF-Labor der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf.

Der Embryo wandert nun während der nächsten Tage durch den Eileiter in Richtung Uterus. Hierbei kommt es ca. alle 12 Stunden zu einer mitotischen Teilung (Furchung) und somit zur Verdoppelung der Zellzahl. Die Menge des Zytoplasmas bleibt dabei gleich, so dass sich die Gesamtmasse des Embryos zunächst nicht wesentlich ändert.

Bis zum 4-Zell Stadium, ca. 36-48 Stunden nach Eindringen des Spermiums, erfolgt nach jeder mitotischen Teilung nur eine DNA-Replikation, jedoch noch keine RNA-Neusynthese. Da der Embryo aber über große Mengen an maternaler mRNA, Ribosomen und tRNA verfügt, ist eine begrenzte Biosynthese dennoch möglich. Das embryonale Genom wird beim Menschen erst nach dem 4-Zell Stadium aktiviert, wie sich aus Untersuchungen zur Inkorporation von [³H]Uridin in die embryonale RNA, sowie durch Analysen des vom Präimplantationsembryo synthetisierten Polypeptid-Musters gezeigt hat (Tesarik *et al.*, 1986; Braude *et al.*, 1988).

Nach dem 8-Zell-Stadium, verlieren die einzelnen Zellen des Embryos (Blastomeren) die Fähigkeit der Totipotenz. Bis zu dieser Zeit ist es theoretisch möglich, aus jeder einzelnen Blastomere ein weiteres komplettes, genetisch identisches Individuum zu schaffen. Nach dem Verlust der Totipotenz beginnt die Differenzierung der Zellen in den späteren embryonalen Anteil (Embryoblast) und in den plazentaren Anteil (Trophoblast). Der Beginn der Differenzierung in Embryoblast und Trophoblast lässt sich durch die Expression von humanem Choriongonadotropin- β (β -HCG), eines Trophoblast-spezifischen Proteins, festlegen. β -HCG ist eines der ersten Produkte des Embryos und konnte mittels in-situ Hybridisierung bereits im 8-Zell-Embryo nachgewiesen werden (Bonduelle *et al.*, 1988).

Nach dem 16-Zell Stadium, etwa an Tag 3-4 nach der Ovulation, gelangt der Embryo in die Gebärmutterhöhle. Es kommt zur Kompaktion der einzelnen Blastomeren zu einem dichten Verband, der als Morula bezeichnet wird. In diesem Stadium lassen sich lichtmikroskopisch keine einzelnen Zellen mehr abgrenzen.

Mit weiteren Zellteilungen bildet sich innerhalb des Embryos eine flüssigkeitsgefüllte Höhle, die Blastozele. Damit ist etwa 4 Tage nach der Befruchtung die sogenannte Blastozyste entstanden. Jetzt lassen sich auch lichtmikroskopisch der Embryoblastanteil („*inner cell mass*“) und der Trophoblastanteil (Trophektoderm) differenzieren (Abb. 3a).

Am Ende des fünften bzw. am Beginn des sechsten Tages, vor dem Anhaften der Blastozyste an die Gebärmutterschleimhaut, schlüpft die Blastozyste aus ihrer Hülle, der Zona pellucida (Abb. 3b).

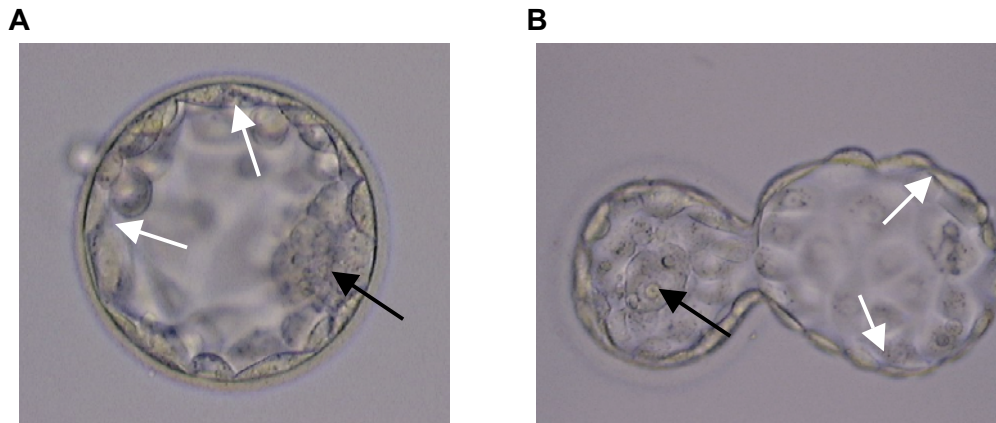


Abbildung 3: Menschliche Blastozyste vor (a) und während (b) des Schlüpfens. Trophoblastenteil (weiße Pfeile) und Embryoblastenteil (schwarze Pfeile) lassen sich deutlich abgrenzen. Aufnahmen aus dem IVF-Labor der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf.

1.2.2 Embryonale Implantation

Nach dem Schlüpfen der Blastozyste implantiert sich der Embryo an Tag 6-7 nach der Ovulation im Endometrium. Im Rahmen der eutopen Implantation werden 3 Phasen unterschieden: 1. Anhaftung (*attachment*), 2. Invasion und 3. Nidation und Plazentation.

Bei der Anhaftung der Blastozyste an das Endometrium nimmt der embryonale Pol der Blastozyste über den Trophoblasten Kontakt zum endometrialen Epithel auf. Dies ist nur möglich, wenn sich das Endometrium im rezeptiven Stadium der Sekretionsphase befindet. Der Trophoblastenteil der Blastozyste differenziert sich in einen den Embryo direkt umgebenden Teil, den Zytotrophoblasten, und in einen in das endometrielle Stroma vordringenden Anteil, den Synzytiotrophoblasten. Dann beginnt die Invasion des Embryos in das Endometrium. Der Synzytiotrophoblast durchdringt dabei die Epithelschicht und die Basalmembran des Endometriums, um sich dann im Stroma zu implantieren. Der Trophoblast setzt dann die Zellen des Zytotrophoblasten frei. Zwischen den Zellen des Embryoblasten und dem sich differenzierenden Trophoblasten treten kleine Spalträume auf, die zu der Amnionhöhle zusammen fließen. Gleichzeitig bildet sich im Embryoblasten die Keimscheibe. 9-10 Tage nach der Befruchtung ist der Embryo vollständig in das endometriale Stroma gebettet und die Implantationstelle wieder mit Uterusepithel bedeckt. (Abb. 4).

Der Substratbedarf des Embryos wird in der ersten Phase der Implantation hauptsächlich durch Diffusion bzw. Osmose zwischen Embryo und extrazellulärer Matrix des endometrialen Stromas gedeckt (Schmidt-Matthiesen, 1968).

Dafür vergrößern sich die den Embryo umgebenden Stromazellen sehr stark und nehmen reichlich Glykogen und Lipide auf (Dezidualisierung).

Zum erfolgreichen Abschluß der Implantation und zum weiteren Erhalt der Schwangerschaft jedoch ist der Anschluss an das mütterliche Gefäßsystem und die Induktion von Angiogenese durch den Embryo zwingend erforderlich. Nach der Invasion des endometriellen Stromas kommt es daher zur Ausbildung vaskulärer Beziehungen zwischen Embryo und Endometrium. Am 9. Tag nach der Ovulation bilden sich innerhalb des Synzytiotrophoblasten lakunäre Hohlräume, welche mit maternalem Blut aus den endometrialen Spiralarterien und mit dem Sekret der Uterusdrüsen gefüllt werden. Im weiteren Verlauf vereinigen sich diese Lakunen mit den Uterusgefäßen und es kommt ca. an Tag 12 nach der Ovulation zum Durchfluss des mütterlichen Blutes durch das plazentare Lakunensystem (uteroplazentarer Kreislauf) (Moore, 1997).

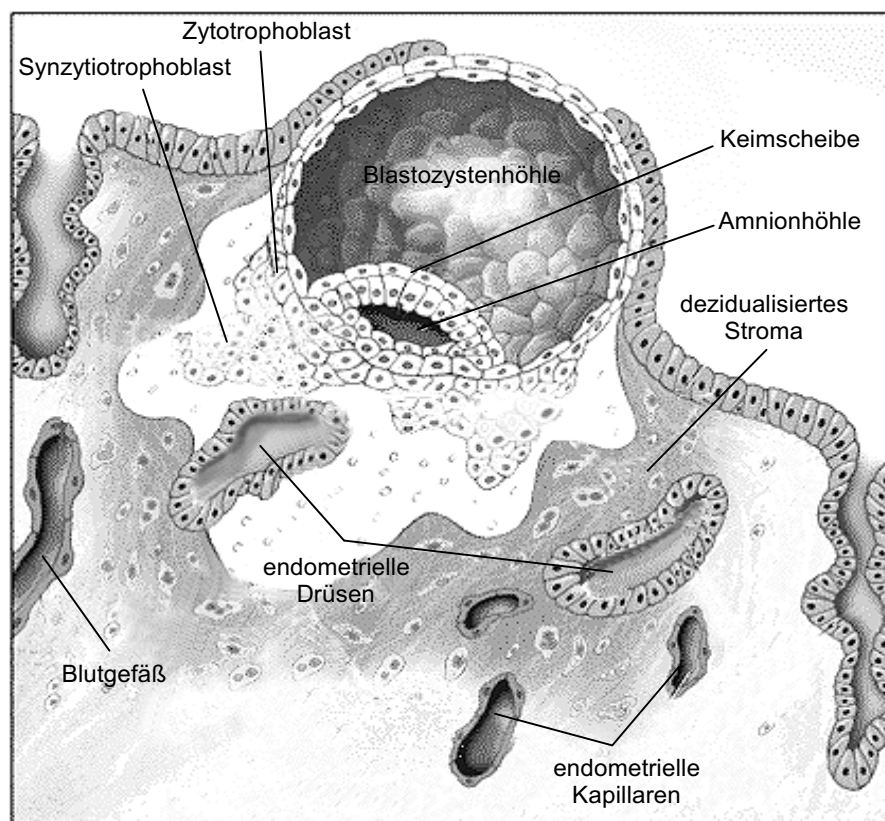


Abbildung 4: Implantation der Blastozyste; Das Diagramm zeigt eine implantierende Blastozyste, etwa 9 bis 10 Tage nach der Befruchtung (modifiziert nach Norwitz *et al.*, 2001).

1.3 Endometriale Rezeptivität und molekulare Grundlagen der Implantation

Die embryonale Implantation ist das Ergebnis komplexer molekularer Wechselwirkungen zwischen Embryo und Endometrium, die bislang noch weitestgehend unverstanden sind. Voraussetzungen für die Implantation sind ein rezeptives Endometrium und eine reife Blastozyste. Die Rezeptivität des Endometriums für die Implantation ist zeitlich klar begrenzt. Sie wird im Schnitt an Tag 20-24 des menstruellen Zyklus erreicht. Nur in diesem kurzen Zeitraum ist die Implantation eines Embryos möglich, daher nennt man diesen Zeitraum auch das Implantationsfenster („window of implantation“). Die zyklisch ablaufende Vorbereitung des Endometriums für die Implantation, d.h. Proliferation, Transformation und Sekretion wird maßgeblich durch die Steroidhormone Östradiol und Progesteron reguliert. Die endometriale Rezeptivität wird jedoch zusätzlich durch viele andere Faktoren, wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Diese parakrinen Faktoren steuern auch – zumindest teilweise- die Interaktion zwischen Embryo und Endometrium (Chard, 1996; Tazuke *et al.*, 1996; Übersichtsartikel Dietl, 2001) und damit die embryonale Implantation.

Am Beginn der Implantation steht die Zell-Zell-Adhäsion zwischen dem Trophoblastanteil der Blastozyste und dem endometrialen Oberflächenepithel. Die Adhäsion apikaler Plasmamembranen von Epithelzellen ist ein sehr ungewöhnlicher Vorgang, da diese normalerweise als nicht adhäsiv gelten. Daher sind zu Beginn der Implantation strukturelle und funktionelle Veränderungen der epithelialen Zellen des Endometriums und der Blastozyste erforderlich.

Für diese Veränderungen sind Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrine, verantwortlich. Integrine sind heterodimere, transmembranäre Glykoproteine, die mit Makromolekülen der extrazellulären Matrix (ECM) reagieren und so die Adhäsion von Zellen an die ECM entscheidend beeinflussen können. Im Endometrium zeigen manche Integrine eine Abhängigkeit ihrer Expression vom menstruellen Zyklus und einige Integrinuntereinheiten (α_1 , α_4 , α_v , β_3) werden ausschließlich in der Sekretionsphase exprimiert (Lessey *et al.*, 1992; Tabibzadeh *et al.*, 1992). Zudem konnte eine Beeinflussung der Integrin-Expression in endometrialen Epithelzell- (EEC-) Kulturen durch die Präsenz menschlicher Präimplantationsembryonen beobachtet werden (Simón *et al.*, 1997a).

Weitere wichtige Adhäsionsfaktoren zwischen Trophoblast und Endometrium sind große Glyko-Protein-Molekülkomplexe, wie Mukoproteine und Heparansulfatproteoglykane. Mukoproteine, wie das transmembranäre MUC-1, bilden auf vielen Schleimhautoberflächen eine Barriere, so auch auf der endometrialen Oberfläche.

Bei der Maus wird MUC-1 in großen Mengen auf der apikalen Seite des endometrialen Epithels exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass die Expression sich unmittelbar vor dem Implantationszeitpunkt drastisch verringert (Surveyor *et al.*, 1995; Carson *et al.*, 1998). Durch diese „Downregulation“ des großen Mukoproteins werden funktionelle Rezeptoren der Heparansulfatproteoglykane (HSPG) auf dem endometrialen Oberflächenepithel zugänglich für die HSPG- Liganden der Blastozystenoberfläche. Diese sind dann in der Lage, die Anheftung der Blastozyste entscheidend zu beeinflussen (Übersichtsartikel Beier-Hellwig *et al.*, 1998; Rohde *et al.*, 1993).

Nach der Adhäsion der Blastozyste an das Oberflächenepithel des Endometriums ist der nächste Schritt der embryonalen Implantation die Invasion des Trophoblasten in das endometriale Stroma. Hierfür ist eine aktive Zerstörung der extrazellulären Matrix der Epithelzellen erforderlich, die durch proteolytische Enzyme, wie den Matrixmetalloproteinasen (MMP's) und ihren spezifischen Inhibitoren, den *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP), gesteuert wird. Verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, MMP-2 und MMP-9) konnten sowohl im endometrialen Stroma zum Zeitpunkt der Trophoblast-Invasion, als auch in dem in das Stroma vordringenden Zytotrophoblasten, nachgewiesen werden (Übersichtsartikel Murray *et al.*, 1999).

Auch Zytokine und Wachstumsfaktoren sind an der endometrialen Rezeptivität beteiligt, indem sie die Proliferation, Differenzierung und Invasion des Endometriums beeinflussen. Eines dieser Zytokine ist der *leukemia inhibitory factor* (LIF). Im menschlichen Endometrium wird LIF in der Sekretionsphase verstärkt exprimiert und auch im Endometrium der Maus konnte eine maximale LIF-Expression zum Zeitpunkt der Implantation beobachtet werden (Bhatt *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1996; Cullinan *et al.*, 1996). Der Beweis für die Bedeutung von LIF bei der embryonalen Implantation konnte durch funktionelle Inaktivierung des LIF-Gens in der Maus erbracht werden. LIF^{-/-}-Weibchen zeigen ein normales Ovulations- und Fertilisationsverhalten. Es findet jedoch keine Implantation der normal entwickelten Blastozysten statt (Stewart *et al.*, 1992). Dieser Effekt ist endometrial bedingt, da beim Transfer von LIF^{-/-}-Embryos in Wildtyp-Ammenmäuse eine normale Implantationsrate beobachtet werden konnte.

Ein weiteres Zytokin, dem eine Bedeutung bei der embryonalen Implantation zugesprochen wird ist das Interleukin-1 (IL-1). Erste Hinweise dafür ergaben sich durch den Nachweis von IL-1 α und IL-1 β in Kulturmedien menschlicher Embryonen im Rahmen der IVF, wobei höhere Konzentrationen von IL-1 im Kulturmedium mit einer höheren Schwangerschaftsrate nach Transfer der Embryonen korrelierten (Sheth *et al.*, 1991).

Später konnten alle wichtigen Komponenten der IL-1 Familie (IL-1 β , IL-1R tl und IL-1ra) im Endometrium sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass der IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1R tl) zyklusspezifisch, mit einer maximalen Expression in der Sekretionsphase, exprimiert wird (Simón *et al.*, 1993). Auch im Präimplantationsembryo, besonders im Stadium des Blastozysten, konnte das IL-1 System nachgewiesen werden (Krüssel *et al.*, 1997). Die wichtigste direkte Evidenz bezüglich des Einflusses von IL-1 auf die embryonale Implantation war jedoch, dass bei Mäusen durch intraperitoneale Gabe des IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1 ra) die Implantation verhindert werden konnte (Simón *et al.*, 1994).

Auch die Familie des *epidermal growth factor* (EGF) scheint für die endometrielle Rezeptivität von Bedeutung zu sein. EGF stimuliert als Wachstumsfaktor und potentes Zell-Mitogen die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen. Mitglieder der EGF - Familie, wie EGF, TGF- α (*transforming growth factor*), HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*) und der EGF-Rezeptor werden im menschlichen Endometrium zyklusspezifisch exprimiert. Es konnte beobachtet werden, dass TGF- α , EGF und HB-EGF die Apposition und das Auswachsen der Blastozyste *in vitro* fördern (Haimovici *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1994). Zudem konnte bei der Maus der EGF-Rezeptor im Trophoblastanteil der Blastozyste nachgewiesen werden und es wird vermutet, dass endometriales HB-EGF über den EGF-Rezeptor der Blastozyste die Invasion des Trophoblasten in das Endometrium stimuliert (Das *et al.*, 1994).

Die wichtigsten Faktoren, denen eine Funktion bei der endometrialen Rezeptivität und der embryonalen Implantation zugesprochen wird, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Faktor	Beispiele	Erwartete Funktionen
Hormone	17 β -Östradiol; Progesteron	regulieren die Proliferation und Differenzierung der endometrialen Stroma- und Epithelzellen
Adhäsionsmoleküle	Integrine, MMP's und ihre Inhibitoren TIMP's	erleichtern die Apposition und Invasion des Trophoblasten
Zytokine/ Wachstumsfaktoren	LIF; HB-EGF, Interleukin	fördern den embryo-maternalen Dialog
Angiogenetische Wachstumsfaktoren	VEGF, Angiopoietine	beeinflussen den Aufbau und die Permeabilität der endometrialen Blutgefäße

Tabelle 1: Faktoren, die mit der Rezeptivität des Endometriums und mit der embryonalen Implantation assoziiert werden und ihre erwarteten Funktionen.

1.4 Angiogenese im Endometrium und bei der embryonalen Implantation

Zum Abschluss der embryonalen Implantation muss der Embryo Anschluss an die maternalen Gefäße finden und die Plazenta ausbilden, damit seine Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gewährleistet ist und die Schwangerschaft aufrecht erhalten werden kann. Nach der Invasion des endometrialen Stromas ist die weitere Embryonalentwicklung somit durch eine drastische Zunahme der Blutgefäße, die den Embryo umgeben, charakterisiert. Die Bildung dieser Blutgefäße umfasst sowohl den Prozess der Vaskulogenese, der *in situ* Formation von Primordialgefäßen aus Hämangioblasten, als auch den Prozess der Angiogenese (Klagsbrun *et al.*, 1991; Folkman *et al.*, 1992; Risau *et al.*, 1995 und 1997).

Angiogenese ist das Wachstum von Kapillaren aus einem präexistierenden Endothel und ein grundlegender Prozess bei der Entwicklung neuer Blutgefäße. Es gibt zwei mögliche Mechanismen der Angiogenese: das Aussprossen und die Intussuszeption. Das Aussprossen erfolgt in mehreren Schritten und beinhaltet zunächst die Zerstörung der Basalmembran, dann die Proliferation und Migration der Endothelzellen und schließlich den Zusammenschluss der Endothelzellen zu einem neuen Kapillargefäß (Klagsbrun *et al.*, 1991). Beim intussuszeptiven Kapillarwachstum proliferieren die Endothelzellen innerhalb eines Gefäßes. Sie formen dort neue Strukturen wie z.B. eine Zwischenwand, durch die das Lumen des Gefäßes geteilt wird (Risau *et al.*, 1997).

Während Vaskulogenese ausschließlich während der Embryonalentwicklung stattfindet, kommt Angiogenese auch im adulten Organismus vor, hauptsächlich jedoch unter pathologischen Bedingungen, wie beim Wachstum von Tumoren oder bei der Wundheilung. Unter physiologischen Bedingungen tritt Angiogenese im adulten Organismus nur im weiblichen Reproduktionstrakt, d.h. im ovariellen Follikel, im Corpus Luteum und im Endometrium auf.

Die endometriale Angiogenese ist ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung des rezeptiven Endometriums. In jedem Menstruationszyklus wächst ausgehend von den Arterien und Venen der Zona basalis ein dichtes Netzwerk an Spiralarterien, Kapillaren und Venen, das die Zona funktionalis bis zum Oberflächenepithel durchzieht. Diese Gefäße unterstützen die Proliferation und den Aufbau des Gewebes während des Menstruationszyklus und stellen ein für die embryonale Implantation und für die Plazentation rezeptives Endometrium bereit. Unter diesen physiologischen Bedingungen sind die angiogenetischen Prozesse streng reguliert. Endometriale Angiogenese findet in regelmäßigen Abständen im Verlauf jedes Menstruationszyklus statt, um dann während

der Menstruation komplett inhibiert zu werden. Daher werden Störungen der endometrialen Angiogenese als Ursache für menstruelle Funktionsstörungen und Erkrankungen, wie der Endometriose oder der Menorrhagie vermutet (Gordon *et al.*, 1995). Auch spontaner Abort und Präeklampsie werden mit angiogenetischen Funktionsstörungen assoziiert (Selvaggi *et al.*, 1995), denn eine intensive Vaskularisierung des dezidualisierten Endometriums ist ausschlaggebend für die Nährstoffversorgung des Embryos und somit für den Erhalt der Schwangerschaft.

In einem „*chick embryo chorioallantoic membrane*“ (CAM)- Assay mit humanem Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen konnte das angiogenetische Potential des Gewebes erfasst werden. Dabei zeigte sich, dass menschliches Endometrium über den gesamten menstruellen Zyklus hinweg angiogenetisch aktiv ist. Es konnten jedoch zyklische Schwankungen beobachtet werden. Das angiogenetische Potential des Endometriums ist in der frühen Proliferationsphase, in der die endometrialen Spiralarterien und Kapillaren ausgehend von den Gefäßstümpfen der Zona Basalis wachsen, und in der frühen und späten Sekretionsphase, in der die Gefäße sich zunehmend weiten und verschlingen, besonders hoch. In der späten Proliferationsphase, in der bestehende Gefäße aufrecht erhalten und gefestigt werden müssen, ist das Endometrium dagegen angiogenetisch weniger aktiv (Maas *et al.*, 2001). Im Unterschied dazu konnte die Frage der Proliferationsaktivität des endometriellen Endothels nicht eindeutig geklärt werden. Während Ferenczy *et al.* (1979) eine erhöhte Proliferation der Endothelzellen in der frühen und mittleren Proliferationsphase sowie in der mittleren Sekretionsphase nachweisen konnten, konnten andere Autoren keine zyklischen Schwankungen beobachten (Rogers *et al.*, 1998).

Trotz der großen Bedeutung von Angiogenese im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation sind die genauen, molekularen Mechanismen dieser angiogenetischen Prozesse bislang noch nicht geklärt. Die endometrielle Angiogenese steht wie der gesamte Aufbau des Endometriums unter dem Einfluss von Östradiol und Progesteron, dennoch ist ein direkter Einfluss der Hormone auf die angiogenetischen Prozesse unwahrscheinlich. Vielmehr scheint, dass die Steroidhormone die endometrielle Angiogenese indirekt, durch Stimulation angiogenetischer Faktoren, regulieren.

Verschiedene Wachstumsfaktoren besitzen angiogenetische Aktivität *in vivo* und *in vitro*, wie z.B. der *epidermal growth factor* (EGF), die Familie der *fibroblast growth factors* (FGF), die *transforming growth factors* (TGF), *tumor necrosis factor* (TNF- α), sowie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und die Angiopoietine (Übersichtsartikel Rees und Bicknell, 1998; Smith, 1998).

Die Meisten dieser Faktoren besitzen jedoch ein breites Spektrum an Ziel-Zellen und zeigen lediglich eine unspezifische angiogenetische Aktivität. VEGF und die Angiopoietine dagegen sind ausschließlich an angiogenetischen Prozessen beteiligt und wirken spezifisch an Endothelzellen.

1.5 Das *Vascular endothelial growth factor*- (VEGF-) System

Vascular endothelial growth factor (VEGF) wurde erstmals 1989 als ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor mit starkem angiogenetischen Potential und hoher Spezifität für Endothelzellen charakterisiert (Ferrara und Henzel, 1989; Gospodarowicz *et al.*, 1989). Einige Jahre zuvor wurde bereits ein Protein beschrieben, welches die Extravasation von Eiweiß aus Tumor-assoziierten Blutgefäßen fördert, der *vascular permeability factor* (VPF) (Senger *et al.*, 1983). Es stellte sich heraus, dass dieser Permeabilität-induzierende Wachstumsfaktor (VPF) und der Endothelzell-spezifische Wachstumsfaktor VEGF vom selben Gen codiert werden. Einige Jahre später wurden weitere strukturell homologe Liganden der VEGF-Familie identifiziert, die in Anlehnung an VEGF (VEGF-A), VEGF-B, -C und -D genannt wurden (Joukov *et al.*, 1997). Jedoch scheint VEGF-A als angiogenetischer Wachstumsfaktor die bei weitem größte biologische Bedeutung zu haben. Im Folgenden wird daher lediglich dieser Ligand näher beschrieben und der Einfachheit halber mit VEGF bezeichnet. (Übersichts-Artikel: Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Neufeld *et al.*, 1999).

Das VEGF-Gen besteht aus 8 Exons, aus denen durch alternatives Spleissen verschiedene mRNA-Isoformen generiert werden können (Leung *et al.*, 1989; Tischer *et al.*, 1991). Diese codieren beim Menschen für Proteine mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆). Wie in Abbildung 5 dargestellt, enthalten alle 5 Isoformen die Exons 1-5 sowie das Exon 8. Sie unterscheiden sich lediglich durch einfügen verschiedener Kombinationen der Exons 6 und 7. VEGF₁₂₁ enthält kein zusätzliches Exon, VEGF₁₄₅ enthält zusätzlich das Exon 6, VEGF₁₆₅ das Exon 7, VEGF₁₈₉ die Exons 6 und 7 und VEGF₂₀₆ die Exons 6, 6' und 7 (Charnock-Jones *et al.*, 1993; Houck *et al.*, 1991; Neufeld *et al.*, 1996; Tischer *et al.*, 1991).

Bei der Maus ist die Organisation des VEGF-Gens ähnlich. Die VEGF-Proteine der Maus enthalten jedoch jeweils eine Aminosäure weniger als die Proteine des Menschen. Außerdem sind bei der Maus bislang nur 3 VEGF-Isoformen identifiziert worden, VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈ (Shima *et al.*, 1996).

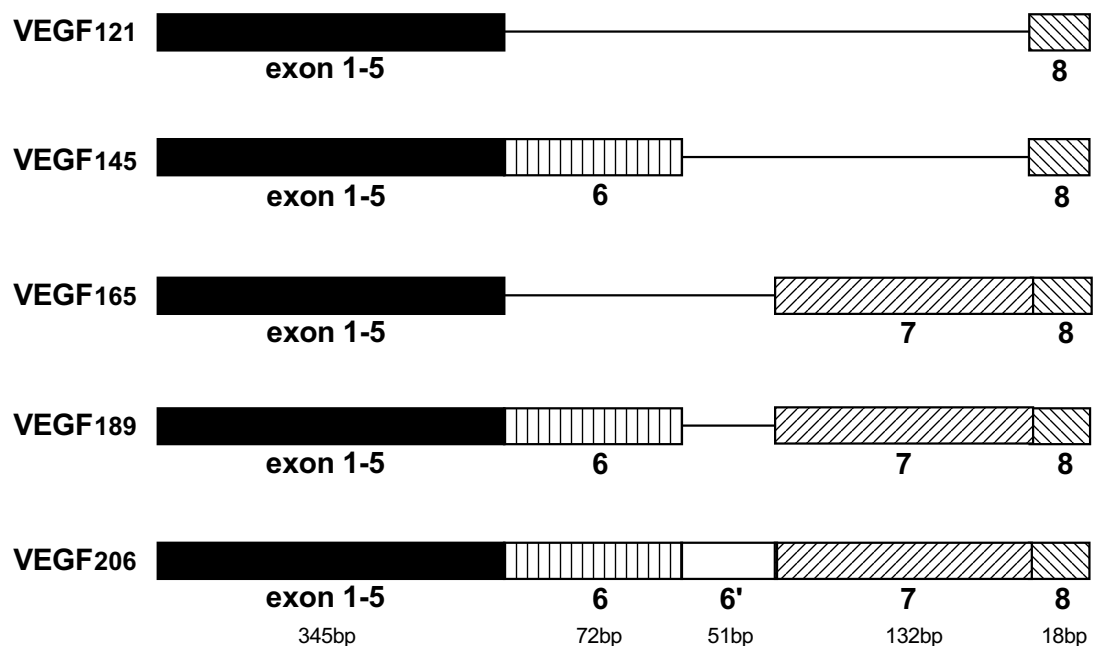


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der 5 Isoformen der VEGF-A Familie des Menschen. Alle Isoformen enthalten die Exons 1-5 sowie 8. Durch alternatives Spleissen kommt es zu verschiedenen Kombinationen der Exons 6, 6' und 7.

Ein wichtiges biologisches Merkmal, dass die VEGF- Isoformen voneinander unterscheidet, ist ihre Fähigkeit Heparin bzw. Heparan-Sulfat zu binden. Die Heparinbindungsdomänen sind auf den Exons 6 und 7 des VEGF-Gens lokalisiert. VEGF₁₂₁ (VEGF₁₂₀) fehlen diese Exons und dadurch auch die Heparinbindungsdomänen. Diese Isoform kann somit nicht an das Heparin der extrazellulären Matrix (ECM) binden und ist frei beweglich. VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ (VEGF₁₆₄) enthalten durch die Exons 6 bzw. 7 jeweils eine Heparinbindungsdomäne, die eine Bindung des Proteins an die ECM ermöglicht. VEGF₁₈₉ (VEGF₁₈₈) und VEGF₂₀₁ schließlich enthalten durch die Exons 6 und 7 beide Heparinbindungsdomänen. Diese Isoformen sind fest an Heparan-Sulfat-Proteoglykane der Zelloberfläche bzw. der ECM gebunden (siehe Abbildung 6). Sie scheinen dadurch *in vivo* weniger aktiv zu sein, als VEGF₁₂₁ (VEGF₁₂₀) oder VEGF₁₆₅ (VEGF₁₆₄). Jedoch können sie von Proteasen gespalten und als aktives, lösliches, proteolytisches Fragment freigesetzt werden (Park *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1995; Poltorak *et al.*, 1997).

Bereits im ersten Jahr nach der Charakterisierung von VEGF als angiogenetischer Wachstumsfaktor, erschienen durch Liganden-Bindungsanalysen Veröffentlichungen zu möglichen VEGF-Rezeptoren (Plouet und Moukadi, 1990; Vaisman *et al.*, 1990).

Im späteren Verlauf wurden beim Menschen auf molekulargenetischer Ebene zwei membranständige Rezeptor- Tyrosin-Kinasen (RTKs) identifiziert, welche VEGF mit hoher Affinität binden: der VEGFR-1 (*fms-like-tyrosine kinase*-Rezeptor, Flt-1) und der VEGFR-2 (*kinase insert domaine*-Rezeptor, KDR). Die Affinität von rekombinantem humanen VEGF₁₆₅ ist jedoch zu VEGFR-1 größer ($K_d = 10\text{-}20\text{ pM}$), als zu VEGFR-2 ($K_d = 75\text{-}125\text{ pM}$), wie Affinitätsanalysen gezeigt haben (Shibuya *et al.*, 1990; Terman *et al.*, 1991; de Vries *et al.*, 1992). Homolog zum menschlichen VEGFR-2 konnte bei der Maus ein Rezeptor identifiziert werden, der in seiner Sequenz zu 85% mit dem menschlichen VEGFR-2 übereinstimmt (*fetal liver kinase*-Rezeptor, Flk-1) (Matthews *et al.*, 1991). Sowohl der VEGFR-1, als auch der VEGFR-2 besitzen sieben extrazelluläre Immunglobulin (Ig)- ähnliche Domänen, eine transmembranäre Region und im zytoplasmatischen Teil eine Tyrosin-Kinase-Sequenz, welche durch eine Kinase-insert-Domäne unterbrochen wird (Abb. 6). Die Aminosäuresequenzen von VEGFR-1 und VEGFR-2 weisen eine 33%ige Übereinstimmung auf (Terman und Dougher-Vermazen, 1996).

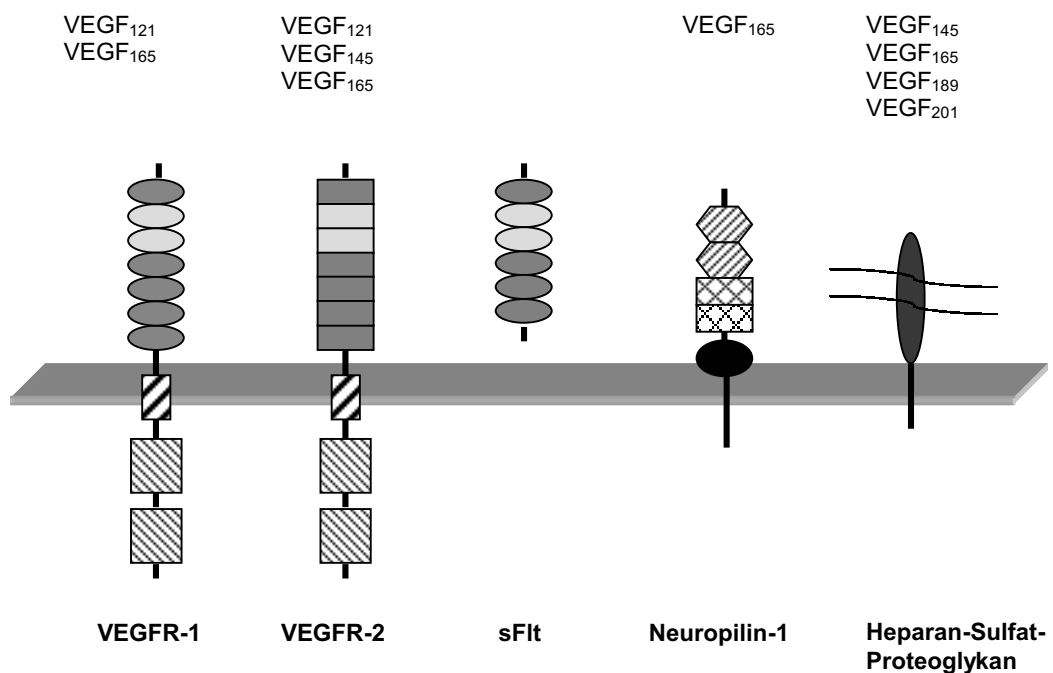


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur der VEGF-Rezeptoren sowie deren Interaktion mit den VEGF-Isoformen Dargestellt sind: Ig-ähnliche Domäne (○), Ig-ähnliche Domäne mit VEGF-Bindungsstelle (◐), transmembranäre Region (▨) und Tyrosin-Kinase-Sequenz (▩).

Die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 finden sich hauptsächlich in Endothelzellen, jedoch konnten sie zusätzlich in einigen anderen Zelltypen nachgewiesen werden. So exprimieren den VEGFR-1 unter Anderem auch Trophoblastzellen, Monozyten oder Mesangiumzellen der Niere (Charnock-Jones *et al.*, 1994; Barleon *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1995) und den VEGFR-2 hämatopoetische Stammzellen, Megakaryozyten, sowie Progenitorzellen der Retina (Kato *et al.*, 1995; Yang und Cepko, 1996). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass VEGFR-1 und VEGFR-2 unterschiedliche Merkmale in ihrer Signaltransduktion aufweisen und es scheint, dass die Signale des VEGF in Endothelzellen hauptsächlich vom VEGFR-2 vermittelt werden. So führte in VEGFR-1 defizienten Zellen die Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF zu einer mitogenen Antwort, wohingegen die Aktivierung von VEGFR-1 durch VEGF in Zellen, denen der VEGFR-2 fehlte, keine Proliferation der Zellen auslöste (Seetharam *et al.*, 1995). Des weiteren zeigten Endothelzellen, denen beide endogenen VEGF- Rezeptoren fehlten, Chemotaxis und Mitogenizität in Antwort auf VEGF, wenn sie mit einem Plasmid, das den VEGFR-2 codierte transfiziert wurden, nicht jedoch bei einem Plasmid, das den VEGFR-1 codierte (Waltenberger *et al.*, 1994). Außerdem unterläuft der VEGFR-2 eine strenge, Liganden abhängige Tyrosin-Phosphorylierung, während VEGFR-1 nur ein sehr schwaches Signal zeigt, das zu keinem mitogenen Signal führt. Dies führte zu der Vermutung, dass der VEGFR-1 in erster Linie eine regulatorische Funktion hat, indem er durch Bindung von VEGF dessen Verfügbarkeit für den Signal übertragenden VEGFR-2 moduliert (Park *et al.*, 1994; Hiratsuka *et al.*, 1998).

Durch alternatives Spleissen der VEGFR-1 (Flt-1) mRNA kommt es zur Bildung einer gekürzten Form dieses Rezeptors, dem sogenannten soluble Flt-1 (sflt) (Kendall *et al.*, 1993 und 1996). Diesem löslichen Rezeptor fehlen die siebte Immunglobulin-ähnliche Domäne, die transmembranäre Domäne und die intrazelluläre Komponente des VEGFR-1 (Abb. 6). sFlt bindet mit hoher Affinität ($K_d = 10\text{--}20\text{ pM}$) an VEGF, wodurch die Bindung an die transmembranären Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 kompetitiv antagonisiert wird. Der lösliche Rezeptor sflt wurde unter anderem in Endothelzellkulturen menschlicher Nabelschnurvenen nachgewiesen, wo auch eine Inhibition der durch VEGF normalerweise induzierten Mitogenese beobachtet wurde (Kendall *et al.*, 1993). Somit agiert sflt als physiologischer Antagonist von VEGF (He *et al.*, 1999).

Erst kürzlich wurde ein weiterer VEGF-Rezeptor entdeckt, der spezifisch die Isoform VEGF₁₆₅ (VEGF₁₆₄) bindet und der als Neuropilin-1 (NP-1) identifiziert wurde (Soker *et al.*, 1996). Ursprünglich wurden die Neuropiline als transmembranäre Glykoproteine entdeckt, die auf Axonen exprimiert werden und die Rezeptoren der

Collapsin/Semaphorin-Familie, einer Gruppe von an der Entwicklung des Nervensystems beteiligten Proteinen, sind (Kolodkin *et al.*, 1997; Fujisawa und Kitsukawa, 1998). Die Neuropiline haben nur eine sehr kurze intrazelluläre Domäne und sind daher nicht in der Lage, als selbständige Rezeptoren zu fungieren (Abb. 6). So führte VEGF₁₆₅ in Zellen, die außer NP-1 keine VEGF-Rezeptoren exprimierten, zu keiner Signaltransduktion. Dagegen konnte beobachtet werden, dass NP-1 bei einer Ko-Expression mit VEGFR-2 die Bindung von VEGF₁₆₅ an den VEGFR-2 und die von VEGF₁₆₅ vermittelte Chemotaxis verstärkt. Wird die Bindung von VEGF₁₆₅ an NP-1 inhibiert, so ist auch die Bindung an VEGFR-2 verhindert und damit verbunden der mitogene Effekt des VEGFR-2 (Soker *et al.*, 1998). NP-1 wird als VEGF₁₆₅ spezifischer Rezeptor in Endothelzellen, sowie in Tumorzellen exprimiert (Soker *et al.*, 1996 und 1998). Die Bindungsaffinität von VEGF₁₆₅ (VEGF₁₆₄) an NP-1 ist vergleichbar mit der Affinität für die anderen VEGF-Rezeptoren ($K_d 2 \times 10^{-10} \text{M}$) (He *et al.*, 1997).

Daten, die durch die Züchtung von *knock-out*-Mäusen mit gezielter Inaktivierung spezifischer Komponenten des VEGF-Systems generiert wurden, deuten auf eine essentielle Rolle dieses Systems in der Embryonalentwicklung hin. Bei VEGF^{+/-}, VEGFR-1^{-/-} und VEGFR-2^{-/-} *knock-out*-Mäusen kommt es nicht zur Geburt lebensfähiger Nachkommen. Embryonen mit funktioneller Inaktivierung nur eines VEGF-Allels (VEGF^{+/-}) zeigen verschiedene Fehlbildungen im kardiovaskulären System, wie z.B. eine nur spärlich entwickelte dorsale Aorta, was in embryonaler Letalität am 11. bis 12. Schwangerschaftstag (E11-12) resultiert. Diese heterozygoten Embryonen exprimieren jedoch weiterhin VEGF-mRNA, was auf eine starke Dosis- abhängige vaskuläre Aktivität von VEGF deutet (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Die funktionelle Inaktivierung des VEGFR-2 führt zu Störungen zu Beginn der vaskulogenetischen und angiogenetischen Prozessen und zur embryonalen Letalität an E8.5. VEGFR-2^{-/-}-Mäuse produzieren keine reifen hämatopoetischen Zellen und keine funktionsfähigen Endothelzellen. Da VEGFR-2 unter anderem auf der Oberfläche von Hämangioblasten nachgewiesen werden konnte, wurde aus den *knock-out* Experimenten geschlossen, dass dieser Rezeptor im Prozess der Differenzierung von Hämangioblasten in hämatopoetische Zellen und in Endothelzellen eine wichtige Rolle spielt. Der *knock-out* des VEGFR-1 hat ebenfalls einen embryonal letalen Phänotyp zur Folge (E 8.5), jedoch sind im Unterschied zum *knock-out* des VEGFR-2 spätere Stadien der embryonalen Angiogenese beeinträchtigt. VEGFR-1^{-/-}-Mäuse sind in der Lage Endothelzellen zu bilden, doch schließen sich diese nicht zu funktionsfähigen Kapillaren zusammen (Fong *et al.*, 1995 und 1999; Shalaby *et al.*, 1995 und 1997).

Im Unterschied dazu sind *knock-out*-Mäuse, denen lediglich die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne des VEGFR-1 fehlt (VEGFR-1^{TK-/-}), lebensfähig und weisen normal entwickelte Gefäße auf (Hiratsuka *et al.*, 1998). Nicht zuletzt aus diesen Beobachtungen wird eine regulatorische Funktion des VEGFR-1 vermutet.

Auch die funktionelle Inaktivierung des VEGF₁₆₅ spezifischen Rezeptors NP-1 führt zu Fehlbildungen im kardiovaskulären System und zu einem embryonal letalen Phänotyp (E12.5-E13.5). NP-1^{-/-}-Mäuse weisen Störungen in der Entwicklung großer Gefäße und in der neuronalen Vaskularisierung auf. Durch diese Beobachtungen wurde auf die Funktion von NP-1 bei der Entwicklung der Blutgefäße geschlossen (Kitsukawa *et al.*, 1997).

Die mRNA und die Proteine von VEGF und den VEGF-Rezeptoren konnten in fast allen Anteilen des weiblichen Reproduktionssystems nachgewiesen werden. So in Corpora lutea und in ovariellen Follikeln bei der Ratte, sowie in endometriellen Gefäßen, embryonalen Implantationsstellen, Trophoblastzellen und Dottersackgewebe bei der Ratte und der Maus (Breier *et al.*, 1992; Shweiki *et al.*, 1993; Jakeman *et al.*, 1993; Chakraborty *et al.*, 1995). Auch in der Plazenta, im Eileiter und Ovar sowie im Endometrium des Menschen konnte das VEGF-System detektiert werden (Sharkey *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1996 und 1998; Gordon *et al.*, 1996; Krüssel *et al.*, 1999). Im menschlichen Endometrium wird VEGF in allen Phasen des Menstruationszyklus exprimiert, jedoch können zyklische Schwankungen mit einer maximalen Expression in der Sekretionsphase, d.h. zum Zeitpunkt der embryonalen Implantation, beobachtet werden. Im Endometrium der Proliferationsphase wird VEGF sowohl im Drüsenepithel, als auch in den Stromazellen exprimiert, wohingegen sich VEGF im Endometrium der Sekretionsphase fast ausschließlich im luminalen Drüsenepithel findet (Charnock-Jones *et al.*, 1993; Shifren *et al.*, 1996; Torry *et al.*, 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass VEGF an der apikalen Seite des Epithels exprimiert wird und dass das Protein in das Lumen sezerniert wird (Hornung *et al.*, 1998). Die VEGF-Rezeptoren und der Antagonist sFlt konnten im menschlichen Endometrium ebenfalls nachgewiesen werden. Während die transmembranären Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 im Verlauf des Menstruationszyklus auf nahezu konstantem Level exprimiert werden, ist die Expression des Antagonisten sFlt dagegen in der Sekretionsphase, d.h. zum Zeitpunkt der Einnistung des Embryos, stark verringert (Krüssel *et al.*, 1999). Im Unterschied zu den VEGF-Rezeptoren 1 und 2 ist der Isoform-spezifische Rezeptor Neuropilin-1 bislang nur im Uterus von Maus und Ratte nachgewiesen worden (Halder *et al.*, 2000; Pavelock *et al.*, 2001).

1.6 Die Angiopoietine

Einige Jahre nach der Entdeckung von VEGF als angiogenetischem Wachstumsfaktor mit hoher Spezifität für Endothelzellen wurden die Angiopoietine als eine weitere Gruppe solcher Wachstumsfaktoren identifiziert. Durch Genexpressionsanalysen konnten zunächst zwei Angiopoietine isoliert werden, das Angiopoietin-1 (Ang-1) und das Angiopoietin-2 (Ang-2) (Davis *et al.*, 1996; Maisonpierre *et al.*, 1997). Mittlerweile sind noch zwei weitere Liganden der Angiopoietin-Familie bekannt, das Angiopoietin-3 (Ang-3) in der Maus und das Angiopoietin-4 (Ang-4) im Menschen. Ang-3 und Ang-4 sind strukturell sehr verschieden, obwohl sich ihre Gene, wie durch Lokalisations-Studien festgestellt werden konnte, bei Mensch und Maus auf dem gleichen Chromosomen-Abschnitt befinden. Außerdem werden Ang-3 und Ang-4 in verschiedenen Geweben des jeweiligen Organismus exprimiert und es scheint, dass Ang-3 als Antagonist fungiert, wohingegen Ang-4 als Agonist wirkt (Valenzuela *et al.*, 1999).

Im Unterschied dazu gleichen sich die Sequenzen der Angiopoietine 1 und 2 von Mensch und Maus. Ang-1 und Ang-2 sind etwa 75kD große sezernierte Proteine, deren Aminosäuresequenzen eine Übereinstimmung von 60% aufweisen. Aufgrund ihrer Struktur können die beiden Angiopoietine in drei Domänen unterteilt werden. Eine N-terminale Region, ein Segment mit einer stark gewundenen α -Helix-Spirale und eine Fibrinogen-ähnliche Domäne. Die Fibrinogen-ähnliche Domäne ist die am stärksten konservierte Region der Angiopoietine und es besteht die Vermutung, dass dort die Rezeptor-Bindungsstellen lokalisiert sind (Davis *et al.* 1996).

Die Angiopoietine sind als Liganden des Tie-2, einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase, entdeckt worden. Wie auch die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren des VEGF findet sich Tie-2 hauptsächlich auf Endothelzellen, woraus die hohe Spezifität der Angiopoietine für diese Zellen resultiert. Der transmembranäre Rezeptor enthält im extrazellulären Bereich jeweils zwei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen, die durch drei EGF (*epidermal growth factor*)-ähnliche Domänen voneinander getrennt sind, gefolgt von drei Fibronectin III (FN3III)-ähnlichen Bereichen. Intrazellulär befindet sich eine Tyrosin-Kinase-Domäne, die durch ein Kinase-Insert unterbrochen wird (Abb. 7).

Eine weitere, dem Tie-2 strukturell sehr ähnliche Endothelzell-spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinase, ist das Tie-1 (Abb. 7). Jedoch ist bislang noch nichts über die Liganden und die Signaltransduktion von Tie-1 bekannt. Dennoch spielt Tie-1 bei der Embryonalentwicklung der Blutgefäße eine Rolle, wie durch *knock-out* Experimente in der Maus festgestellt werden konnte. Tie-1^{-/-}-Embryonen sterben über einen weiten Zeitraum

verteilt, von E 14.5 bis spätestens kurz nach der Geburt, anhand von Ödemen und lokalen Hämorrhagien. Daraus wurde geschlossen, dass Tie-1 die strukturelle Integrität des Endothels beeinflusst und so den Flüssigkeitsaustausch über die Kapillaren und die hämodynamische Stressresistenz reguliert (Sato *et al.*, 1995; Puri *et al.*, 1995).

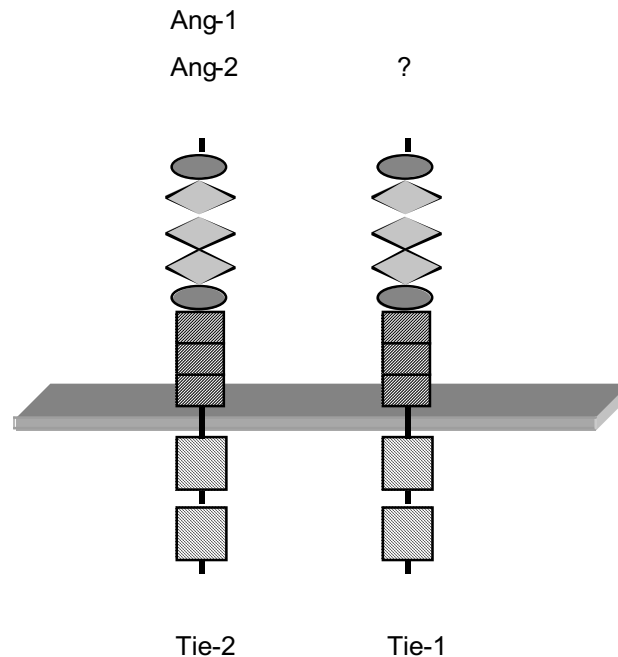


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur von Tie-1 und Tie-2. dargestellt sind: Ig-ähnliche Domäne (●), EGF-ähnliche Domäne (◊), FN3III-ähnliche Domäne (▨) und Tyrosin-Kinase-Domäne (▩).

Wie durch *knock-out* Experimente in der Maus festgestellt wurde, unterscheidet sich die Funktion der Angiopoietine von der des VEGF-Systems. Während VEGF und die Rezeptoren die Bildung von Endothelzellen aus hämatopoetischen Vorläufern, die Migration und Proliferation, sowie den Zusammenschluss der Endothelzellen zu Kapillaren induzieren, wirken die Angiopoietine und ihr Rezeptor Tie-2 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Angiogenese, bei der Umstrukturierung und Stabilisierung der Gefäße. Die Signaltransduktion und die Wirkung von VEGF und den Angiopoietinen ist in Abbildung 8 schematisch aufgeführt.

So führte die funktionelle Inaktivierung von Tie-2 ebenso wie der *knock-out* der VEGF-Rezeptoren zu einer fehlerhaften Gefäßstruktur während der Embryogenese und zur embryonalen Letalität. Jedoch sterben Tie-2^{-/-}-Embryonen zu einem späteren Zeitpunkt als VEGFR-2^{-/-}-Embryonen. Zudem entwickeln diese im Unterschied zu Embryonen, die durch den *knock-out* von VEGFR-2 generiert wurden, eine nahezu normale Anzahl an

Endothelzellen und ein einfaches Kapillarnetzwerk. Allerdings ist die Umstrukturierung und die Stabilisierung dieser primitiven Gefäße gestört, was zu einer vereinfachten und wenig komplexen Vaskularisierung, mit homogenen Gefäßen und wenig Verzweigungen führt. Auch extraembryonal, z.B. im Dottersack sind die angiogenetischen Prozesse gestört und Defekte in der Vaskularisierung zu beobachten (Dumont *et al.*, 1994).

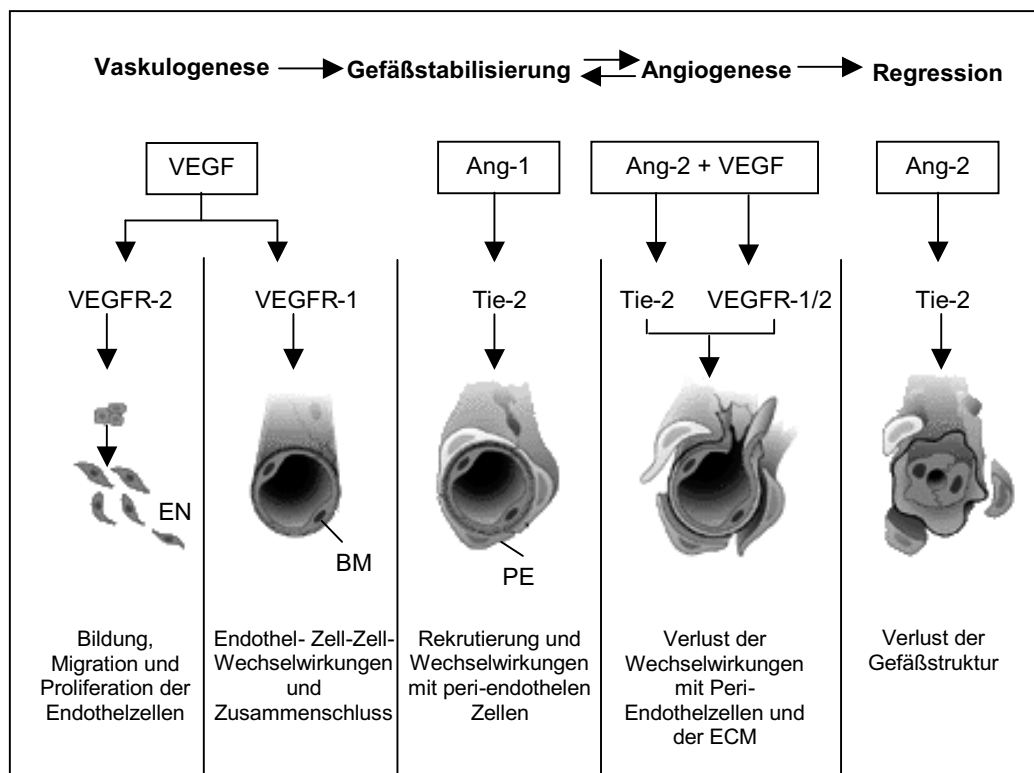


Abbildung 8: Signaltransduktion von VEGF und den Angiopoietinen. Modifiziert nach Hanahan, 1997. EN: Endothelzellen, BM: Basalmembran, PE: Peri-Endothelzellen.

Der *knock-out* des Liganden Ang-1 hat den gleichen Phänotyp zur Folge wie der *knock-out* von Tie-2. Auch Ang-1^{-/-} Embryonen entwickeln zunächst ein primitives Kapillarnetzwerk, welches sich im Laufe der Embryonalentwicklung dann jedoch nicht weiter stabilisiert und umstrukturiert. Der *knock-out* von Ang-1 scheint jedoch weniger gravierend zu sein, als die funktionelle Inaktivierung von Tie-2, was zur embryonalen Letalität der Ang-1^{-/-} Embryonen erst an E 12.5 führt (Suri *et al.*, 1996). Durch elektronenmikroskopische Strukturanalysen konnte schließlich festgestellt werden, dass die Endothelzellen in Ang-1^{-/-} oder Tie-2^{-/-} Embryonen sich nicht angemessen mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) und mit periendothelen Zellen, wie z.B. Stroma- und Epithelzellen, verbinden (Suri *et al.*, 1996). Unter normalen Umständen ummanteln diese Zellen die Blutgefäße und stabilisieren diese so.

Daraus wurde geschlossen, dass das Ang-1/Tie-2-Signal die Fähigkeit der Endothelzellen, periendotheliale Zellen zu rekrutieren und so die Struktur der Gefäße zu stabilisieren und deren Funktion zu modulieren, kontrolliert.

Im Gegensatz zu dem Ang-1 *knock-out* führt die Überexpression von Ang-1 zu einer Hypervaskularisierung des Gewebes, mit einer erhöhten Anzahl an Gefäßen, die stark vergrößert und verzweigt sind (Suri *et al.*, 1998). Die Überexpression von Ang-2 im Endothel von Mausembryonen führt dagegen zu fehlerhaft entwickelten Blutgefäßen und zu einem Phänotyp, der dem des *knock-out* von Ang-1 bzw. Tie-2 entspricht (Maisonpierre *et al.*, 1997). Die Mäuse sind embryonal letal und sterben an E 9.5 bis E 10.5 aufgrund von unreifen Gefäßen. Durch diese Beobachtungen wurde geschlossen, dass Ang-2 *in vivo* als natürlicher Antagonist des Ang-1 wirkt. Auch *in vitro* konnte die antagonistische Funktion von Ang-2 beobachtet werden. In Endothelzellkulturen aktiviert Ang-1 den Rezeptor Tie-2, indem es seine Autophosphorylierung auslöst. Ang-2, welches mit ähnlicher Affinität an Tie-2 bindet, regt die Phosphorylierung des Rezeptors hingegen nicht an. Im Gegenteil, Ang-2 kann die Ang-1 induzierte Kinase-Aktivität des Rezeptors komplett unterbinden (Maisonpierre *et al.*, 1997).

Das Expressionsmuster der Angiopoietine unterscheidet sich ebenso wie ihre Signaltransduktion. Ang-1 wird im embryonalen und im adulten Organismus in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, so z.B. im Gehirn, in der Skelettmuskulatur und im weiblichen Reproduktionstrakt. Ang-2 wird im Embryo ebenfalls in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert. Im adulten Organismus ist die Ang-2 Expression jedoch sehr spezifisch und beschränkt sich auf Gewebe, in denen aktiv Angiogenese stattfindet, d.h. auf das Ovar, das Endometrium und die Plazenta (Maisonpierre *et al.*, 1997). Die Funktion von Ang-2 bei angiogenetischen Prozessen im adulten Organismus wurde durch in-situ Hybridisierung des Wachstumsfaktors im Ovar erkannt. Ang-2 wurde dort entweder an Stellen der Gefäßregression, z.B. in degenerierten Follikeln, oder an Stellen der aktiven Gefäßbildung, z.B. im Corpus Luteum, jedoch nur bei Anwesenheit von VEGF, exprimiert (Maisonpierre *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass Ang-2 im adulten Organismus durch blockieren des Ang-1/Tie-2-Signals die Stabilisierung der Gefäßstruktur unterbindet und dass so in Gegenwart von VEGF die Endothelzellen aktiviert werden und neue Kapillaren bilden können.

1.7 Wissenschaftliche Fragestellungen

Angiogenese ist ein grundlegender Prozess bei der Entwicklung des rezeptiven Endometriums und bei der embryonalen Implantation. Dennoch sind die molekularen Mechanismen dieser angiogenetischen Prozesse und die dabei stattfindenden Embryo-maternalen Wechselwirkungen bis heute noch weitestgehend unverstanden.

Vieles spricht jedoch für eine Beteiligung des *vascular endothelial growth factor*- (VEGF) Systems. Die Transkription des VEGF-Systems ist in nahezu allen zum Reproduktionstrakt gehörenden Geweben nachgewiesen worden, so auch im Endometrium. Vor Beginn dieser Arbeit gab es jedoch nur sehr wenige Daten bezüglich der embryonalen Expression von VEGF und seinen Rezeptoren.

Erst kürzlich wurde eine weitere Gruppe von Wachstumsfaktoren mit hohem angiogenetischem Potential und einer Spezifität für Endothelzellen entdeckt, die Angiopoietine. Die Angiopoietine und ihr Rezeptor sind bisher hauptsächlich in Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen unter pathologischen Bedingungen und bei der Embryonalentwicklung untersucht worden. Es gibt jedoch nur sehr wenige Untersuchungen über die Expression der Angiopoietine im weiblichen Reproduktionssystem und bislang noch keine Daten über die Angiopoietin-Expression des Präimplantationsembryos.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expression der angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF und Angiopoietin im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation. Da es bislang noch kein geeignetes *in vitro* Modell des Systems Embryo-Endometrium gibt, wurden die beiden Anteile des Reproduktionssystems hauptsächlich getrennt voneinander betrachtet. Hierzu wurden sowohl *in vitro* Untersuchungen an frischen Endometriumbiopsien, als auch *in vitro* Untersuchungen an endometriellen Zellkulturen durchgeführt. Weiterhin wurde eine spezielle Methode zum Nachweis von mRNA's in einzelnen Präimplantationsembryonen angewandt. Da die "verbrauchende" Forschung an menschlichen Präimplantationsembryonen nach dem ESchG in Deutschland verboten ist, wurden alle Untersuchungen an Präimplantationsembryonen der Maus durchgeführt. Um das System Embryo-Endometrium zu simulieren, wurden endometriale Zellen mit Embryo-spezifischen Faktoren inkubiert und eine mögliche Beeinflussung der endometriellen Genexpression untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

- Nachweis der mRNA-Expression von VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, sFlt und NP-1 in einzelnen Präimplantationsembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mittels einer speziellen RT/*nested* PCR.
- Immunhistochemische Lokalisierung der VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 Proteine im Präimplantationsembryo.
- Untersuchung des Expressionsmusters der VEGF-Isoformen durch RT/*nested* PCR mit einem Isoform-spezifischen Primer in Präimplantationsembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung.
- Semiquantitative Bestimmung der mRNA-Expression des VEGF₁₆₄ spezifischen Rezeptors NP-1 mittels einer modifizierten kompetitiven PCR in menschlichem Endometrium im Verlauf des Menstruationszyklus.
- mRNA-Nachweis und Untersuchung der zyklischen Regulation der Angiopoietine und ihres Rezeptors in menschlichem Endometrium durch kompetitive PCR.
- Lokalisierung der Ang-1, Ang-2 und Tie-2 Proteine in menschlichem Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen durch Immunhistochemische Färbung.
- Inkubation endometrialer Zellen mit dem embryonalen Faktor *human chorionic gonadotropin* (HCG) und Untersuchung des Einflusses von HCG auf die endometriale mRNA-Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors.
- Zellkulturexperimente mit dem Zytokin IL-1 β und Untersuchung des Einflusses von IL-1 β auf die endometriale mRNA-Expression des VEGF-Systems.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Maus Zygoten und Präimplantationsembryonen

2.1.1 Versuchstiere

Die Haltung und Zucht der Mäuse des Stammes B6C3F1 erfolgte in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dort wurden die Tiere bei 22-24 °C in einem 12-stündigen Hell-/Dunkelzyklus gehalten. Die Ernährung erfolgte durch Trockenfutter und Wasser nach Verlangen.

Weibliche Mäuse wurden durch einmalige, intraperitoneale Gabe von 10 IU PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*, Sigma) superovuliert. Die Ovulationsinduktion erfolgte durch einmalige intraperitoneale Injektion von 10 IU HCG (Humanes Chorion-Gonadotropin, Sigma) 48 Stunden nach PMSG-Injektion. Die Weibchen wurden mit erwiesenermaßen fertilen männlichen Mäusen desselben Stammes über Nacht verpaart, hierzu wurden jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen über Nacht in einem Käfig gehalten. Die erfolgreiche Paarung wurde am darauf folgenden Morgen durch das Vorhandensein des vaginalen Pfropfs verifiziert. 12 Uhr mittags am Tag des Auftretens des Vaginalpfropfs wurde als Tag 0.5 der Embryonalentwicklung (=E 0.5) definiert.

2.1.2 Gewinnung der Zygoten und Präimplantationsembryonen

Zur Gewinnung der Zygoten wurden die verpaarten weiblichen Mäuse an E 0.5 durch zervikale Dislokation getötet. Die Eileiter wurden operativ entfernt und in Sperm Preparation-Medium (Medicult, Jyllinge, Dänemark) gesammelt. Durch durchspülen des Eileiters mit demselben Medium wurden die Cumulus-Zygoten Komplexe erhalten und in einem 20µl Tropfen Universal IVF-Medium (Medicult, Jyllinge, Dänemark) unter Zusatz von 40IU/ml Hyaluronidase (Pharma, Dessau) aufgenommen. Der Cumulusanteil wurde nach kurzer Inkubation in dem Medium durch mehrmalige Aspiration mit einer Denudationspipette (Reproline Medical GmbH, Rheinbach) entfernt. Die Cumulus freien Zygoten wurden anschließend zweimal mit Universal IVF-Medium gewaschen, um eventuelle Hyaluronidasereste zu entfernen.

Zygoten für die RT/PCR wurden direkt im Anschluss daran in das RT-Reaktionsgemisch (siehe 2.6) gegeben. Zygoten für die Embryokultur wurden nach dem Waschen in eine 3,5 cm Falcon-Gewebekulturschale (Nr. 3001, Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey) überführt. Diese war zuvor wie folgt präpariert worden: sechs einzelne Tropfen

Universal IVF-Medium (je 20µl) wurden in die Kulturschale pipettiert und mit leichtem, weißen Mineralöl (Repromed® International Medical Products, Kleve) überschichtet. Die Kulturschalen, ebenso wie die gesamten Reagenzien, welche in Kontakt mit den Zygoten kamen, wurden über Nacht im Inkubator (Heraeus) in einer humidifizierten Atmosphäre von 5% CO₂ / 95% Raumluft bei 37°C äquilibriert. Die Kultur der Zygoten erfolgte unter denselben atmosphärischen Bedingungen.

Zur Gewinnung der Präimplantationsembryonen wurden die verpaarten Weibchen an E 2.0 (8-Zell-Stadium), E 2.5 (Morula-Stadium), E 3.0 (frühes Blastozystenstadium) und E 3.5 bis E 4.0 (*hatching* bzw. spätes Blastozystenstadium) durch cervikale Dislokation getötet (Abb. 9).

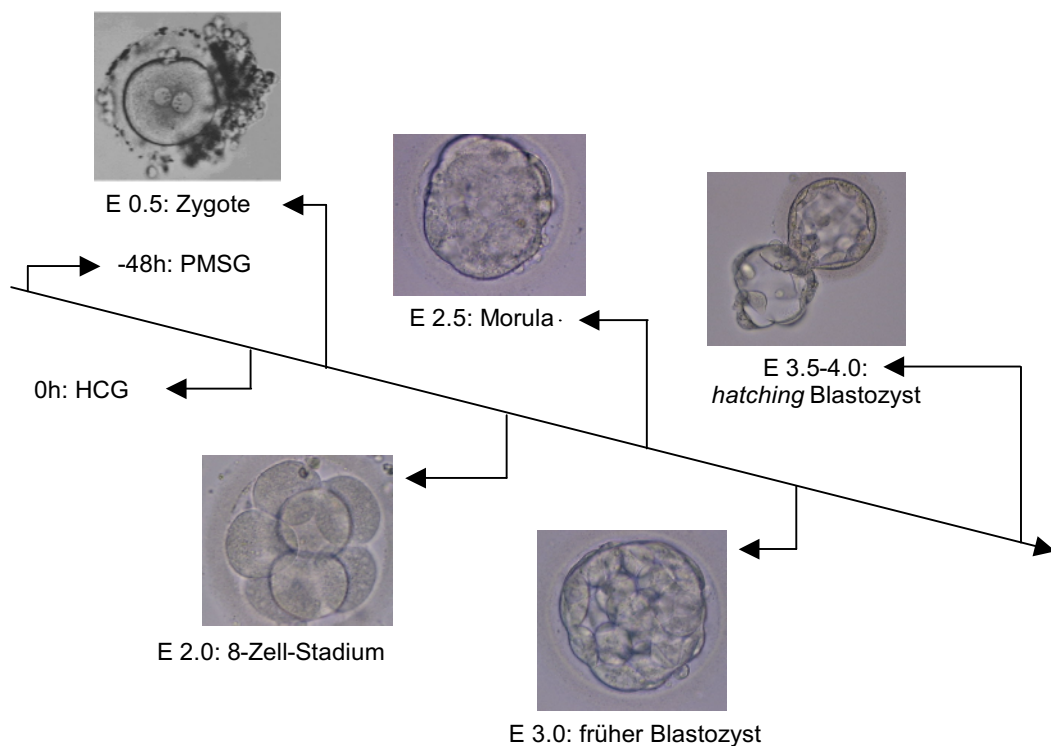


Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf der Gewinnung der Zygoten und Präimplantationsembryonen. Dargestellt sind menschliche Embryonen. Bilder aus dem IVF-Labor der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf.

Die Eileiter bzw. Uteri wurden operativ entfernt und in Sperm Preparation-Medium gesammelt. Die Embryonen im 8-Zell- und im Morula-Stadium wurden aus den Eileitern erhalten, die frühen und *hatching* Blastozysten aus den Uterushörnern. Hierzu wurden der Eileiter bzw. der Uterus mit Sperm Preparation Medium durchgespült und die Embryonen in einem 20µl Tropfen Universal IVF-Medium aufgenommen. Die Präimplantationsembryonen wurden zweimal in Universal IVF-Medium gewaschen und

bis zur Überführung in das RT-Reaktionsgemisch (siehe 2.6) kurze Zeit in einem mit leichtem, weißen Mineralöl überschichteten Tropfen desselben Mediums in einer 3,5cm Falcon-Gewebekulturschale verwahrt. Die Verwahrung der Präimplantationsembryonen ebenso wie die Äquilibration aller verwendeten Reagenzien erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einer humidifizierten Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Raumluft.

2.1.3 *In vitro* Kultur von Präimplantationsembryonen

Für einen ELISA-Test an Embryo-Kulturmedium wurden einige der, wie unter 2.1.1 beschrieben, gewonnenen Zygoten bis zum Stadium der *hatching* Blastozyste kultiviert. Dazu wurden die Zygoten zunächst bis zum Morula-Stadium in G1.2™ Medium (Vitrolife, Göteborg, Schweden) gehalten. Jeweils 10 Zygoten wurden in einen 30µl Tropfen des Mediums auf einer 3,5cm Falcon-Gewebekulturschale gesetzt und mit leichtem, weißen Mineralöl überschichtet. Die Kulturschalen mit den Zygoten wurden im Inkubator bei 37°C in einer humidifizierten Atmosphäre von 5% CO₂ / 95% Raumluft gelagert. Die Entwicklung der Embryonen wurde lichtmikroskopisch untersucht. Bei Erreichen des Morula-Stadiums an E2.5 wurden die Embryonen in G-2.2™ Medium (Vitrolife, Göteborg, Schweden) überführt. Jeweils 10 Morulae wurden in einem 30µl Tropfen Medium, der mit leichtem weißen Mineralöl überschichtet war, in einer 3,5cm Falcon-Gewebekulturschale im Inkubator kultiviert. Die Tropfen des G-1.1™ Mediums wurden aufgenommen und jeweils 2 Tropfen (60µl) in einem 0,5ml Reaktionsgefäß (PCR Softtubes, Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) bis zum ELISA-Test bei –20°C aufbewahrt. Am späten Nachmittag von E 3.5, bei Erreichen des *hatching* Blastozysten-Stadium, wurden die Embryonen aus dem G-2.2™ Medium entfernt und verworfen. Das G-2.2™ Medium wurde aufgenommen und ebenfalls jeweils 2 Tropfen (60µl) in einem 0,5ml Reaktionsgefäß bis zum ELISA Test bei –20°C gelagert. Insgesamt erreichten etwa 80% der kultivierten Zygoten das Stadium der *hatching* Blastozyste.

2.1.4 Poolen von Embryonen in Uteri

Um Proteine in den Präimplantationsembryonen nachweisen zu können, wurden diese gepoolt in Uteri transferiert. Die Uterushörner inklusive der Embryonen wurden dann in Paraffin eingebettet, geschnitten und eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Die Uteri wurden dafür folgendermaßen präpariert: die Enden des Uterushorns wurden mittels einer glühenden Pinzette kauterisiert. Dann wurde das Uterushorn mit einer

Spritze mit 0,9mm Kanüle angestochen und jeweils 30 Embryonen im Stadium des späten Blastozysten in etwas Universal IVF-Medium hinein transferiert. Anschließend wurden die Uteri operativ aus der Maus entfernt und in 4% Paraformaldehyd-Lösung überführt.

2.2 Biopsiematerial

Patientinnen, die sich aus Gründen nicht-maligner Erkrankungen einer Hysteroskopie unterzogen, wurden um ihre Teilnahme bei dieser Untersuchung gebeten. Alle Patientinnen, welche sich durch Überlassung einer Endometriumbiopsie an dieser Untersuchung beteiligten, wurden vorher schriftlich über die Untersuchung aufgeklärt und unterzeichneten eine 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, entweder durch Strichkurettag mit einer Novak-Kurette (Novak, Palo Alto, California) oder durch Saugkurettag mit einer Pipelle-Pipette (Gynemed, Lensahn) entnommen. Ein Teil des entnommenen Gewebes wurde direkt in 4% Paraformaldehyd fixiert. Der andere Teil wurde kurz in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, um die Kontamination mit Blut zu reduzieren und dann direkt für die RNA-Extraktion oder für die Primärzellkultur verwendet.

Die Phase des menstruellen Zyklus, in der sich die Patientin zum Zeitpunkt der Biopsie befand, wurde sowohl anhand der Anamnese, als auch mittels histologischer Begutachtung anhand der Kriterien von Noyes *et al.* (1950) festgelegt. Anhand dieser Kriterien wurden die Biopsien in 6 Gruppen aufgeteilt: frühe, mittlere und späte Proliferationsphase (FP, MP, SP) sowie frühe, mittlere und späte Sekretionsphase (FS, MS SS).

2.3 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank (Gelaire BSB3) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturschalen der Firma Falcon in einem begasten Brutschrank (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂. Die Kulturschalen zur Kultivierung der epithelialen Zellpopulation wurden vor Gebrauch mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden die Schalen wenigstens zwei Stunden lang mit 0,5% Gelatine in PBS im Brutschrank inkubiert. Die Gelatine/PBS-Lösung wurde dann kurz vor Verwendung der Kulturschale abgesaugt.

2.3.1 Zellkulturmedien

Die bei der Zellkultur verwendeten Medien und Medienzusätze wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma und Gibco BRL bezogen. Sie wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Collagenase-Medium:	DMEM (Dulbecco's modified eagle Medium mit 1000 mg/L Glucose und dem Indikatorfarbstoff Phenolrot), 1mg/ml Collagenase A (Boehringer Mannheim), Antibiotika (100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin in 0,85% Kochsalzlösung), Fungizone (2,5µg/ml Amphotericin B), 0,2 mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim)
Wachstums-Medium	70% DMEM, 20% MCDB 105, 10% gestripptes FCS (hitzeinaktiviert), Antibiotika-Lösung (100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin in 0,85% Kochsalzlösung), Fungizone (2,5µg/ml Amphotericin B), Glutamax (2mM L-Alanyl-L-Glutamin) und 5µg/ml Insulin; für die Epithelzellen wurde dem Medium zusätzlich 2mg/ml <i>Endothelial cell growth supplement</i> (ECGS, Promocell) zugefügt
Experiment-Medium: (Serum-frei)	75% DMEM, 25% MCDB 105, Antibiotika-Lösung (100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin in 0,85% Kochsalzlösung), Fungizone (2,5µg/ml Amphotericin B), Glutamax (2mM L-Alanyl-L-Glutamin) und 5µg/ml Insulin, 1mg/ml BSA, 50µg/ml Ascorbinsäure, 10µg/ml Transferrin, 20ng/ml EGF

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

2.3.2 Extraktion der Zellen aus nativem Gewebe

Aus dem operativ erhaltenen Endometrium wurden die epitheliale Zellpopulation und die Stromazellen extrahiert. Dafür wurde das Gewebe nach der Entnahme kurz in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und dann unmittelbar in 37°C warmen PBS-Puffer (Dulbecco's PBS) überführt. Das Endometrium wurde dreimal in jeweils 10ml DMEM-Medium gewaschen, um die Kontamination mit Blut und Schleim zu reduzieren. Dann wurde das Gewebe auf einer 10cm Kulturschale mit zwei sterilen Skalpell in ca. 1mm große Stücke zerkleinert.

Die Gewebefragmente wurden mit einer 25ml Pipette (Greiner) aufgesaugt und in 10ml Collagenase-Medium in ein 50ml Falcon-Röhrchen 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). Der Collagenase-Verdau wurde 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 etwa 5 Minuten stehen gelassen, wobei sich die größeren Epithelzellen und die Drüsenfragmente absetzen und die kleineren Stromazellen im Überstand verbleiben. Der Überstand mit den Stromazellen wurde abgenommen und durch einen Nylon-Filter mit einer Porengröße von 70 µm (Falcon) gegeben. Das Pellet aus Epithelzellen und Drüsenfragmenten wurde zweimal mit je 10ml DMEM-Medium gewaschen, um Kontaminationen mit Stromazellen zu reduzieren. Danach wurde das Epithelzellpellet in 10ml Wachstumsmedium aufgenommen und die Zellen auf einer 10cm Kulturschale ausplattiert. Die gesammelte 30ml Stromazellfraktion wurde durch einen zweiten Nylon-Filter mit einer Porengröße von 40µm gegeben und dann 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Wachstumsmedium resuspendiert und auf einer 10cm Kulturschale ausplattiert.

Etwa 45 Minuten nach dem Ausplattieren wurden die Epithelzellen zur weiteren Reduzierung der Kontamination durch Stromazellen umplattiert. Hierzu wurden diese mit dem Medium auf eine neue 10cm Kulturschale überführt. Die bereits angewachsenen Stromazellen verbleiben dabei auf der alten Kulturschale. Weitere 45 Minuten später wurde das Medium der Stromazellen gewechselt, um eventuelle Kontaminationen mit Epithelzellen zu verringern. Diese sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht angewachsen und werden mit dem Medium zusammen abgesaugt.

Um die Reinheit der extrahierten Stroma- und Epithelzellen zu überprüfen, wurden direkt nach der Filtration jeweils einige Tropfen der Epithelzellsuspension und der Stromazellsuspension auf einen Zellkulturobjekträger (LabTek® II chamber slide, Nunc) gegeben. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurde mittels immunhistochemischer Färbung des Epithelzell-spezifischen Proteins Zytokeratin die Reinheit der getrennten Zellfraktionen überprüft (siehe 3.9.3).

2.3.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung passagiert. Hierzu wurde nach Erreichen der Konfluenz das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung (1x Trypsin/EDTA in HBSS mit Indikatorfarbstoff Phenolrot) für 5-10min, bis die Zellen sich von der Platte lösten, im Brutschrank inkubiert. Die vom Gefäßboden abgelösten Zellen wurden aufgenommen und in ein steriles Röhrchen mit 0,5ml fetalem Kälberserum (FCS), zur Inaktivierung des Trypsins, überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1200rpm wurden die Zellen in Wachstumsmedium gründlich resuspendiert und eine bestimmte Verdünnung auf einer neuen Kulturschale ausgesät. In der Regel wurden die sich schnell teilenden Stromazellen 1:4 gesplittet, wohingegen die Epithelzellen beim Passagieren nur 1:2 verdünnt wurden.

2.3.4 Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen einer konfluenten 10cm Kulturschale wurden wie unter 2.3.2 beschrieben geerntet, in 1ml Einfriermedium (0,7ml DMEM; 0,2ml FCS und 0,1ml DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen (2ml, Greiner) überführt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und nach 1-2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.5 Dezidualisierung der Stromazellen

Um Zellkulturexperimente unter physiologischen Bedingungen des Endometriums der Sekretionsphase durchführen zu können, wurden die Stromazellen dezidualisiert. Dazu wurden die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz auf der gewünschten Kulturschale in Wachstumsmedium kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, um restliches Wachstumsmedium zu entfernen. Schließlich wurde 10ml Serum-freies Experimentmedium unter Zusatz von physiologischen Konzentrationen an Östradiol (10^{-8}M) und Progesteron (10^{-6}M ; beides Sigma) auf die Kulturschale gegeben und die Zellen darin 9 bis 12 Tage lang kultiviert. Dabei wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Der Grad der Dezidualisierung der Zellen wurde durch Analyse des Prolaktin-Gehaltes des Zellkulturmediums überprüft. In den meisten Fällen waren die Zellen nach 9 Tagen Kultur in Experimentmedium dezidualisiert.

2.3.6 Zellkulturexperimente

Für die Inkubation mit Östradiol, Progesteron und HCG wurden die Zellen auf 4-Well-oder auf 6-Well-Kulturschalen ausplattiert und bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Serum-freies Experimentmedium überführt. Nach 24 Stunden in diesem Medium wurden die Zellen für weitere 1 bis 48 Stunden mit physiologischen Konzentrationen an Östradiol (10^{-8}M) und Progesteron (10^{-6}M) (beides Sigma) oder mit HCG (0,1-100 IU/ml, Choragon[®] 5000, Ferring GmbH, Kiel) in Experimentmedium inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit Trizol-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) von der Platte gelöst und bis zur Extraktion der RNA bei -80°C eingefroren.

Die Inkubation mit IL-1 β erfolgte mit, wie unter 2.3.5 beschrieben, dezidualisierten Stromazellen. Die Zellen wurden nach der Dezidualisierung weitere 24 Stunden mit Serum-freiem Experiment-Medium unter Zusatz von Östradiol (10^{-8}M) und Progesteron (10^{-6}M) sowie IL-1 β (100IU/ml) und/oder IL-1 ra (100ng/ml, alles Sigma) kultiviert. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Trizol-Reagenz von der Platte gelöst und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C eingefroren.

2.4 Arbeiten mit RNA

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 von 1:1000 (0,1 % v/v) gemischt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert. Für das Arbeiten mit RNA wurde Einweg-Plastik-Material und Aerosol-dichte Pipetten-Spitzen (Biozym) verwendet. Es wurden dabei immer Einweg-Handschuhe getragen.

2.4.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

Das Gewebe wurde in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Safe lock tubes, Eppendorf) in 1ml Trizol-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) aufgenommen und mit einem speziellen Polypropylen-Stößel (Scienceware[®], Bel-Art-Products, Pequamok, USA) homogenisiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 μl Chloroform zugegeben und die Proben 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 (Hettich Zentrifuge, Mikro 22R). Die obere, wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500µl Isopropanol versetzt und gemischt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4°C und 12000 rpm) pelletiert, mit 1ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 4°C und 9500 rpm). Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde das RNA Pellet für 10 bis 15 Minuten bei RT getrocknet und in 20µl DEPC/H₂O resuspendiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (Bio Photometer, Eppendorf), wie unter 2.7.7 beschrieben. Die RNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.4.2 RNA Isolierung aus Zellkulturen

Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Medium der Zellen abgesaugt und 500 µl (bei Mehrwell-Zellkulturplatten) bzw. 1ml (bei 3,5cm bis 10cm Zellkulturplatten) Trizol auf die Zellen gegeben. Durch mehrmaliges auf und ab Pipettieren des Trizols wurden die Zellen von der Platte gelöst und homogenisiert. Die RNA Isolierung erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben.

2.5 Reverse Transkription

2.5.1 Reverse Transkription von extrahierter RNA

Bei der cDNA Synthese aus RNA wurden mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Einsatz von Oligo-dT₁₆ jeweils 1 µg Gesamt-RNA in cDNA transkribiert. Die RNA wurde mit DEPC/H₂O auf ein Volumen von 10µl gebracht und zu weiteren 10µl Reaktionsgemisch, das aus MgCl₂, PCR-Puffer, Oligo-dT₁₆, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, RNase Inhibitor und MuLV Reverse Transkriptase (GeneAmp RNA PCR Core Kit, Perkin-Elmer, Foster City, California) bestand, gegeben. Die Mengen und die endgültigen Konzentrationen der Reagenzien sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Oligo- dT₁₆ sich an das polyA⁺-Ende der RNA anlagert. Dann wurde 1 Stunde bei 42°C inkubiert (Thermocycler T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen) und anschließend durch 5 Minuten bei 99°C die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die cDNA Proben wurden mit 80µl DEPC/H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

	Volumen	Konzentration
RNA in DEPC/H ₂ O	10 µl	1 µg
25 mM MgCl ₂ Lösung	4 µl	5 mM
10x PCR-Puffer	2 µl	1x
Oligo-dT ₁₆	1 µl	2,5 µM
dNTP (je 20mM)	1 µl	1 mM (je)
RNase Inhibitor	1 µl	1 IU/µl
MuLV Reverse Transkriptase	1 µl	2,5 IU/µl
Gesamtvolumen der RT-Reaktion	20 µl	

Tabelle 3: Zusammensetzung und Konzentrationen des RT-Reaktionsgemisches.

2.5.2 Reverse Transkription embryonaler RNA

Bisherige Untersuchungen zur mRNA-Expression in Präimplantationsembryonen haben sich aufgrund der geringen Menge, der im einzelnen Embryo enthaltenen mRNA (Tabelle 4), hauptsächlich auf Untersuchungen an mehreren, gepoolten Embryonen beschränkt (Rothstein *et al.*, 1992). Um die für eine Northern Blot-Analyse benötigte RNA-Menge von ca. 5 µg, bzw. die für eine RT/PCR benötigte Menge von ca. 1 µg zu erhalten, mussten 500 – 1000 Präimplantationsembryonen gepoolt, lysiert und die RNA extrahiert werden.

Oocyte/ Zygote	Gesamte RNA	0,40 ng
	mRNA	0,35 ng
8-Zell Embryo	Gesamte RNA	0,69 ng
Morula	Gesamte RNA	1,47 ng
Blastozyste	Gesamte RNA	2 ng

Tabelle 4: Eigenschaften von Mausoozyten und Präimplantations-Embryonen (nach Hogan *et al.*, 1994).

Diese Methode lässt naturgemäß keine Rückschlüsse auf die mRNA-Expression einzelner Embryonen zu. Daher wurde bei dieser Arbeit eine Methode verwendet, bei der direkt durch Reverse Transkription am einzelnen Embryo die RNA in cDNA umgeschrieben wird (Kumazaki *et al.*, 1994; Sharkey *et al.*, 1995). Um eine höhere Spezifität der reversen Transkription zu erhalten wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich

zu den unspezifischen Oligonukleotiden (Oligo-dT₁₆) ein spezifischer Primer-Mix hinzu gefügt. Dieser Primer-Mix bestand aus den äußeren 3'-Primern, der nachzuweisenden Gene (siehe * Tabelle 6), mit einer Konzentration von jeweils 5µM.

Für jeden zu untersuchenden Embryo wurde zunächst ein 0,5ml Reaktionsgefäß (PCR Softtubes, Biozym) mit 17,5µl Reaktionsgemisch aus MgCl₂, PCR-Puffer, Oligo-dT₁₆, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (GeneAmp RNA PCR Core Kit vom Perkin-Elmer, Foster City, California), DEPC/H₂O und Primer-Mix vorbereitet. Die Mengen und die endgültigen Konzentrationen der Reagenzien sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur Zugabe des Embryos bei -20°C gelagert.

	Volumen	Konzentration
25 mM MgCl ₂ Lösung	4 µl	5 mM
10x PCR-Puffer	2 µl	1x
Oligo-dT ₁₆	1 µl	2,5 µM
dNTP (je 20mM)	1 µl	1 mM (je)
Primer-Mix (je 5 µM Primer)	1,5 µl	0,375 µM (je)
DEPC/H ₂ O	8 µl	---
Embryo (plus Medium)	1 µl	---
RNase Inhibitor	1 µl	1 IU/µl
MuLV Reverse Transkriptase	0,5 µl	1,25 IU/µl
Gesamtvolumen der RT-Reaktion	20 µl	

Tabelle 5: Zusammensetzung des RT-Reaktionsgemisches.

Die Präimplantationsembryonen wurden einzeln in ca. 1µl Medium in das RT-Reaktionsgemisch überführt. Als Negativkontrolle wurde statt eines Embryos dem Reaktionsgemisch lediglich 1µl Medium zugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem DNA-Thermocycler (T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen) sofort für 1min auf 99°C erhitzt, um die Zellen zu zerstören, die Proteine zu denaturieren und die RNA freizusetzen. Dann wurde das Reaktionsgemisch zügig auf 4°C abgekühlt und das thermolabile Enzym MuLV Reverse Transkriptase, sowie der RNase-Inhibitor (beides Perkin-Elmer, Foster City, California) hinzu gegeben. Für die cDNA Synthese wurde der Reaktionsansatz 60 min bei 42°C in einem PCR-Gerät (T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen) inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 5 min

bei 99°C inaktiviert und das Reaktionsgemisch auf 4°C abgekühlt. Die cDNA Proben wurden mit 30µl H₂O verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

Die reverse Transkription der RNA einzelner Zygoten war aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial (Tabelle 4) nicht möglich, daher wurden in diesem Fall jeweils zwei Zygoten in einen RT-Reaktionsansatz gegeben.

2.6 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

2.6.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Die cDNA-Sequenzen für die zu untersuchenden Gene wurden aus der GenBank Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) des NIH bezogen (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>). Es handelt sich dabei um die codierenden Sequenzen des Maus Gens für β -Actin (Acc.N°. M12481), VEGF (Acc.N°. M95200), VEGFR-1 (Acc.N°. D88689), VEGFR-2 (Acc.N°. X70842), sFlt (Acc.N°. D88690), NP-1 (Acc.N°. D50086), Ang-1 (Acc.N°. U83509), Ang-2 (Acc.N°. AF004326) und um die Sequenzen der menschlichen Gene für β -Actin (Acc.N°. M10277), VEGF (Acc.N°. NM_003376), VEGFR-1 (Acc.N°. E13256), VEGFR-2 (Acc.N°. X61656), sFlt (Acc.N°. U01134), NP-1 (Acc.N°. NM_003873), Ang-1 (Acc.N°. U83509), Ang-2 (Acc.N°. AB009865) und Tie-2 (Acc.N°. L06139).

Mit Hilfe des Programms OLIGO 4.1 Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, Colorado) wurden die Oligonukleotide konstruiert und von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Um sicherzustellen, dass die PCR-Produkte tatsächlich aus der Amplifikation von cDNA und nicht von genomischer DNA resultieren, wurden die Primer so gewählt, dass sie mehrere Intron/Exon-Grenzen überspannen (Abbildung 11). Die Primer-Sequenzen und die erwartete Größe der amplifizierten cDNA sind in den Tabellen 6 (Maus Primer) und 7 (Human Primer) zusammengefasst.

cDNA	Primer Nummer	äußeres /inneres Paar	Fragment Länge	3'-/5'-Ende	Oligonukleotidsequenz
β-Actin	#19		409 bp	5'	5' caa ggt gtg atg gtg gga atg g 3'
	#20			3'	5' cag gat ggc gtg agg gag ca 3'
VEGF	#75	äußeres	365 bp	5'	5' tgg acc ctg gct tta ctg 3'
	#40			3'	5' tgg tct gca ttc aca tct g 3' *
	#41	inneres	188 bp	5'	5' att gag acc ctg gtg gac a 3'
	#42			3'	5' tgt gct ggc ttt ggt gag 3'
VEGF _{soformen}	#120		279 bp		
			411 bp		
			483 bp	3'	5' tca ccg cct tgg ctt gtc ac 3' *
VEGFR-1	#76	äußeres	775 bp	5'	5' cac tgc cac tct cat tgt aa 3'
	#77			3'	5' cac tga tgg aga cct cgt ag 3' *
	#78	inneres	713 bp	5'	5' cca agc cca cct ctc tat cc 3'
	#79			3'	5' cac tga tgg aga cct cgt ag 3'
VEGFR-2	#82	äußeres	672 bp	5'	5' gcc tct cat ggt gat tgt g 3'
	#83			3'	5' tct ggg gta gtg tag tca gg 3' *
	#84	inneres	398 bp	5'	5' gca tca cca gca gcc aga g 3'
	#85			3'	5' ttc cca gag caa cac acc g 3'
sFlt	#76	äußeres	783 bp	5'	5' cac tgc cac tct cat tgt aa 3'
	#80			3'	5' caa tca ttc ctc ctg ctt tta 3' *
	#78	inneres	669 bp	5'	5' cca agc cca cct ctc tat cc 3'
	#81			3'	5' tgc cgc agt gct cac ctc 3'
NP-1	#73	äußeres	850 bp	5'	5' gga atgttg ggc atg gtg tct gg 3'
	#74			3'	5' ggg aat aga cca cag ggc tca cc 3' *
	#134	inneres	465 bp	5'	5' tgg acc tgg gag atg aga ag 3'
	#135			3'	5' ctg att gga tgg tgc tgt ct 3'
Ang-1	#125	äußeres	793 bp	5'	5' gaa cca ctc tct tat ctc ag 3'
	#126			3'	5' cta tgt gga atc tgt cgt ac 3' *
	#127	inneres	414 bp	5'	5' aac atc ccg act tga aat ac 3'
	#128			3'	5' cag ctt gat ata cat ctg ca 3'
Ang-2	#121	äußeres	809 bp	5'	5' taa acc aga cga caa gac tc 3'
	#122			3'	5' ggt tgg ctg atg cta ctt at 3' *
	#123	inneres	510 bp	5'	5' gaa agt tct gga cat gga gg 3'
	#124			3'	5' gct ggg aga caa act cat tg 3'

Tabelle 6: Primer zur Amplifikation von β-Actin, Komponenten des VEGF-Systems, NP-1, Ang-1 und Ang-2 in Zygoten und Präimplantationsembryonen der Maus. Die mit * markierten Primer wurden zusätzlich bei der Reversen Transkription eingesetzt.

RNA	Primer Nummer	Fragment Länge	3'-/5'-Ende	Oligonukleotidsequenz
β-Actin	#1	798 bp	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 3'
VEGF	#39	297 bp	5'	5' ggg cag aat cat cac ga 3'
	#40		3'	5' tgg tct gca ttc aca ttt g 3'
VEGFR-1	#47	207 bp	3'	5' tgg tct gca ttc aca ttt gtg tgc tgg cct tgg tga gtc gtc att gca gca gc 3'
			<i>floating</i>	
	#51	655 bp	5'	5' gca cct tgg ttg tgg ctg act 3'
			3'	5' ccc ttc tgg ttg gtg gct ttg 3'
VEGFR-2	##43	751 bp	3'	5' ccc ttc tgg ttg gtg gct ttg gag gtt tcg cag gag gta tgg 3'
			<i>floating</i>	
	#44	412 bp	5'	5' aac aaa gtc ggg aga gga 3'
			3'	5' tga caa gaa gta gcc aga aga 3'
sFlt	#47	643 bp	3'	5' tga caa gaa gta gcc aga aga cct gac cac gca atg tc 3'
			<i>floating</i>	
	#48	475 bp	5'	5' gca cct tgg ttg tgg ctg act 3'
			3'	5' gag ccc ggg ggt ctc att att 3'
NP-1	#118	386 bp	3'	5' gag ccc ggg ggt ctc att att gcc ttt ttg ttg cag tgc tca 3'
			<i>floating</i>	
	#119	267 bp	5'	5' ccc gca cct cat tcc tac atc 3'
			3'	5' cat tca tcc acc aag ttc ccg 3'
Ang-1	#97	444 bp	5'	5' ccc gca cct cat tcc tac atc gct cgg act gga aga tga tc 3'
			<i>floating</i>	
	#198	240 bp	5'	5' tcg tga aga tgg aag tct ag 3'
			3'	5' tgc cac ttt atc cca ttc ag 3'
Ang-2	#116	754 bp	5'	5' tcg tga aga tgg aag tct aga cag cag gaa aac aga gca g 3'
			<i>floating</i>	
	#93	364 bp	5'	5' aat agt gac tgc cac ggt g 3'
			3'	5' gag cga ata gcc tga gcc t 3'
Tie-2	#117	395 bp	5'	5' aat agt gac tgc cac ggt gag act ggg aag gga atg ag 3'
			<i>floating</i>	
	#103	320 bp	5'	5' tgg aat gac ctg cct gac tg 3'
			3'	5' gat gat gtt tgg atg gtg tcc 3'
	#129		5'	5' tgg aat gac ctg cct gac tga acg tga ggg aag aac cag c 3'
			<i>floating</i>	

Tabelle 7: Primer zur Amplifikation von β- Actin, VEGF, NP-1 und der Komponenten der Angiopoietin-Familie in humanem Endometrium und Primärzellkulturen.

2.6.2 Kontrolle der reversen Transkription durch β -Actin PCR

Durch Amplifikation des *housekeeping*-Gens β -Actin wurde der Erfolg der reversen Transkription der embryonalen, endometrialen und zellulären RNA kontrolliert.

Die PCR Reaktionen wurden in 50 μ l Ansätzen in 0,5ml Reaktionsgefäßen (PCR Softtubes, Biozym) pipettiert. Sie enthielten jeweils 5 μ 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). Die genauen Mengen und Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die Primer für die β -Actin PCR sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Reagenzien	Volumen	Konzentration
cDNA	5 μ l	---
10x PCR-Puffer inkl. 1,5 mM $MgCl_2$	5 μ l	1x
dNTP's (je 5mM)	2 μ l	1mM (je)
5' Primer (5 μ M)	2 μ l	0,2 μ M
3' Primer (5 μ M)	2 μ l	0,2 μ M
Taq DNA Polymerase	0,2 μ l	1IU
steriles H_2O	33,8 μ l	
Gesamtvolumen der PCR	50 μ l	

Tabelle 8: Zusammensetzung der β -Actin PCR.

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen). Es wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der cDNA-Fragmente gewählt: 5 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 β -Actin cDNA aus Mausembryonen erfolgten 40 Zyklen, für die β -Actin-Amplifikation in menschlichem Endometrium bzw. Zellkulturen erfolgten lediglich 30 Zyklen. Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei 4°C gelagert.

2.6.3 Kompetitive PCR

Durch kompetitive PCR kann der cDNA-Gehalt und damit im Rückschluss auch der mRNA-Gehalt einer unbekannten Probe quantitativ ermittelt werden (Tsai *et al.*, 1996). In einer modifizierten Anwendung der kompetitiven PCR (Krüssel *et al.* 1998) wird der cDNA Gehalt lediglich semiquantitativ erfasst, jedoch ist auch hier ein Vergleich der mRNA-Expression mehrerer Proben, wie z.B. der Expression eines Gens im Endometrium verschiedener Zyklustage, möglich.

Bei der modifizierten Methode wird zunächst ein kompetitives cDNA-Fragment (Kompetitor) hergestellt. Dieses entspricht in seiner Sequenz zum Großteil der nativen cDNA (Target) und enthält die gleichen Primer-Bindungsstellen. Allerdings enthält es innerhalb des zu amplifizierenden Fragments eine Deletion (Abb. 9), so dass es nach Amplifikation aufgrund der Größe von dem target Fragment unterschieden werden kann. Nach einer PCR mit der nativen cDNA unbekannten Gehaltes und einer definierten Menge an kompetitiver cDNA kann die Menge an target cDNA über das Verhältnis von Kompetitor zu Target semiquantitativ bestimmt werden.

2.6.3.1 Synthese des Kompetitors

Für die Herstellung des Kompetitors wurde zunächst für jedes zu untersuchende Gen ein sogenannter *floating*-Primer konstruiert. Bei diesem Primer wird der eigentliche 5' oder 3' Primer mit einer kurzen Sequenz (ca. 20 bp), die innerhalb des zu amplifizierenden Fragmentes liegt, kombiniert (Abb. 9).

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.

Die PCR zur Konstruktion des Kompetitors wurde als 50µl Ansatz in einem 0,5ml Reaktionsgefäß (PCR Softtubes, Biozym) angesetzt. Die Zusammensetzung des Ansatzes entsprach dem Reaktionsansatz der β -Actin PCR (Tabelle 8). Die Anzahl der Zyklen und die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer sind Tabelle 10 zu entnehmen.

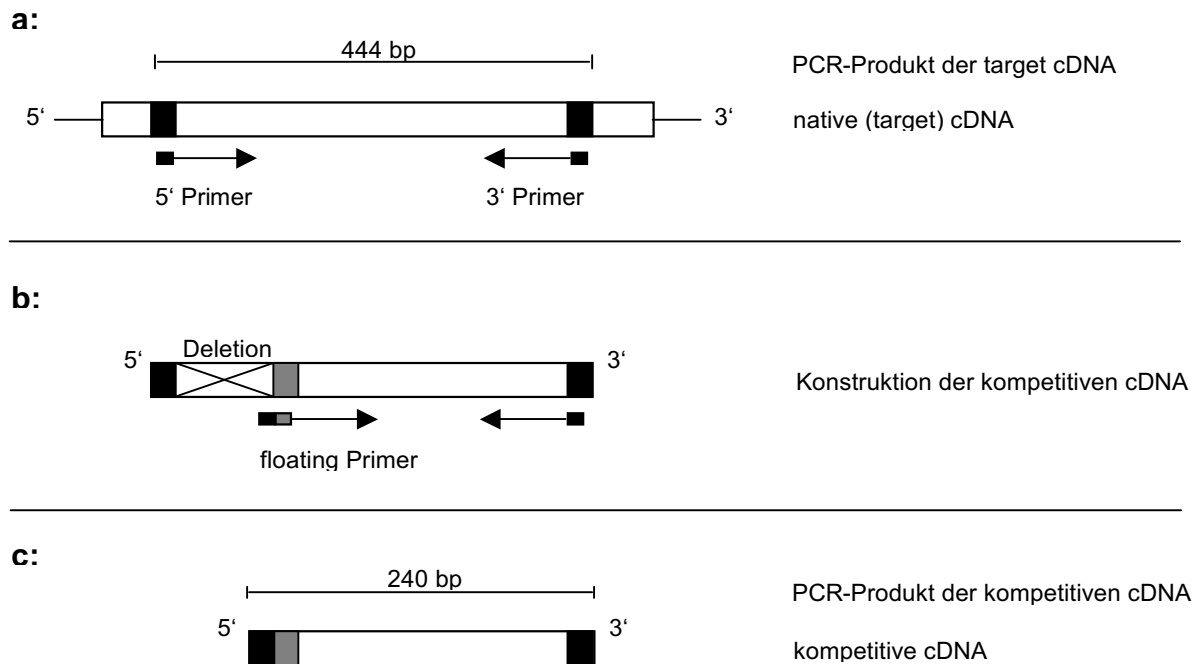


Abbildung 10: Konstruktion der kompetitiven cDNA am Beispiel von Ang-1. a: Größe des nativen cDNA-Fragments und Lokalisation der Primer-Bindungsstellen für den 5'- und 3'-Primer (schwarz). b: Lokalisation des *floating*-Primers (schwarz-grau) und Konstruktion der kompetitiven cDNA. Eine Deletion wird eingeführt, um ein verkürztes cDNA-Fragment mit denselben Primer-Bindungsstellen, wie bei der nativen cDNA, zu erzeugen. c: Größe des kompetitiven cDNA-Fragmentes und Lokalisation der Primer-Bindungsstellen für den 5'- und 3'-Primer (schwarz).

Das kompetitive Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des "QIAEX II-Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) aus dem Gel extrahiert und gereinigt (siehe 2.7.5). Die extrahierte cDNA wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und durch Spektrophotometrie (Bio Photometer, Eppendorf) quantifiziert (siehe 2.7.7).

2.6.3.2 Ansatz der kompetitiven PCR

Durch kompetitive PCR wurde die Expression der cDNA bzw. mRNA der Komponenten der Angiopoietin-Familie und von Neuropilin-1 im Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen untersucht. Ebenso wurden die Zellkulturexperimente mittels kompetitiver PCR ausgewertet.

Für die kompetitive PCR wurde in einem 0,5ml Reaktionsgefäß ein 50 µl Reaktionsgemisch mit 5 µl target cDNA, einer definierten Menge an kompetitiver cDNA, PCR-Puffer, dNTP's (100mM dNTP Set, Eppendorf) und Taq-Polymerase (inklusive PCR-

Puffer von Amersham Pharmacia Biotech) angesetzt. Die genauen Mengen der Reagenzien sind Tabelle 9 zu entnehmen, die Mengen an Kompetitor Tabelle 10.

Reagenzien	Volumen	Konzentration
target cDNA	5 µl	---
kompetitive cDNA	x µl	x amol/µl
10x PCR-Puffer inkl. 1,5 mM MgCl ₂	5 µl	1x
dNTP's (je 5mM)	2 µl	1mM (je)
5' Primer (5 µM)	2 µl	0,2µM
3' Primer (5µM)	2 µl	0,2µM
Taq DNA Polymerase	0,2 µl	1IU
steriles H ₂ O	33,8-xµl	
Gesamtvolumen der PCR	50 µl	

Tabelle 9: Zusammensetzung der kompetitiven PCR.

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen) mit den folgenden Parametern: 5 min bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der DNA, 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 53-58°C 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 10 zu entnehmen.

mRNA	Menge an kompetitiver cDNA / PCR	Anzahl der PCR-Zyklen	Annealing-Temperatur der Primer [°C]
Ang-1	0,02 amol/µl	35	53
Ang-2	0,02 amol/µl	32	57
Tie-2	0,04 amol/µl	35	53
NP-1	0,1 amol/µl	30	58
VEGF	0,2amol/µl	30	54

Tabelle 10: Menge an kompetitiver cDNA und Anzahl der Zyklen der kompetitiven PCR. Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer.

Nach der Reaktion wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des GelDoc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) analysiert. Es wurde eine Fotodokumentation angefertigt und densitometrische Analysen der cDNA-

Bandenintensitäten mit Hilfe der Molecular Analyst Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) durchgeführt. Anhand des Quotienten der Bandenintensitäten der target cDNA-Bande und der kompetitiven cDNA-Bande konnte die Menge an target cDNA semiquantitativ ausgewertet werden.

2.6.4 Nested PCR

Die Menge, die aus einzelnen Präimplantationsembryonen gewonnenen cDNA, ist aufgrund der geringen Menge an mRNA im Embryo (Tabelle 4) sehr gering. Der Nachweis bestimmter Gene muss daher in vielen Fällen mittels einer *nested* PCR erfolgen.

Dabei wird die zu untersuchende cDNA zunächst mittels eines äußeren Primerpaares amplifiziert. Im Anschluss daran erfolgt eine zweite PCR mit dem Produkt der 1. PCR als Template und einem inneren Primerpaar. Die inneren Primer liegen jeweils etwa 100bp von den äußeren Primern entfernt. Das Prinzip der *nested* PCR ist in Abbildung 11 dargestellt.

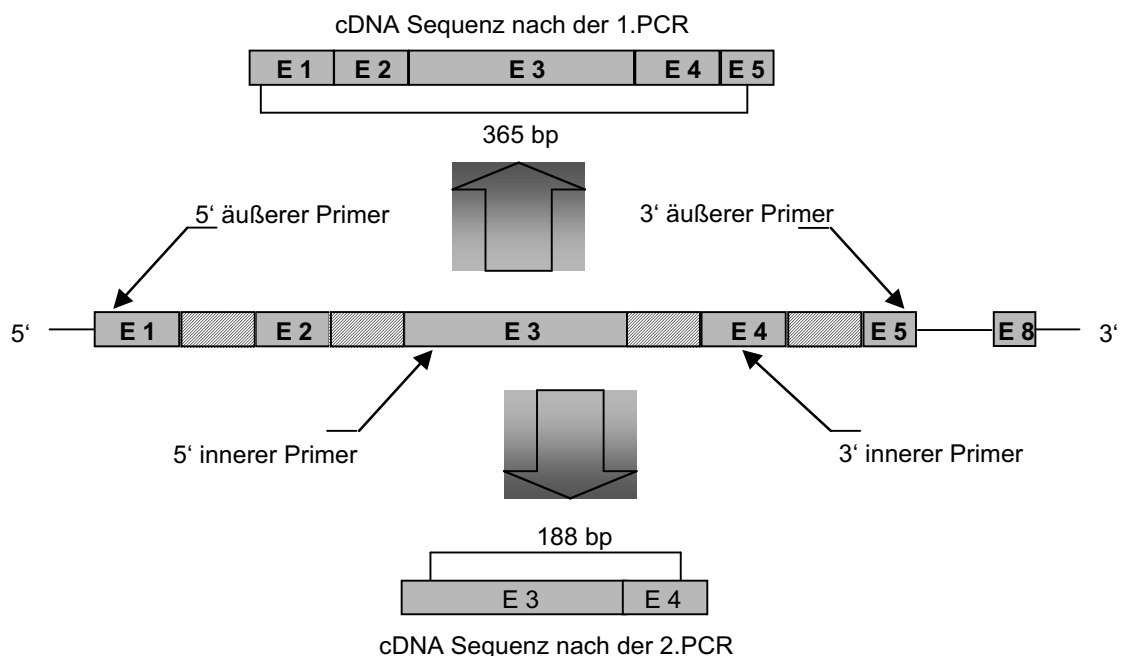


Abbildung 11: Prinzip der *nested* PCR.

Die Reaktionen der *nested* PCR wurden als 50µl Ansätze in dünnwandigen 0,5ml Reaktionsgefäßen (PCR Softtubes, Biozym) angesetzt. Für den ersten PCR-Ansatz mit dem äußeren Primer-Paar wurden jeweils 5µl der cDNA-Lösung zu 45µl PCR-1-Mix, bestehend aus MgCl₂, PCR-Puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (alle Reagenzien vom Perkin-Elmer, Foster City, California), äußere 5' und 3' Primern, sowie AmpliTaqGold Polymerase (Perkin Elmer) pipettiert. Die Primer für die *nested* PCR's sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die Mengen und die endgültigen Konzentrationen der Reagenzien sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

	Volumen	Konzentration (incl. der Reagenzien aus der RT)
25 mM MgCl ₂ Lösung	3,4 µl	1,9 mM
10x PCR-Puffer	4,7 µl	1x
dNTP (je 20mM)	1 µl	1mM (je)
äußerer 5' Primer (5 µM)	2 µl	0,2µM
äußerer 3' Primer (5µM)	2 µl	0,2µM
H ₂ O	28,7 µl	---
cDNA	5 µl	---
AmpliTaQGold® DNA Polymerase	0,2 µl	1IU/ 50 µl
Gesamtvolumen der PCR	50 µl	

Tabelle 11: Zusammensetzung des 1. (äußeren) PCR-Ansatzes.

Die erste PCR-Reaktion wurde in einen PCR-Thermocycler mit beheizbarem Deckel (T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen) gegeben. Die verwendete AmpliTaqGold®-Polymerase ist eine spezielle DNA-Polymerase, die zunächst 15 min bei 95°C aktiviert werden muss. Die nachfolgenden Schritte der PCR waren: 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 52°-58°C und 45 sec bei 72°C. Nach 40 Zyklen mit diesen Parametern wurde die Reaktion durch 5 min bei 72°C komplettiert und durch Abkühlung auf 4°C beendet. Nach Abschluss der 1. PCR-Reaktion wurden die Produkte bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Für die 2. PCR mit den inneren Primerpaaren wurden 5µl des Produktes der 1. PCR zu 45µl PCR-2-Mix, bestehend aus MgCl₂, PCR-Puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (alle Reagenzien vom Perkin-Elmer, Foster City, California), inneren 5' und 3' Primern und AmpliTaqGold®-Polymerase gegeben. Die Mengen und die endgültigen Konzentrationen der Reagenzien der 2. PCR sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

	Volumen	Konzentration (incl. der Reagenzien aus der 1. PCR)
25 mM MgCl ₂ Lösung	3,6 µl	2 mM
10x PCR-Puffer	4,8 µl	1x
dNTP (je 20mM)	1 µl	1mM (je)
innerer 5' Primer (5 µM)	2 µl	0,2 µM
innerer 3' Primer (5 µM)	2 µl	0,2 µM
H ₂ O	28,4µl	---
PCR-1-Produkt	5 µl	---
AmpliTaqGold® DNA Polymerase	0,2 µl	1 IU
Gesamtvolumen der 2. PCR	50 µl	

Tabelle 12: Zusammensetzung des 2. (inneren) PCR-Ansatzes.

Die 2. PCR erfolgte in einem Thermocycler (T-Gradient, Biometra) mit beheizbarem Deckel und den gleichen Parametern wie bei der 1. PCR. Die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer waren: 54°C bei VEGF, 52°C bei VEGFR-1, VEGFR-2 und sFlt, 53°C bei Ang-1 und 57°C bei Ang-2.

Die Produkte der *nested* PCR wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des GelDoc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) analysiert und eine Fotodokumentation angefertigt.

2.6.5 Multiplex PCR

Die mRNA Expression der Angiopietine im Verlauf des Menstruationszyklus wurde zusätzlich zu der kompetitiven PCR auch mittels einer Multiplex PCR untersucht. Dabei wurden 5µl cDNA der Endometriumbiopsien in einem PCR-Ansatz mit den gleichen Mengen an Primern für Ang-1 und Ang-2 (je 2µl der 5' und 3' Primer) amplifiziert. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches entsprach dem Ansatz der β -Actin PCR (Tabelle 8).

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (T-Gradient, Biometra) mit folgenden Parametern: 5 Minuten Denaturierung der DNA bei 94°C gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 53°C und 45 Sekunden bei 72°C und zum Abschluss der Reaktion weitere 5 Minuten bei 72°C.

Die Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des GelDoc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) analysiert.

2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Produkte der kompetitiven und der *nested* Polymerasekettenreaktionen wurden mittels horizontaler Gel-Elektrophorese untersucht. Diese wurde mit 2%igen Agarosegelen in einer H5-Elektrophoresekammer (Gibco BRL) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Pufferlösung aus 89mM Tris, 2mM EDTA und 89mM Borsäure (1x TBE-Puffer) in H₂O angefertigt. Zur Herstellung des Gels wurden 1,8g Agarose (Sigma) in 90ml dieses Puffers in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf ca. 70°C wurden 3µl 1%ige Ethidiumbromid-Lösung hinzu gegeben und die Lösung in die Gelkammer gegossen. Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 90 bis 110 Volt für 40 bis 60 Minuten. Um die Länge der aufgetragenen cDNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein 100bp DNA-Standard (Gibco BRL) aufgetragen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Agarosegele mit Hilfe des GelDoc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 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. Größenskalkulationen und densitometrische Analysen der cDNA-Banden wurden mit Hilfe der Molecular Analyst Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) durchgeführt.

2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die DNA Extraktion erfolgte mittels QIAEX II Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden). Dafür wurde die cDNA in einem 1-1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, das Gelstück mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Safe lock tube, Eppendorf) überführt. Die DNA Extraktion erfolgte laut Vorschrift. Die extrahierte DNA wurde in 20µl Wasser aufgenommen und photometrisch (Bio Photometer, Eppendorf) quantifiziert.

2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

$$\text{ds RNA: } OD_{260}=1=40\mu\text{g/ml}$$

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

Hinweise zur Reinheit einer Nukleinsäurepräparation wurden aus dem Quotienten der gemessenen optischen Dichten erhalten. Eine reine Nukleinsäure zeichnet sich durch ein OD 260/280- Verhältnis von 1.8 bis 2.0 aus. DNA-Sequenzierung.

2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von amplifizierten cDNA-Fragmenten erfolgte als Auftragssequenzierung. Diese wurden mit spezifischen Oligonukleotiden im Molekularbiologischen Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität mittels „ABI Prism“-Sequenzierautomat durchgeführt. Die zu sequenzierende cDNA wurde durch Gelextraktion (7.2.6) gewonnen.

2.11 Histologische Techniken

2.11.1 Paraffinschnitte

Es wurden Schnitte von menschlichem Endometrium und von Maus Uteri hergestellt. Hierzu wurden die Gewebe zunächst durch Inkubation in 4% Paraformaldehyd in PBS über Nacht bei 4°C fixiert. Dann wurden die Präparate im Autotechnikon (Citadel 2000, Shandon, Frankfurt) über Nacht zunächst in einer aufsteigenden Reihe von Ethanol (2x 80%, 2x 96% und 2x 99%) und anschließend in Ethanol/Aceton-Gemischen (2x EtOH abs./ Aceton 1:1, 2x Aceton) dehydratisiert.

Anschließend wurden sie im Histocentre 2 (Shandon, Frankfurt) in flüssigen Paraplast (Merck, Darmstadt) eingebettet. Nach Aushärtung der Präparate über Nacht wurden 3µm dünne Paraffinschnitte an einem Mikrotom (Jung RM 2045, Leica) hergestellt. Die Schnitte wurden in einem ca. 45°C warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger gezogen und für einige Zeit bei ca. 45°C auf einer Streckbank inkubiert.

Zur Vollständigen Trocknung der Paraffinschnitte wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.11.2 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Die Immunhistochemische Färbung erfolgte mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode und dem Farbstoff Diaminobenzidin (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 Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt.

Die verwendeten Primärantikörper wurden, soweit nicht anders erwähnt, von der Firma Santa Cruz bezogen. Alle anderen Nachweisreagenzien stammten von der Firma Vector und wurden laut Vorschrift angesetzt. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger, zur vollständigen Entfernung der zuvor verwendeten Reagenzien, dreimal jeweils 5 Minuten in PBS (10mM Phosphat; 0,15mM NaCl; pH 7.2) 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, leichten Schütteln inkubiert.

Die Gewebeschnitte wurden zuerst durch zweimal 15 Minuten Inkubation in Xylol entparaffiniert. Dann wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 90%, 80% und 70% EtOH) hydratisiert. Dazu wurden die Objektträger jeweils 2-3 Minuten in der jeweiligen Ethanol-Verdünnung inkubiert. Anschließend wurden durch 10minütige Behandlung mit 3% H₂O₂ (Sigma) in PBS bei RT die endogenen Peroxidasen der Zellen blockiert, um eine unspezifische Färbung durch diese Enzyme zu vermeiden. Im Anschluss daran erfolgte bei RT eine 20minütige Inkubation mit Normalserum, welches 1:20 in 1,5% BSA/PBS verdünnt wurde. Dabei muss beachtet werden, dass das verwendete Serum dem gleichen Tier entstammt, wie der biotinylierte Sekundärantikörper. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Monoclonal mouse Anti-Human Cytokeratin (M0821, Dako), rabbit Anti-Human Von Willebrandt Factor (A0082, Dako), Polyclonal rabbit Anti-Mouse, Rat and Human VEGF (sc-507), Polyclonal rabbit Anti- Mouse, Rat and Human VEGFR-1 (sc-316), Polyclonal rabbit Anti-Mouse,

Rat and Human VEGFR-2 (sc-504), Polyclonal goat Anti- Mouse, Rat and Human Ang-1 (sc-9360), Polyclonal goat Anti-Mouse, Rat and Human Ang-2 (sc-7015) und Polyclonal rabbit Anti-Mouse, rat and Human Tie-2 (sc-324) (alle Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte die Behandlung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:100 in 1,5% BSA/PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf die Objektträger gegeben. Als nächstes wurden die Schnitte 30 Minuten bei RT mit dem ABC-Peroxidase-Komplex inkubiert. Darauf folgten 5 Minuten Färbung mit dem DAB-Farbstoff bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellkerne durch kurzes Eintauchen der Objektträger in Meyers Hämalaun-Lösung gegengefärbt. Die Gewebeschnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 Minuten in 70%, 80%, 90% und absolutem Ethanol) dehydratisiert und für jeweils 15 Minuten in Xylol inkubiert. Zum Schluss wurden die einzelnen Objektträger mit Eukitt-Eindeckmedium versehen und mit einem Deckgläschen bedeckt.

2.11.3 Immunhistochemie an Zell-Monolayern

Zur Kontrolle der Reinheit der aus Endometrium extrahierten Stroma- und Epithelzellen, wurde eine immunhistochemische Färbung der Zellen mit dem Epithelzell-spezifischen Strukturprotein Zytokeratin durchgeführt.

Die Stroma- und die Epithelzellen wurden hierfür bis zur Konfluenz auf Zellkulturobjektträgern (LabTek chamber slides, Nunc) kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Die Fixierung erfolgte je nach Vorschrift des Primärantikörpers mit eiskaltem Aceton, Methanol bzw. mit 4% Paraformaldehyd. Die Objektträger wurden bei der Fixierung 10 Minuten in dem jeweiligen Reagenz inkubiert. Im Anschluss an die Fixierung erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen mit 3prozentiger Wasserstoffperoxid-Lösung und die immunhistochemische Färbung wie unter 2.8.2 beschrieben.

2.12 Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA)

Das G1.2™ und das G2.2™ Medium (Vitrolife, Göteborg, Schweden), in welchem die Embryonen vom Stadium der Zygote bis zum Stadium der späten Blastozyste kultiviert wurden (siehe 2.1.2), wurde mittels eines Quantikine® M mouse VEGF Immunoassay (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) auf den Gehalt an VEGF-Protein untersucht. Dieser ELISA detektiert spezifisch die VEGF-Isoformen VEGF₁₂₀ und VEGF₁₆₄.

Das Detektionslimit ist 3pg/ml. Jeweils zwei Tropfen Kulturmedium (je 30µl) von 10 Zygoten wurden kombiniert, um das für den Assay benötigte Mindestvolumen von 50µl zu erreichen. Als Negativkontrolle wurde G1.2™ und G2.2™ Medium, in dem keine Embryonen kultiviert wurden, eingesetzt. Der Immunoassay erfolgte nach Vorschrift.

3 ERGEBNISSE

3.1 β -Actin-Expression der Maus-Präimplantationsembryonen

Insgesamt wurden 476 einzelne Präimplantationsembryonen der Maus revers transkribiert und auf die Expression des *housekeeping*-Gens β -Actin untersucht. Die untersuchten embryonalen Entwicklungsstadien waren: 115 x 8-Zell-Embryonen, 124 x Morulae, 122 x frühe Blastozysten und 114 x *hatching* Blastozysten. Das Entwicklungsstadium der Embryonen wurde unmittelbar vor Durchführung der RT-Reaktion mittels eines inversen Mikroskopes begutachtet (Abb. 8) und nur Embryonen mit normaler Morphologie wurden für die reverse Transkription verwendet.

Bei insgesamt 445 (93%) der 476 Embryonen, die in die RT-Reaktionen eingesetzt wurden, konnte die mRNA von β -Actin nachgewiesen werden (Abb. 12).

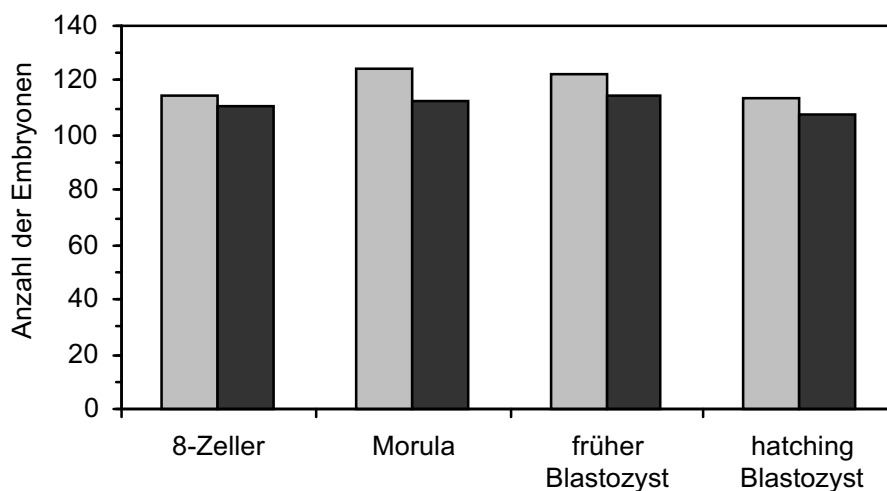


Abbildung 12: Gesamtzahl (■) und Anzahl der Embryonen mit nachweisbarer β -Actin-mRNA Expression (■) pro untersuchtem Entwicklungsstadium.

Im Einzelnen waren 111 von 115 8-Zellern (97%), 113 von 124 Morulae (91%), 115 von 122 frühen Blastozysten (94%) und 108 von 114 *hatching* Blastozysten (95%) β -Actin positiv.

Abbildung 13 illustriert repräsentativ an jeweils 8 einzelnen Präimplantationsembryonen der verschiedenen Entwicklungsstadien die Bande der β -Actin cDNA bei 409 bp.

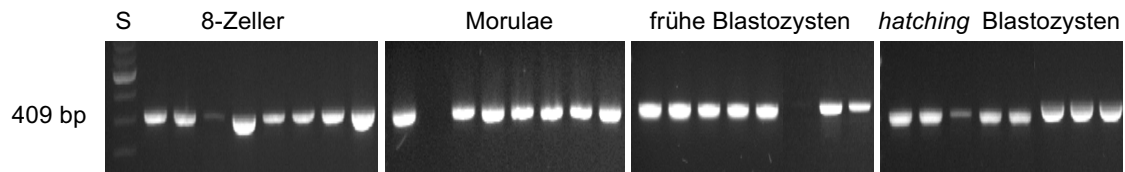


Abbildung 13: β -Actin Kontrolle der reversen Transkription von Maus-Embryonen. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

Nur bei den Embryonen mit nachweisbarer β -Actin mRNA wurde die reverse Transkription als erfolgreich betrachtet und die cDNA in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

3.2 mRNA-Expression des VEGF-Systems in Präimplantationsembryonen der Maus

Es wurden insgesamt 173 der 476 einzelnen Präimplantationsembryonen (39x 8-Zell-Embryonen, 44x Morula, 38x frühe Blastozysten und 33x *hatching* Blastozysten) mittels RT/*nested* PCR auf die mRNA-Expression von Komponenten der VEGF-Familie untersucht. In allen untersuchten Entwicklungsstadien konnte die mRNA von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 nachgewiesen werden (Abb. 14). Dagegen konnte in keinem der untersuchten Präimplantationsembryonen die mRNA des Antagonisten *sflt* detektiert werden.

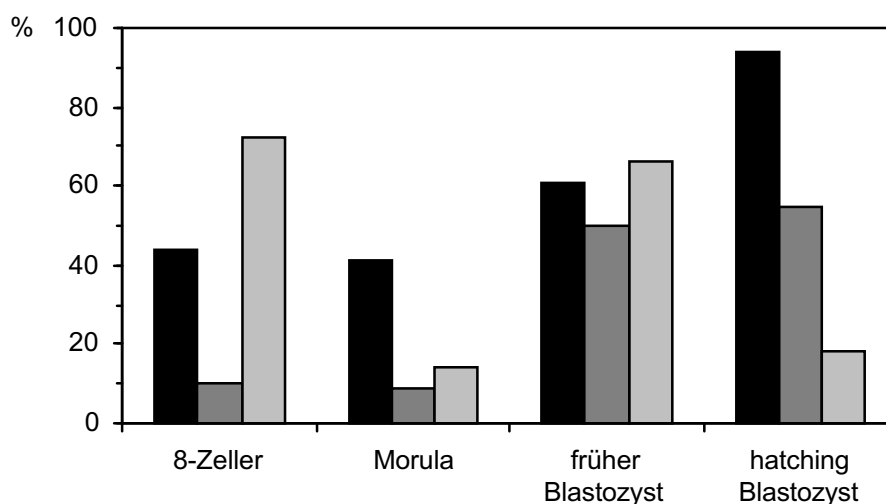


Abbildung 14: Prozentualer Anteil positiver mRNA-Expression von Komponenten der VEGF-Familie in den verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien. Dargestellt sind: VEGF (■); VEGFR-1 (■) und VEGFR-2 (■).

Der Anteil der untersuchten Embryonen mit nachweisbarer VEGF mRNA-Expression stieg mit fortschreitender Embryonalentwicklung statistisch signifikant an (frühe – *hatching* Blastozysten: $p < 0,01$; 8-Zell – *hatching* Blastozysten, Morula – *hatching* Blastozysten: $p < 0,001$ [χ^2 -Test]), wobei eine maximale Expressionsrate von 94% (31/33) bei den *hatching* Blastozysten erreicht wurde. Auch der Anteil der Embryonen mit nachweisbarer mRNA des VEGFR-1 stieg von 10% bei den 8-Zell-Embryonen (4/39) und Morulae (4/44) auf durchschnittlich 50% bei den frühen und *hatching* Blastozysten (19/38 bzw. 15/33). Der Anteil der Embryonen mit nachweisbarer Expression des VEGFR-2 folgte keinem erkennbaren Muster. In 72% (24/39) der 8-Zell-Embryonen, in nur 14% (6/44) der Morulae, in 66% (25/38) der frühen Blastozysten und in 18% (6/33) der *hatching* Blastozysten konnte die mRNA des Rezeptors nachgewiesen werden.

Abbildung 15 zeigt repräsentativ an 8 verschiedenen Embryonen jedes untersuchten Entwicklungsstadiums die Banden der VEGF-cDNA bei 188 bp, die der VEGFR-1 cDNA bei 713 bp und die der VEGFR-2 cDNA bei 398 bp.

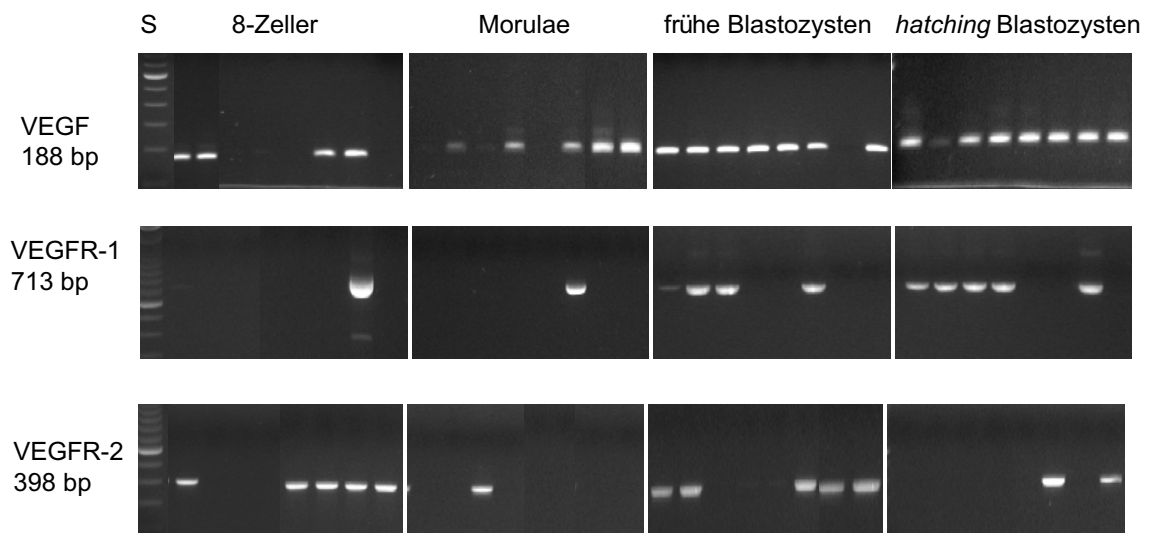


Abbildung 15: Nachweis der mRNA-Expression von Komponenten der VEGF-Familie in Präimplantationsembryonen der Maus. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

Es ließ sich keine signifikante Korrelation der Expression der untersuchten mRNA's untereinander abhängig vom Entwicklungsstadium der untersuchten Embryonen aufzeigen. Somit konnte kein "typisches" mRNA-Expressionsmuster gefunden werden.

3.3 Expressionsmuster der VEGF-Isoformen in Maus-Embryonen

Durch alternatives Spleissen des VEGF-Gens können verschiedene VEGF mRNA-Isoformen generiert werden. Diese enthalten alle die Exons 1 bis 5 sowie das Exon 8. Sie unterscheiden sich bei der Maus durch kein zusätzliches Exon (VEGF₁₂₀), durch ein zusätzliches Exon 7 (VEGF₁₆₄) bzw. durch die zusätzlichen Exons 6 und 7 (VEGF₁₈₈).

Um die in den Präimplantationsembryonen exprimierten VEGF-Isoformen einzeln nachweisen zu können, wurde eine *nested* PCR mit einem speziellen 3' Primer durchgeführt. Dieser ist auf dem Exon 8 lokalisiert, so dass bei der cDNA Amplifikation je nach VEGF-Isoform Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Die Lokalisation der Primer für die *nested* PCR ist in Abbildung 16 dargestellt.

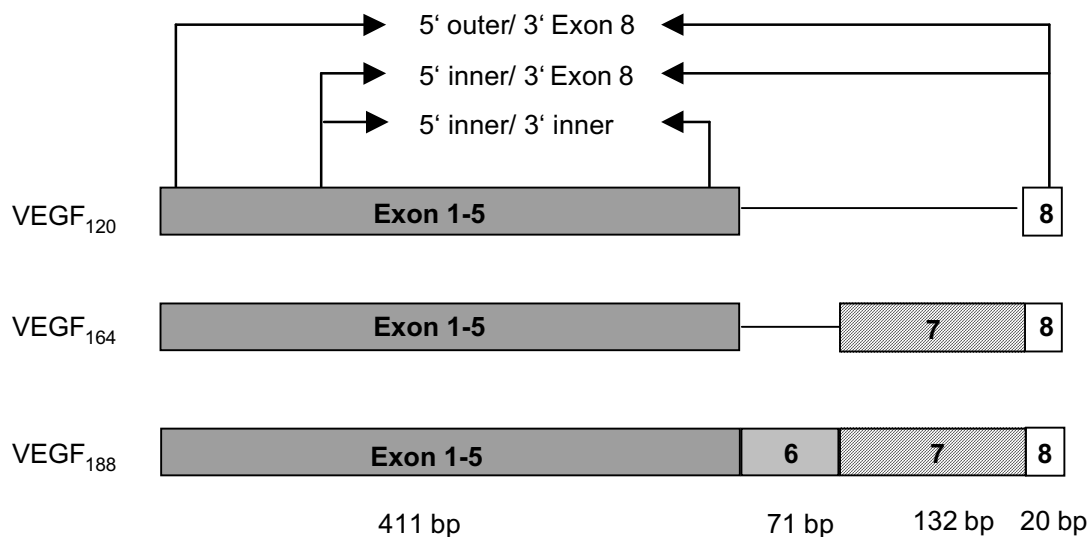


Abbildung 16: Lokalisation der Primer für die *nested* PCR zur Amplifikation der einzelnen VEGF-Isoformen in Präimplantationsembryonen der Maus.

Bei der ersten Runde der *nested* PCR wurden die cDNA's der Mausembryonen zunächst mit dem äußeren 5' Primer und mit dem 3' Exon 8 Primer amplifiziert. Anschließend wurden die Produkte der 1. PCR in einem Ansatz mit den inneren, auf den gemeinsamen Exons 1 bis 5 lokalisierten 5' und 3' Primern amplifiziert, um die VEGF-Isoformen zunächst zusammen zu erfassen (VEGF_{gesamt}). In einem zweiten Ansatz wurden die Isoformen schließlich getrennt voneinander erfasst, indem die Produkte der 1. PCR mit dem inneren 5' Primer und mit dem auf Exon 8 lokalisierten 3' Primer amplifiziert wurde.

Diese PCR führt zu drei cDNA Fragmenten mit einer Größe von 483 bp, 411 bp und 279 bp, welche den cDNA's der Isoformen VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈ entsprechen. Abbildung 17 zeigt repräsentativ das Bandenmuster der VEGF-Isoformen.

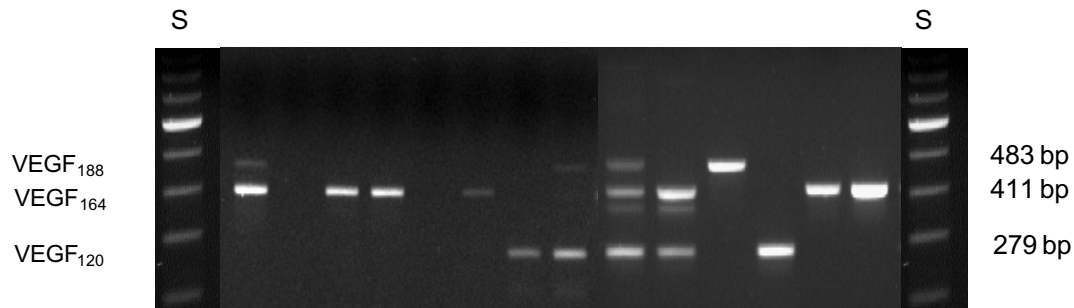


Abbildung 17: cDNA-Banden der VEGF-Isoformen der Maus. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

Es wurden insgesamt 169 Präimplantationsembryonen (40x 8-Zell-Embryonen, 45x Morulae, 42x frühe Blastozysten und 42x späte Blastozysten) durch RT/*nested* PCR auf die mRNA Expression der VEGF-Isoformen untersucht. Der Anteil der Embryonen mit nachweisbarer VEGF_{gesamt}-mRNA stieg, wie bereits unter 3.2 aufgeführt, von 45% im 8-Zell-Embryo auf 94% im *hatching* Blastozysten an. Jedoch konnten nur bei durchschnittlich 60% der Embryonen mit nachweisbarer VEGF_{gesamt}-mRNA (100%) die Isoformen auch einzeln erfasst werden (Abb. 18).

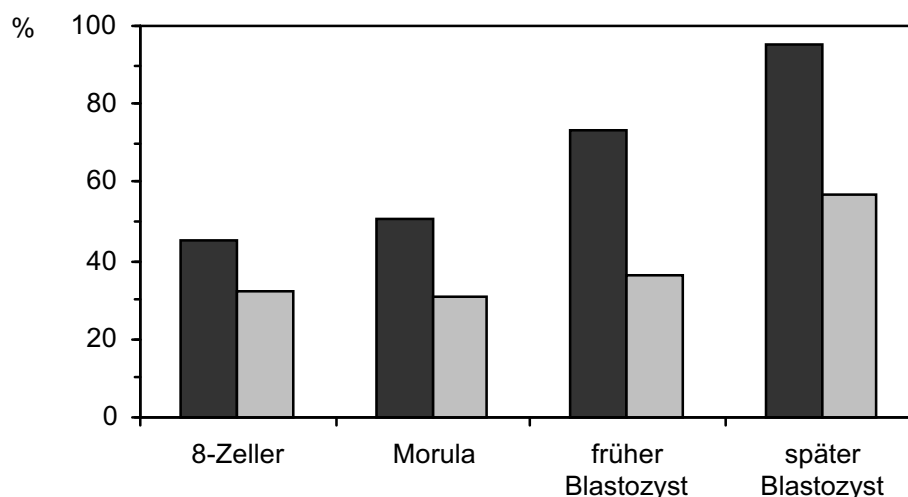


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der Embryonen mit nachweisbarer VEGF_{gesamt} mRNA (■) und mit nachweisbarer mRNA der einzelnen VEGF-Isoformen (□).

In 69% der 8-Zell-Embryonen mit nachweisbarer VEGF_{gesamt}-mRNA konnte die mRNA von VEGF₁₆₄ nachgewiesen werden, in 85% die mRNA von VEGF₁₂₀ und in 31% die mRNA von VEGF₁₈₈. Bei den Morulae war das Verhältnis der nachgewiesenen mRNA's der VEGF-Isoformen ähnlich. VEGF₁₆₄ war mit 86% die am häufigsten nachgewiesene Isoform, gefolgt von VEGF₁₂₀ und VEGF₁₈₈. Bei den frühen Blastozysten hingegen konnte VEGF₁₂₀ am häufigsten nachgewiesen werden (79%), gefolgt von VEGF₁₆₄ (29%) und VEGF₁₈₈ (14%). Bei den *hatching* Blastozysten war wiederum VEGF₁₆₄ mit 75% die am häufigsten nachgewiesene Isoform, gefolgt von VEGF₁₂₀ mit 29% VEGF₁₈₈ mit 25%.

Insgesamt war VEGF₁₆₄ die am häufigsten nachgewiesene Isoform, gefolgt von VEGF₁₂₀ und zuletzt VEGF₁₈₈. Der prozentuale Anteil, der in den Präimplantationsembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien nachgewiesenen VEGF-Isoformen, ist in Abbildung 19 dargestellt.

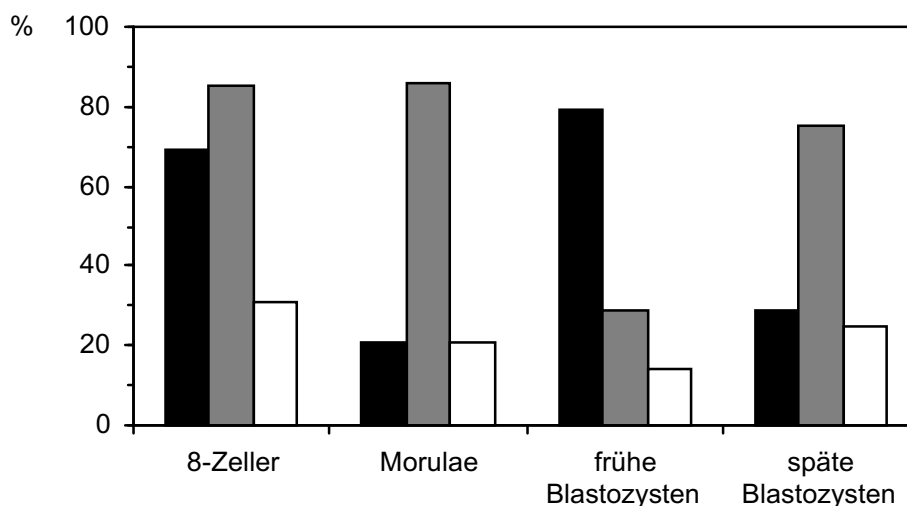


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der Embryonen mit nachweisbarer mRNA der einzelnen VEGF-Isoformen in Abhängigkeit der nachgewiesenen VEGF_{gesamt} mRNA (100%). Dargestellt sind: VEGF₁₂₀ (■), VEGF₁₆₄ (▒) und VEGF₁₈₈ (□).

In allen untersuchten embryonalen Entwicklungsstadien konnten Ko-Expressionen von VEGF-Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 20). Es wurden Ko-Expressionen der beiden kürzeren VEGF-Isoformen VEGF₁₂₀ und VEGF₁₆₄, oder der beiden längeren Isoformen VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈ beobachtet. In keinem der untersuchten Präimplantationsembryonen jedoch konnte die cDNA aller drei VEGF-Isoformen nachgewiesen werden. In vielen Fällen war VEGF₁₆₄ die am stärksten exprimierte Isoform, d.h. die cDNA-Bande des VEGF₁₆₄ war im Vergleich zu den cDNA-Banden der anderen Isoformen oftmals intensiver.

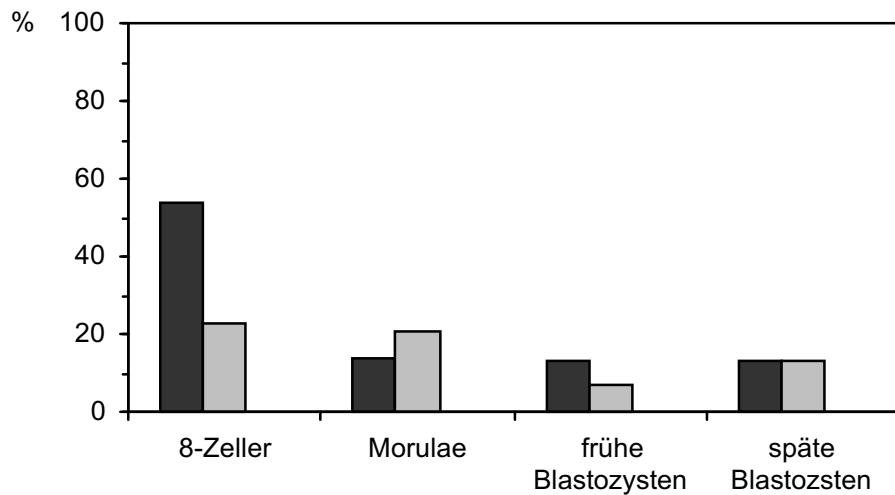


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der Embryonen mit nachgewiesener Ko-Expression von VEGF₁₂₀⁺ VEGF₁₆₄ (■) und von VEGF₁₆₄⁺ VEGF₁₈₈ (▒) in Abhängigkeit der nachgewiesenen VEGF_{gesamt} mRNA.

Das Expressionsmuster der VEGF-Isoformen ist in Abbildung 21 bei jeweils 9x 8-Zell-Embryonen und frühen Blastozysten und bei jeweils 10x Morulae und späten Blastozysten repräsentativ dargestellt.

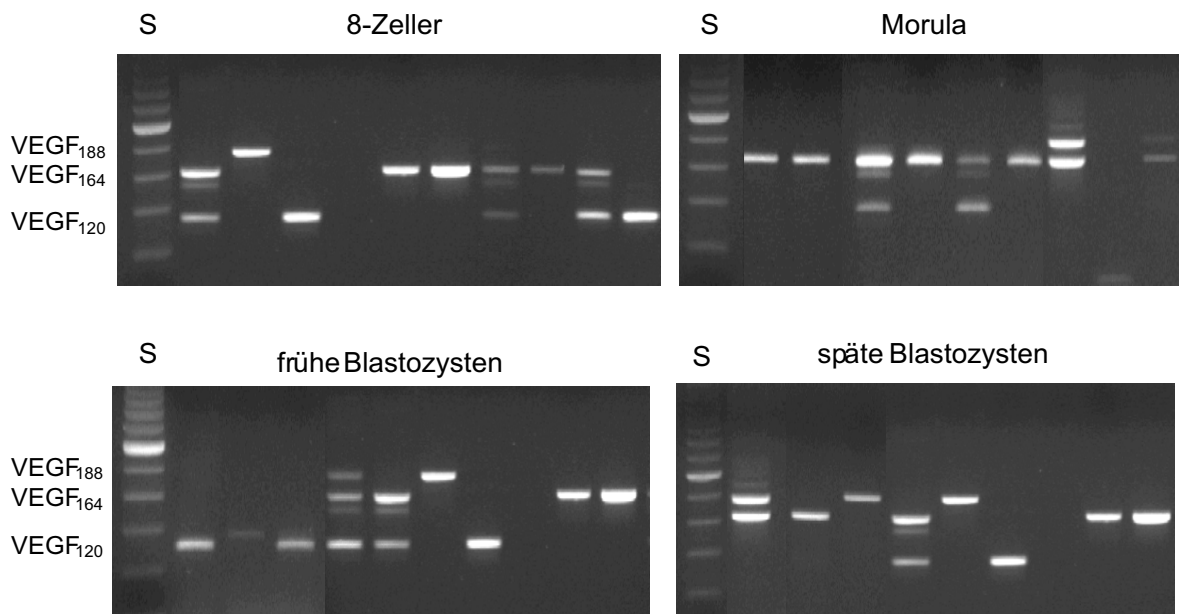


Abbildung 21: Nachweis der mRNA-Expression der VEGF-Isoformen in den untersuchten embryonalen Entwicklungsstadien. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

3.4 Expression des VEGF₁₆₄ spezifischen Rezeptors Neuropilin-1 in Embryonen der Maus

Nachdem in den Präimplantationsembryonen VEGF₁₆₄ die am häufigsten nachgewiesene VEGF-Isoform war, wurde mittels RT/*nested* PCR die mRNA-Expression des VEGF₁₆₄ spezifischen Rezeptors Neuropilin-1 (NP-1) untersucht. Insgesamt wurden 109 Embryonen, davon 19x 8-Zeller, 18x Morulae, und jeweils 36x frühe und *hatching* Blastozysten, analysiert.

Lediglich in 7 der 36 frühen Blastozysten (19%) konnte die NP-1 mRNA nachgewiesen werden. Ein Nachweis von NP-1 in 8-Zell-Embryonen, Morulae oder *hatching* Blastozysten gelang nicht. Abbildung 22 zeigt repräsentativ in 3 von 10 frühen Blastozysten die NP-1 cDNA-Bande bei 465 bp.

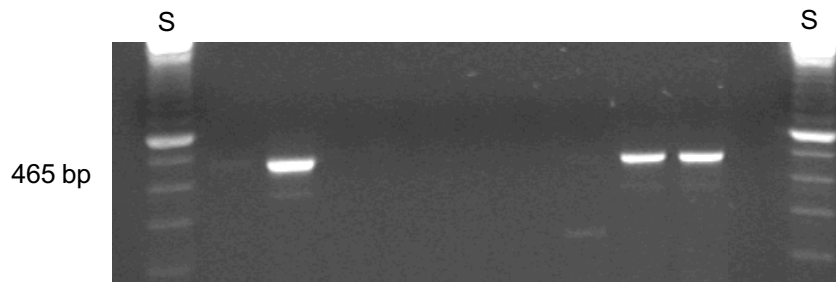


Abbildung 22: Nachweis der NP-1 mRNA in frühen Blastozysten. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

3.5 Ang-1 und Ang-2 Expression in Maus-Präimplantationsembryonen

Insgesamt wurden 122 β -Actin positive Präimplantationsembryonen mittels RT/*nested* PCR auf die mRNA Expression von Ang-1 und Ang-2 untersucht. Die eingesetzten Entwicklungsstadien waren: 32x 8-Zell-Embryonen, 24x Morula, 35x frühe Blastozysten und 31x *hatching* Blastozysten.

In keinem der untersuchten Embryonen konnte die Ang-2 mRNA nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu zeigten 75% der 8-Zell-Embryonen eine Expression der Ang-1 mRNA, ebenso wie 71% der Morulae, 30% der frühen Blastozysten und 48% der *hatching* Blastozysten (Abb. 23).

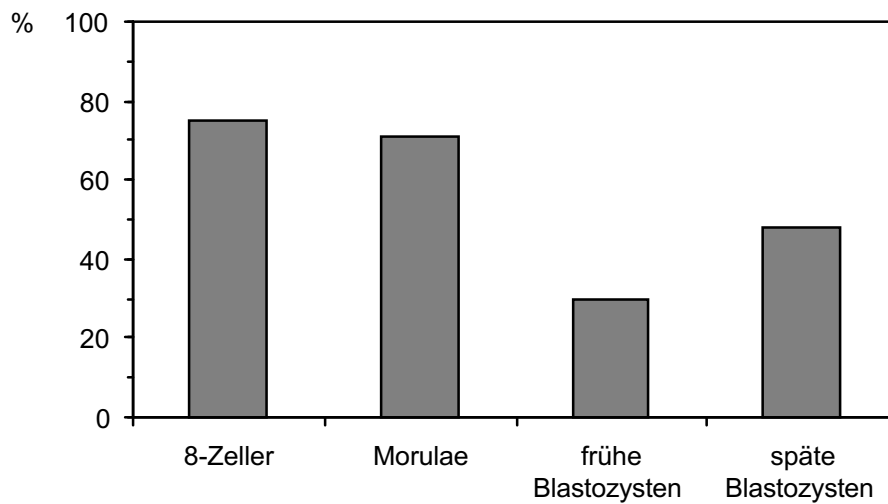


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der Präimplantationsembryonen mit nachweisbarer Ang-1 mRNA-Expression.

Abbildung 24 zeigt repräsentativ für jedes untersuchte Embryonalstadium an jeweils 8 Embryonen die cDNA-Bande von Ang-1 bei 414 bp.

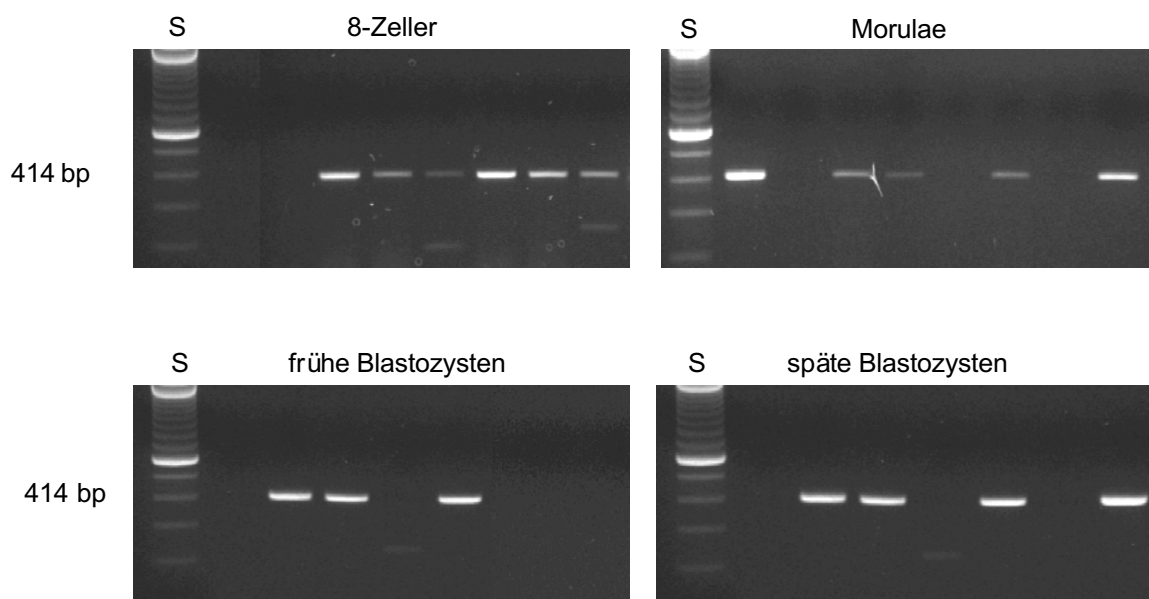


Abbildung 24: Nachweis der Ang-1 mRNA in Präimplantationsembryonen der Maus. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

3.6 Expression des VEGF-Systems und der Angiopoietine in Zygoten der Maus

Insgesamt 15 Ansätze mit jeweils 2 Zygoten pro Ansatz wurden mittels RT/*nested* PCR auf die mRNA-Expression von Komponenten der VEGF-Familie, Neuropilin-1 und der Angiopoietine untersucht.

Zunächst wurde durch Amplifikation des *housekeeping*-Gens β -Actin der Erfolg der reversen Transkription kontrolliert. In 13 von 15 RT-Ansätzen konnte die cDNA von β -Actin nachgewiesen werden (87%). Bei diesen Ansätzen wurde die reverse Transkription als erfolgreich betrachtet und die cDNA für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Durch RT/*nested* PCR konnte in Zygoten der Maus die mRNA von VEGF, VEGFR-2 und Ang-1 nachgewiesen werden. Ein Nachweis der mRNA von VEGFR-1, dem Antagonisten sFlt, NP-1 und Ang-2 gelang dagegen nicht (Tabelle 13).

mRNA	Nachweis [positiv (+); negativ (-)]
VEGF	+
VEGFR-1	-
VEGFR-2	+
sFlt	-
NP-1	-
Ang-1	+
Ang-2	-

Tabelle 13: In Zygoten der Maus nachgewiesene mRNA's.

Da bei der Maus die embryonale mRNA-Synthese erst mit der Aktivierung des embryonalen Genoms im 2- bis 4-Zell-Stadium der Präimplantationsentwicklung einsetzt, müssen die in den Zygoten nachgewiesene mRNA's maternalen Ursprungs sein.

In Abbildung 25 sind die cDNA-Banden der β -Actin-Kontrolle bei 409 bp und die Banden von VEGF bei 188 bp, von VEGFR-2 bei 398 bp und von Ang-1 bei 414 bp repräsentativ an 9 der 13 RT-Ansätzen dargestellt.

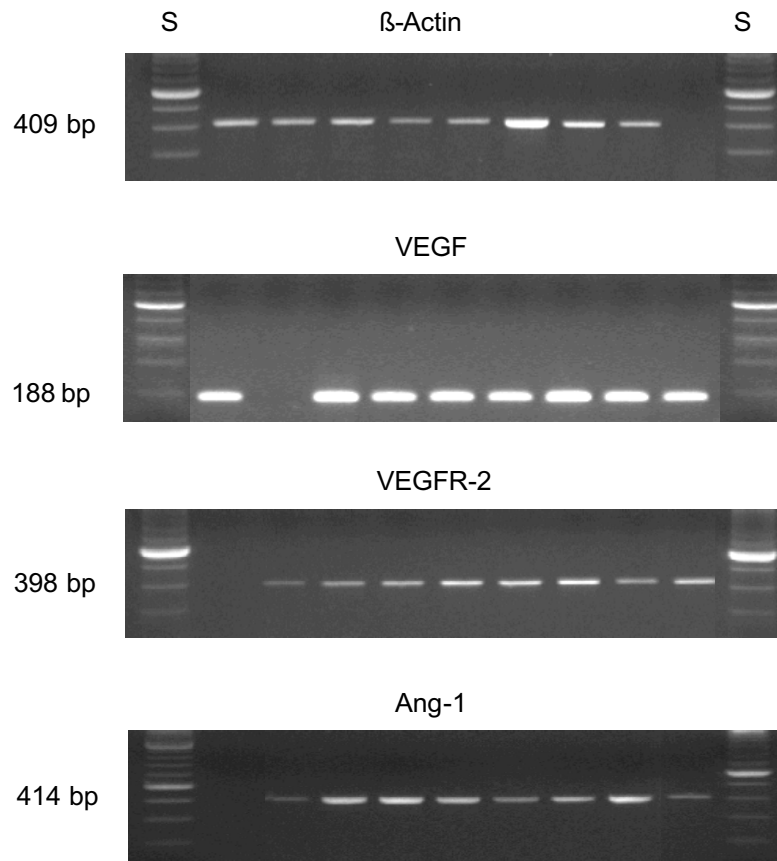


Abbildung 25: Nachweis von VEGF, VEGFR-2 und Ang-1 sowie die β -Actin-Kontrolle in Zygoten der Maus. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA-Standard.

3.7 VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 Protein-Expression im System Embryo-Endometrium der Maus

Blastozysten wurden gepoolt (je 30 Stück) an Tag 3.5 der Schwangerschaft in Maus-Uteri desselben Schwangerschaftstages transferiert. Die Uteri wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Schließlich wurden durch immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte die Komponenten der VEGF-Familie im Maus-Uterus und in den darin enthaltenen Embryonen lokalisiert.

Abbildung 26 zeigt Paraffinschnitte, bei denen das VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 Protein mittels Avidin-Biotin-Peroxidase Methode nachgewiesen wurde. Als Substrat wurde Diaminobenzidin eingesetzt, das eine braune Färbung ergibt. Die Zellkerne wurden mit Meyers Hämalaun-Lösung blau gegen gefärbt. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte anstatt mit dem Primärantikörper, mit normalem IgG inkubiert.

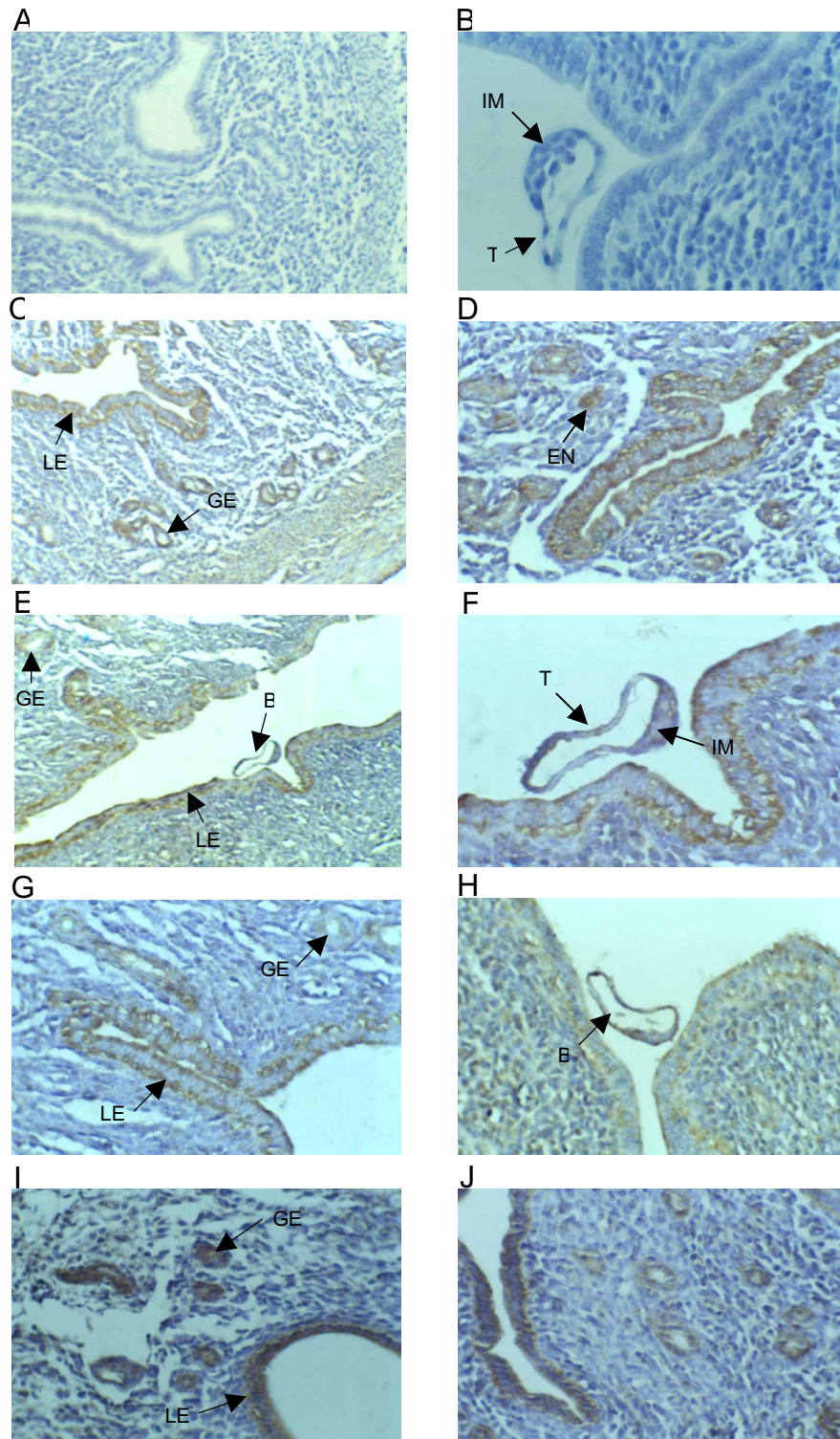


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 Proteine an longitudinalen Paraffinschnitten von Maus-Uteri. In der Abbildung dargestellt: Negativkontrolle mit normalem IgG (A und B), VEGF (C bis F), VEGFR-1 (G und H) und VEGFR-2 (I und J). Folgende Bezeichnungen wurden verwendet: LE (luminales Epithel), GE (glanduläres Epithel), S (Stroma), EN (Endothel), B (Blastozyste), T (Trophektoderm) und IM (innere Zellmasse). Die Auflösungen der Abbildungen sind wie folgt: 125x (A, C und E), 250x (D, G, H, I und J) und 400x (B und F).

Obwohl jeweils 30 *hatching* Blastozysten in ein Uterushorn transferiert wurden, waren in den wenigsten Gewebeschnitten Embryonen zu finden. Dennoch gelang die Lokalisierung von VEGF und VEGFR-1 in, im Uterus enthaltenen, Blastozysten. Die Lokalisierung des VEGFR-2 im Präimplantationsembryo gelang dagegen nicht.

In der Abbildung 26 A und B ist die Negativkontrolle dargestellt. Die Gewebeschnitte sind dort bis auf die blaue Kern-Gegenfärbung völlig ungefärbt.

Die immunhistochemische Lokalisierung von VEGF ist auf der Abbildung 26 C bis F zu sehen. Wie bereits schon von anderen Autoren berichtet (Chakraborty et al., 1995) fand sich das VEGF-Protein im Zytoplasma des luminalen und des glandulären Epithels. Die Stromazellen hingegen wiesen kein VEGF-Protein auf. In der Abbildung 26 E und F ist, eingebettet im Lumen des Uterus, jeweils eine Blastozyste zu sehen. Die Färbung des VEGF Proteins ist dort nur sehr schwach zu erkennen und findet sich sowohl im Trophektoderm als auch in der inneren Zellmasse der Blastozyste.

In der Abbildung 26 G bis J ist die immunhistochemische Lokalisierung der VEGF-Rezeptoren zu sehen. Der VEGFR-2 findet sich, ähnlich wie VEGF, lediglich im luminalen und im glandulären Epithel des Maus-Uterus (Abb. 26 I und J). Zusätzlich dazu konnte der VEGFR-1 auch sehr schwach im endometriellen Stroma lokalisiert werden, ebenso wie in der, in das Uteruslumen eingebetteten, Blastozyste (Abb. 26 G und H). Allerdings ist von der Blastozyste hauptsächlich das Trophektoderm zu sehen und nur sehr wenig die innere Zellmasse. Jedoch scheint, dass beide Anteile der Blastozyste das VEGFR-1 Protein aufweisen.

3.8 VEGF-Protein im Kulturmedium von Maus-Embryonen

Um nachzuweisen, ob Präimplantationsembryonen das VEGF-Protein sezernieren, wurde ein ELISA-Test an Embryokulturmedium durchgeführt. Dazu wurden insgesamt 32x jeweils 10 Zygoten zunächst in einem 30 µl Tropfen G1.2-Medium (Vitrolife, Göteborg, Schweden) bis zum Stadium der Morula kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Morulae in einen 30 µl Tropfen G2.2-Medium (Vitrolife, Göteborg, Schweden) transferiert und darin bis zum Stadium der *hatching* Blastozyste kultiviert. Jeweils 2 Tropfen der G1.2 bzw. G2.2 Medien wurden vereint (60 µl) und anschließend mittels eines *enzyme linked immunoabsorbant* Assays (Quantikine® M, Mouse VEGF ELISA, R&D Systems) auf den Gehalt an VEGF-Protein untersucht.

In den insgesamt untersuchten 16 Proben G1.2 und 16 Proben G2.2-Medium (je 60 µl) ließ sich jedoch kein VEGF-Protein nachweisen. Möglicherweise liegt der VEGF-Proteinspiegel unterhalb des Detektionslimits des verwendeten Assays von < 3pg/ml.

3.9 Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors Tie-2 im zyklischen Endometrium

3.9.1 Nachweis von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 im Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen durch kompetitive PCR

Es wurden Endometriumbiopsien von 30 Patientinnen auf die mRNA-Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 untersucht. Die Biopsien wurden mittels histologischer Beurteilung und anhand der Zyklusanamnese in die Gruppen frühe Proliferationsphase (FP, n = 4), mittlere Proliferationsphase (MP, n = 12), späte Proliferationsphase (SP, n = 3), frühe Sekretionsphase (FS, n = 3), mittlere Sekretionsphase (MS, n = 5) und späte Sekretionsphase (SS, n = 3) eingeteilt, die RNA extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde das *housekeeping*-Gen β -Actin amplifiziert und nur die β -Actin positiven cDNA's wurden in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. In Abbildung 27a ist die β -Actin Kontrolle mit der cDNA-Bande bei 798 bp dargestellt.

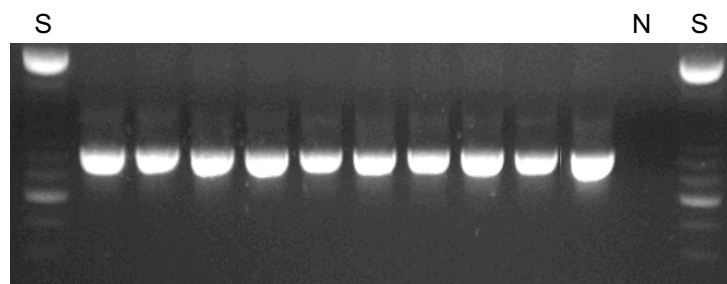


Abbildung 27a: β -Actin-Kontrolle der revers transkribierten RNA's aus Endometriumbiopsien. Von links nach rechts dargestellt: Zyklustag 4, 5, 7, 8, 11, 15, 18, 21, 24 und 27. 2%iges Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid, S:100 bp DNA-Standard, N: Negativkontrolle.

Mittels einer modifizierten, kompetitiven PCR wurde die mRNA-Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 in den Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklusphasen untersucht. Bei dieser Methode wird dem PCR-Ansatz eine definierte Menge eines kompetitiven

cDNA-Fragments (Kompetitor) zugesetzt. Die Sequenz des Kompetitors entspricht bis auf eine kurze Deletion der Sequenz der nativen cDNA (Target). Der Kompetitor enthält somit die gleichen Primer-Bindungsstellen wie das Target (siehe Abb. 9). Nach der cDNA-Amplifikation kann das kompetitive Fragment aufgrund der Größe von dem target Fragment unterschieden werden kann. Aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten von Target und Kompetitor-Bande lässt sich dann semiquantitativ der cDNA-Gehalt und damit im Rückschluss auch der spezifische mRNA-Gehalt der jeweiligen Endometriumbiopsie bestimmen.

Die mRNA's von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 konnten so in jeder untersuchten Endometriumbiopsie nachgewiesen werden. Abbildung 27b zeigt repräsentativ die PCR-Produkte von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 nach kompetitiver PCR. Zu sehen sind die Ang-1 Target-Bande bei 444 bp, die Ang-1 Kompetitor-Bande bei 240 bp, die Target und Kompetitor-Banden von Ang-2 bei 754 bp bzw. 364 bp, sowie die Target-cDNA von Tie-2 bei 395 bp und die Tie-2 Kompetitor-cDNA bei 320 bp.

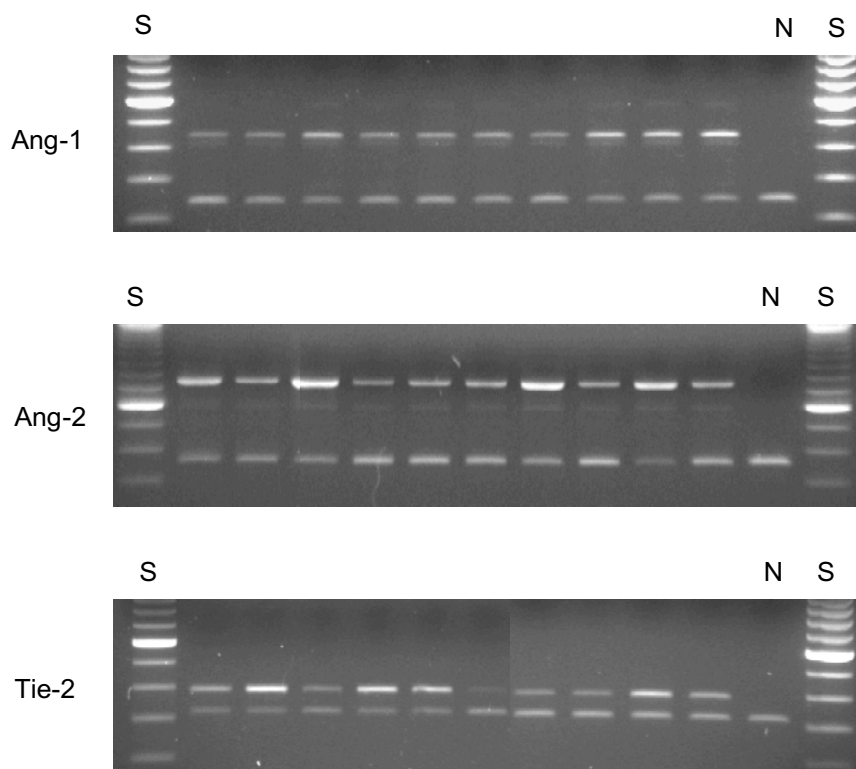


Abbildung 27b: Produkte der kompetitiven PCR zum Nachweis von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 in Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklusphasen. Von links nach rechts dargestellt: Zyklustag 4, 5, 7, 8, 11, 15, 18, 21, 24 und 27. 2%iges Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S:100 bp DNA-Standard, N: Negativkontrolle.

Wie sich durch Zugabe der jeweils gleichen Menge an Kompetitor (0,02 amol) bei der PCR herausstellte, ist der Gehalt an Ang-1 und Ang-2 mRNA in menschlichem Endometrium vergleichbar. Im Vergleich dazu wurden bei der Tie-2 kompetitiven PCR 0,04 amol Kompetitor eingesetzt. Der mRNA-Gehalt des Rezeptors Tie-2 beträgt in menschlichem Endometrium also in etwa das Doppelte des mRNA-Gehalts der Angiopoietine.

Jede der 30 Biopsieproben wurde insgesamt 3 Mal mittels kompetitiver PCR auf die Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 untersucht. Aus dem Mittelwert der Target/Kompetitor Verhältnisse ergab sich eine signifikante, zyklische Schwankung der Ang-1 Expression (Abb. 28 und 29). Die Ang-1 mRNA ist in der frühen, mittleren und späten Sekretionsphase sowie in der mittleren Proliferationsphase 3 bis 4 Mal stärker nachweisbar, als in der späten Proliferationsphase (mittlere Proliferationsphase vs. späte Proliferationsphase, $p=0,043$; späte Proliferationsphase vs. mittlere und späte Sekretionsphase, $p=0,034$; späte Proliferationsphase vs. frühe Sekretionsphase, $p=0,048$; Mann-Whitney U-Test). Insgesamt ergab sich dadurch eine signifikant höhere Ang-1 Expression in der Sekretionsphase im Vergleich zur Proliferationsphase ($p=0,027$, Mann-Whitney U-Test) (Abb. 28). Jedoch konnten auch zwischen Biopsien der gleichen Zyklusphase starke individuelle Unterschiede in der Ang-1 mRNA Expression festgestellt werden.

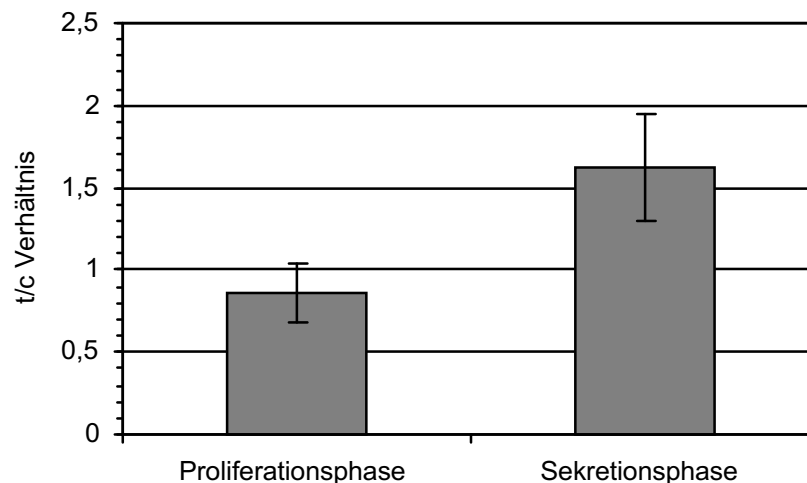


Abbildung 28: Ang-1 mRNA-Expression, dargestellt als Target/Kompetitor Verhältnis (t/c), weist einen signifikanten Unterschied zwischen der Proliferationsphase und der Sekretionsphase auf ($p=0,027$, Mann-Whitney U-Test).

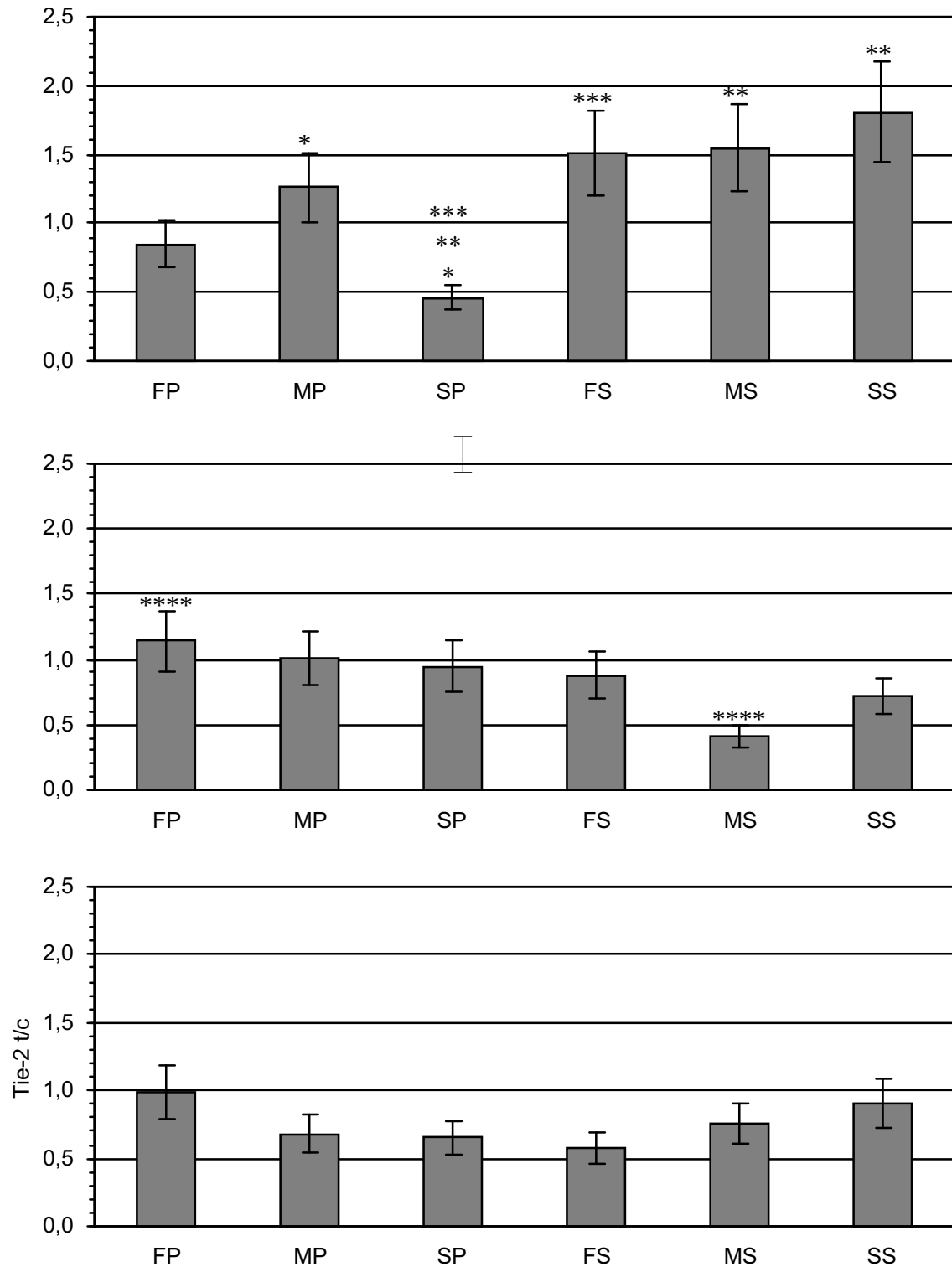


Abbildung 29: mRNA-Expression von Ang-1 (oben), Ang-2 (Mitte) und Tie-2 (unten) im menschlichen Endometrium im Verlauf des Menstruationszyklus als Mittelwert $\pm$ SD. FP: frühe, MP: mittlere und SP: späte Proliferationsphase; FS: frühe, MS: mittlere und SS: späte Sekretionsphase, t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität. * $P=0.043$, ** $P=0.034$, *** $P=0.048$, **** $P=0.034$, Mann-Whitney U-Test.

Bei Ang-2 wurden dagegen geringere, zyklische Schwankungen in der mRNA Expression beobachtet (Abb. 29). Der höchste Gehalt an Ang-2 mRNA konnte in der frühen Proliferationsphase, kurz nach der Menstruationsblutung, nachgewiesen werden. Der niedrigste Gehalt an Ang-2-mRNA fand sich in der mittleren Sekretionsphase. Dieser war im Vergleich zum mRNA-Gehalt in der frühen Proliferationsphase statistisch signifikant geringer (frühe Proliferationsphase vs. mittlere Sekretionsphase, $p=0.034$, Mann-Whitney U-Test).

Die mRNA des Rezeptors Tie-2 war mit nahezu konstantem Spiegel während des gesamten Zyklus nachweisbar (Abb. 29). Wie bei der mRNA-Expression von Ang-1 konnten auch bei der Expression von Ang-2 und Tie-2 starke, individuelle Unterschiede zwischen Biopsien der gleichen Zyklusphase beobachtet werden.

3.9.2 Untersuchung der Ang-1 und Ang-2 mRNA-Expression in menschlichem Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen durch Multiplex-PCR

Die mRNA-Expression von Ang-1 und Ang-2 im Endometrium im Verlauf des Menstruationszyklus wurde zusätzlich zu der kompetitiven PCR durch eine Multiplex-PCR untersucht und die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander verglichen.

Für die Multiplex-PCR wurden die aus Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen (frühe [FP, $n = 4$], mittlere [MP, $n = 12$] und späte Proliferationsphase [SP, $n = 3$] sowie frühe [FS, $n = 3$], mittlere [MS, $n = 5$] und späte Sekretionsphase [SS, $n = 3$]) gewonnen cDNA's in einem PCR-Ansatz mit den gleichen Mengen an Ang-1 und Ang-2 Primern amplifiziert. Die zyklischen Schwankungen in der mRNA-Expression der Angiopoietine spiegeln sich dann in dem Verhältnis der Bandenintensitäten von Ang-2 zu Ang-1 wieder.

Das Verhältnis der Bandenintensitäten der Multiplex-PCR (Ang2/Ang-1-Bandenintensität) wurde mit dem Verhältnis der Bandenintensitäten von Ang-2 zu Ang-1 nach kompetitiver PCR verglichen. Dazu wurde das Ang-2/Ang-1 Verhältnis für jede untersuchte Biopsieprobe aus den Target/Kompetitor-Mittelwerten von Ang-2 und Ang-1 (siehe 3.9.1) berechnet. Der Vergleich ergab, dass die relativen Verhältnisse der Bandenintensitäten der Multiplex-PCR mit den berechneten Verhältnissen der Intensitäten von Ang-2 zu Ang-1 Banden nach kompetitiver PCR vergleichbar sind (Abb. 30).

Beide Methoden ergaben, dass das relative Verhältnis der Bandenintensitäten der Angiopoietine (Ang-2/ Ang-1) in der frühen Sekretionsphase im Vergleich zur späten Proliferationsphase statistisch signifikant erniedrigt ist (Multiplex-PCR, $p= 0,034$;

kompetitive PCR, $p = 0,028$; Mann-Whitney U-Test). Insgesamt war das Ang-2/ Ang-1 Verhältnis in der Sekretionsphase geringer als in der Proliferationsphase. Dies lässt entweder auf eine geringere Ang-2 Expression in dieser Phase des Menstruationszyklus, oder wie schon unter 3.9.1 aufgeführt, auf eine erhöhte Ang-1 Expression in der Sekretionsphase schließen (Abb. 30).

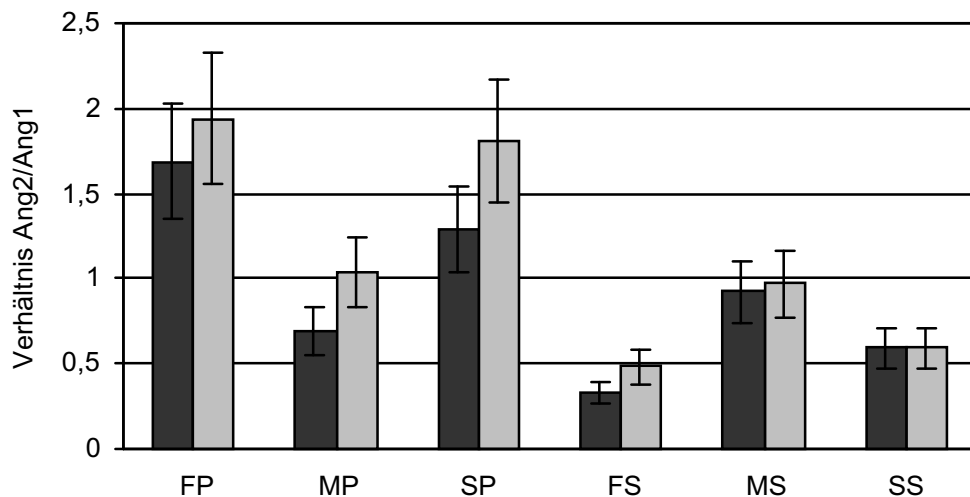


Abbildung 30: Relatives Verhältnis der Bandenintensitäten der Angiopoietin Expression nach Multiplex PCR (■) im Vergleich zur kompetitiven PCR (□). Dargestellt sind frühe (FP), mittlere (MP) und späte (SP) Proliferationsphase, sowie frühe (FS), mittlere (MS) und späte (SS) Sekretionsphase.

Abbildung 31 illustriert repräsentativ die Produkte der Multiplex-PCR von Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklusphasen mit der Ang-1 Bande bei 444 bp und der Ang-2 Bande bei 754 bp.

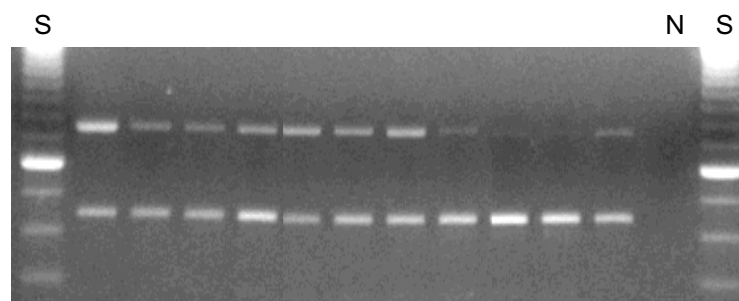


Abbildung 31: Ang-1/Ang-2 Multiplex-PCR von Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklustage (von links nach rechts 4, 5, 7, 8, 11, 13, 15, 18, 21, 24 and 27). 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA -Standard, N: Negativkontrolle.

3.9.3 Ang-1 und Ang-2 Expression in endometrialen Epithel- und Stromazellen

Bei sechs zusätzlichen Endometriumbiopsien wurde die mRNA-Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors in der epithelialen Zellpopulation und in den Stromazellen des Gewebes getrennt voneinander untersucht. Dazu wurden die Epithelzellen und die Stromazellen durch einen Collagenase-Verdau aus dem Gewebe isoliert, die RNA extrahiert und mittels RT/kompetitiver PCR die mRNA-Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors in den Zellpopulationen untersucht. Zur Kontrolle der Reinheit der extrahierten Zellpopulationen wurde eine immunhistochemische Färbung des Epithelzell-spezifischen Proteins Zytokeratin durchgeführt. Dazu wurden die Epithel- und die Stromazellen direkt im Anschluss an die Extraktion aus dem nativen Gewebe auf Zellkultur-Objektträgern ausplattiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die immunhistochemische Färbung mit Zytokeratin durchgeführt (Abb. 32).

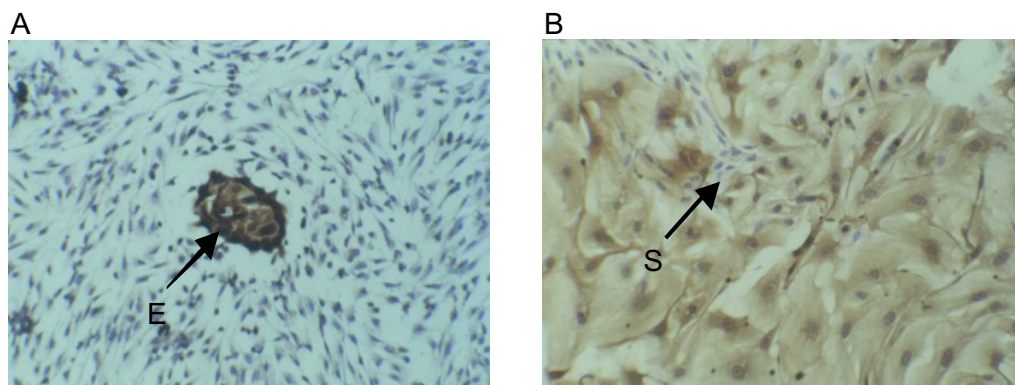


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin bei den Stromazellen (A) und bei der epithelialen Zellpopulation (B). Die mikroskopische Auflösung beträgt 125x. Verunreinigungen durch: E (Epithel), S (Stroma).

Wie man in Abbildung 32 A erkennen kann, waren die aus Endometrium extrahierten Stromazellen nur sehr gering mit Epithelzellen (E) verunreinigt. Auch die extrahierte epitheliale Zellpopulation (Abb. 32 B) war nahezu frei von verunreinigenden Stromazellen (S). Die Reinheit beider Zellpopulationen betrug 94- 98%.

Durch RT/kompetitive PCR konnten sowohl in den Stromazellen als auch in den Epithelzellen die mRNA's von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 nachgewiesen werden. Der mRNA Gehalt der Angiopoietine war in beiden Zellpopulationen vergleichbar. Bei den kompetitiven PCR-Ansätzen zum Nachweis von Ang-1 und Ang-2 mussten jeweils 0,02 amol Kompetitor zugefügt werden. Auch der Gehalt an Tie-2 mRNA in den Stromazellen und in den Epithelzellen war vergleichbar. Im Gegensatz zu dem mRNA-Gehalt der

Angiopoietine betrug der Gehalt an Tie-2 mRNA in beiden Zellpopulationen jedoch etwa das Doppelte. Bei der kompetitiven PCR zum Nachweis von Tie-2 wurde im Unterschied zu 0,02 amol bei Ang-1 bzw. Ang-2 eine Menge von 0,04 amol Kompetitor eingesetzt.

Die Untersuchung der Target/Kompetitor Verhältnisse ergab, dass Ang-1, Ang-2 und Tie-2 in beiden Zellpopulationen annähernd gleich stark exprimiert werden (Abb. 33).

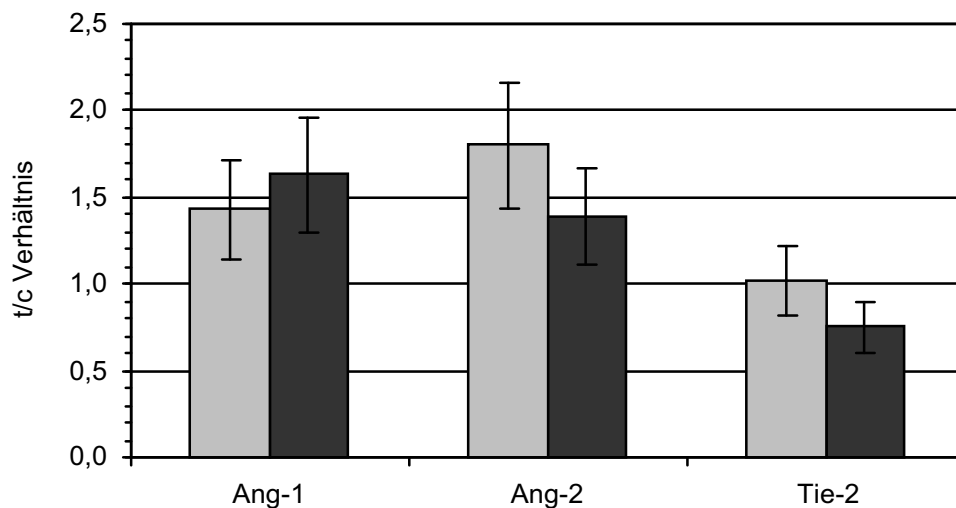


Abbildung 33: Ang-1, Ang-2 and Tie-2 mRNA-Expression in Stroma- (□) und in Epithelzellen (■) menschlichen Endometriums unabhängig von der Zyklusphase. Dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Die geringen Expressionsunterschiede bei den Angiopoietinen und ihrem Rezeptor zwischen Stroma- und Epithelzellen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.10 Protein-Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 im zyklischen Endometrium

Bei insgesamt 18 Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklusphasen wurden die Proteine von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 lokalisiert. Durch histologische Beurteilung und anhand der Zyklusanamnese wurden die Biopsien der Proliferationsphase (Zyklustag 4 bis 14, n= 11) und der Sekretionsphase (Zyklustag 15 bis 27, n= 7) zugeordnet. Die Lokalisierung der Proteine erfolgte mittels einer immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten der Endometriumbiopsien. Als Negativkontrolle der Immunhistochemie wurden die Paraffinschnitte statt mit dem jeweiligen Primärantikörper mit normalem IgG inkubiert. Als weitere Kontrolle der Spezifität der Färbung wurde bei einigen Gewebeschnitten der Endothelzell-spezifische von Willebrandt Faktor (vWF) nachgewiesen.

In Abbildung 34 ist repräsentativ für die Negativkontrolle mit normalem IgG und für die Kontrolle mit dem Endothelzell-spezifischen vWF jeweils ein Gewebeschnitt von Endometrium der Proliferationsphase und der Sekretionsphase dargestellt.

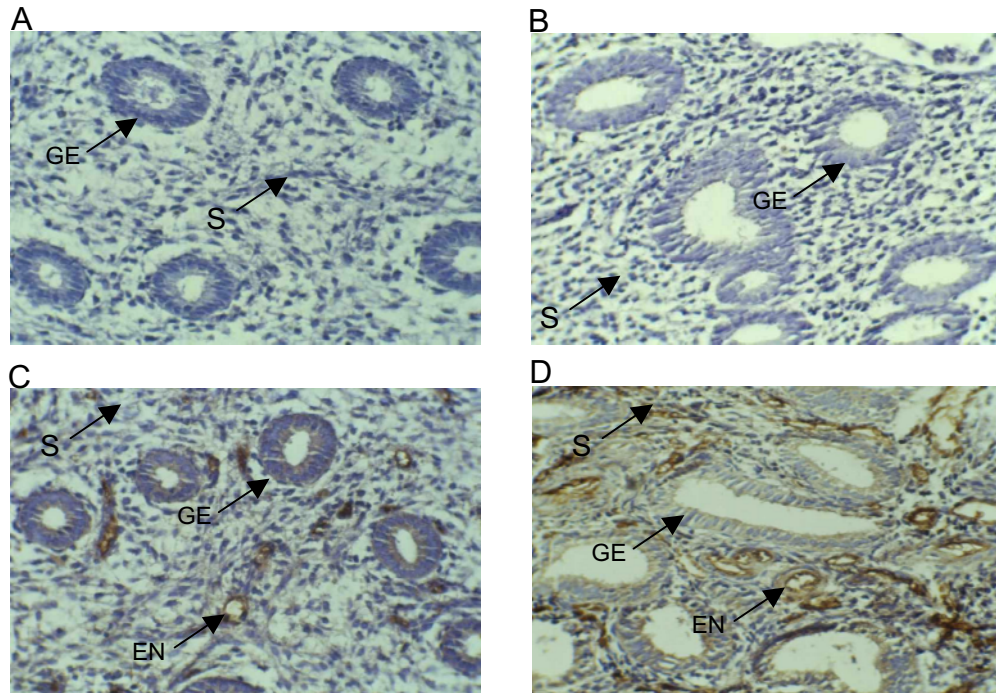


Abbildung 34: Kontrolle der immunhistochemischen Färbungen mit normalem IgG (A und B) und mit vWF (C und D). Dargestellt sind Schnitte von Endometrium der Proliferationsphase (A und C) und der Sekretionsphase (B und D). Folgende Bezeichnungen wurden verwendet: glanduläres Epithel (GE), Stroma (S) und Endothel (EN). Die mikroskopische Auflösung beträgt 250x.

Die Kontrolle der Immunhistochemie mit normalem IgG (Abb. 34 A und B) war negativ. Außer der blauen Kern-Gegenfärbung war keine weitere unspezifische Färbung zu sehen. Auch die Färbung mit dem Endothelzell-spezifischen *von Willebrandt* Faktor (Abb. 34 C und D) war spezifisch. Hier war lediglich eine Färbung der Endothelzellen (EN) zu sehen. Die Stromazellen und das Drüsenepithel waren bis auf die blaue Kerngegenfärbung gänzlich ungefärbt.

Die immunhistochemische Lokalisierung der Angiopoietine und ihres Rezeptors ist in Abbildung 35 repräsentativ an Gewebeschnitten der Proliferationsphase und der Sekretionsphase dargestellt.

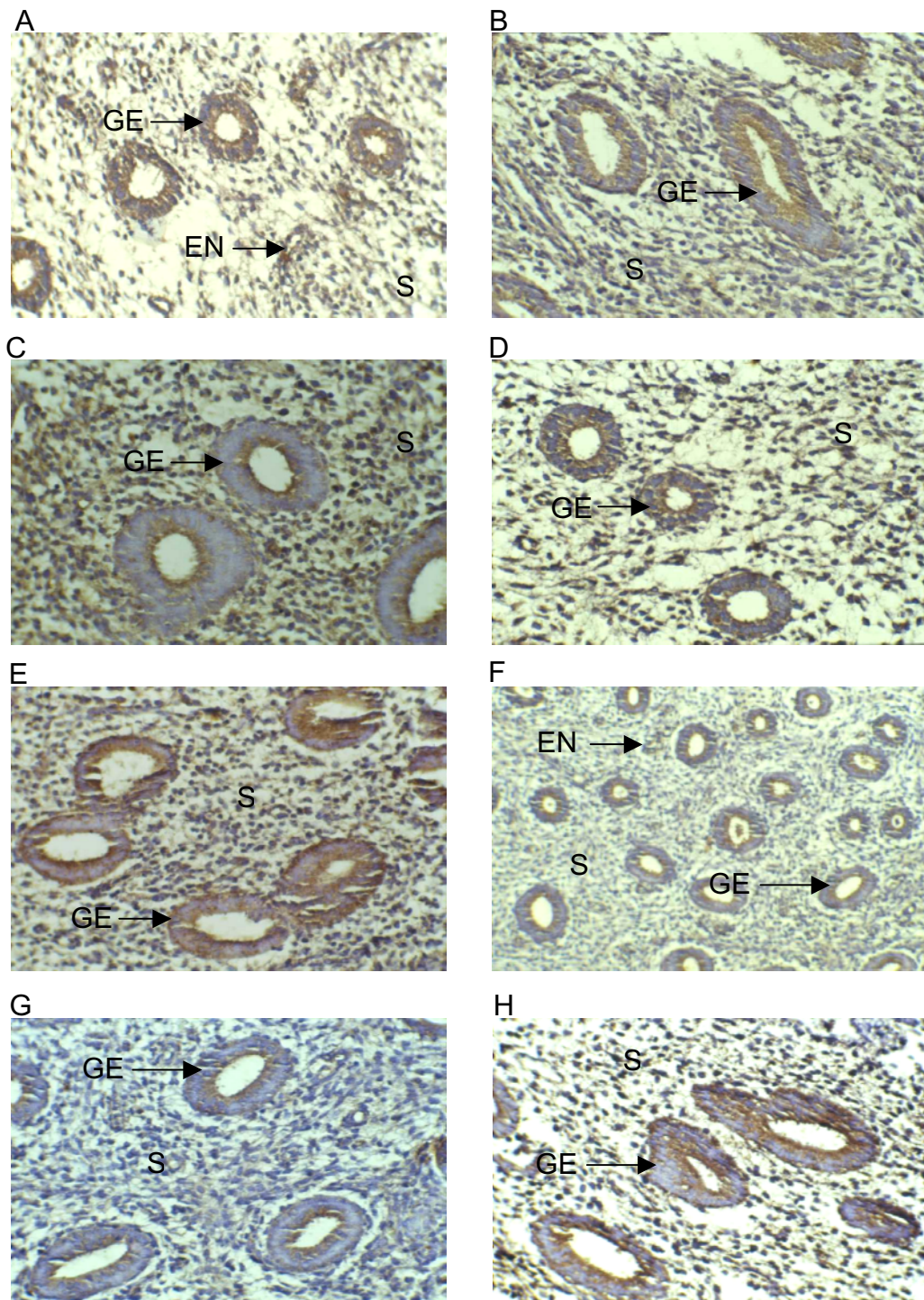


Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung der Proteine von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 an Paraffinschnitten von menschlichem Endometrium der Proliferationsphase (rechte Spalte) und der Sekretionsphase (linke Spalte). In der Abbildung dargestellt: Ang-1 (A, B und C), Ang-2 (D und E) und Tie-2 (F, G und H). Folgende Bezeichnungen wurden verwendet: GE (glanduläres Epithel), S (Stroma), EN (Endothel). Die Auflösungen der Abbildungen sind wie folgt: 125x (A und F), 250x (B, C, D, E, G und H).

Eine Färbung des Ang-1 Proteins konnte im Endometrium der Proliferationsphase (Abb. 35 A und B) hauptsächlich im glandulären Epithel, sowie in den Endothelzellen der Blutgefäße beobachtet werden. Eine sehr schwache Färbung fand sich jedoch auch in den Stromazellen, vor allem in den die Blutgefäße umgebenden Zellen. Im Endometrium der Sekretionsphase (Abb. 35 C) konnte das Ang-1 Protein ebenfalls im glandulären Epithel und in den Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Intensität der Färbungen war vergleichbar mit der im proliferativen Endometrium. Die Ang-1 Färbung der Stromazellen war dagegen im Endometrium der Sekretionsphase wesentlich stärker als im Endometrium der Proliferationsphase und konzentrierte sich nicht mehr nur auf das die Gefäße umgebende Stroma.

Das Ang-2 Protein konnte im Endometrium der Proliferationsphase (Abb. 35 D) verstärkt im Drüsenepithel und schwach in den Endothelzellen nachgewiesen werden. Es konnte dort jedoch keine Ang-2 Färbung der Stromazellen beobachtet werden. Im Endometrium der Sekretionsphase (Abb. 35 E) nahm die Färbung des Ang-2 Proteins allgemein zu. Im Gegensatz zum Endometrium der Proliferationsphase konnte in dieser Phase des Zyklus auch eine Färbung der Stromazellen beobachtet werden.

Eine immunhistochemische Färbung des Rezeptors Tie-2 konnte im Endometrium der Proliferationsphase sowie der Sekretionsphase fast ausschließlich im glandulären Epithel und in den Endothelzellen beobachtet werden (Abb. 35 F, G und H). Im Epithel konzentrierte die Färbung sich auf der apikalen Seite der Zellen. Während im Endometrium der Proliferationsphase die Stromazellen keine Tie-2 Färbung zeigten (Abb. 35 F und G), konnte in der Sekretionsphase eine leichte Färbung des Stromas beobachtet werden (Abb. 35 H).

3.11 Endometriale Neuropilin-1 Expression im Verlauf des Menstruationszyklus

Es wurden Endometriumbiopsien von 30 Patientinnen mittels RT/kompetitiver PCR auf die mRNA-Expression des VEGF₁₆₄ spezifischen Rezeptors Neuropilin-1 (NP-1) untersucht. Die Biopsien waren zuvor mittels histologischer Beurteilung und anhand der Zyklusanamnese in folgende Gruppen eingeteilt worden: frühe Proliferationsphase (FP, n = 4), mittlere Proliferationsphase (MP, n = 12), späte Proliferationsphase (SP, n = 3), frühe Sekretionsphase (FS, n = 3), mittlere Sekretionsphase (MS, n = 5) und späte Sekretionsphase (SS, n = 3). Wie unter 3.9.1 beschrieben, wurden nur die cDNA's der β -Actin positiven Endometriumbiopsien in die Untersuchung mit einbezogen.

Die NP-1 mRNA konnte in allen Endometriumbiopsien nachgewiesen werden. Abbildung 36 illustriert repräsentativ für 10 Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklustage die mRNA-Expression von Neuropilin-1.

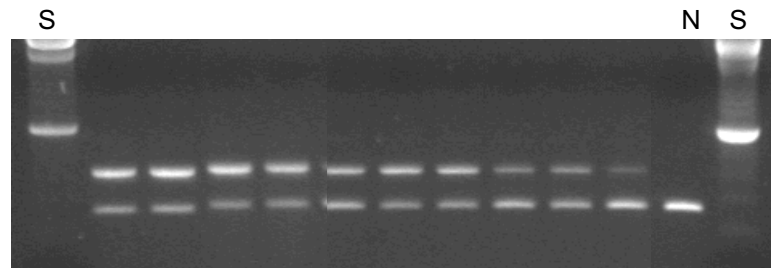


Abbildung 36: mRNA-Expression von Neuropilin-1 in Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklusphasen (von links nach rechts 5, 7, 8, 11, 13, 15, 18, 21, 24 and 27). 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. S: 100 bp DNA -Standard, N: Negativkontrolle.

Durch Zugabe von 0,1 amol Kompetitor bei der kompetitiven PCR konnte der spezifische NP-1 mRNA-Gehalt der Endometriumbiopsien semiquantitativ bestimmt werden. Aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten von Target und Kompetitor ergab sich eine signifikante zyklische Schwankung der NP-1 mRNA-Expression im Verlauf des Menstruationszyklus (Abb. 37). Die NP-1 mRNA war in der späten Proliferationsphase etwa 3 Mal stärker nachweisbar als in der späten Sekretionsphase ($p=0.041$, Mann-Whitney U-Test).

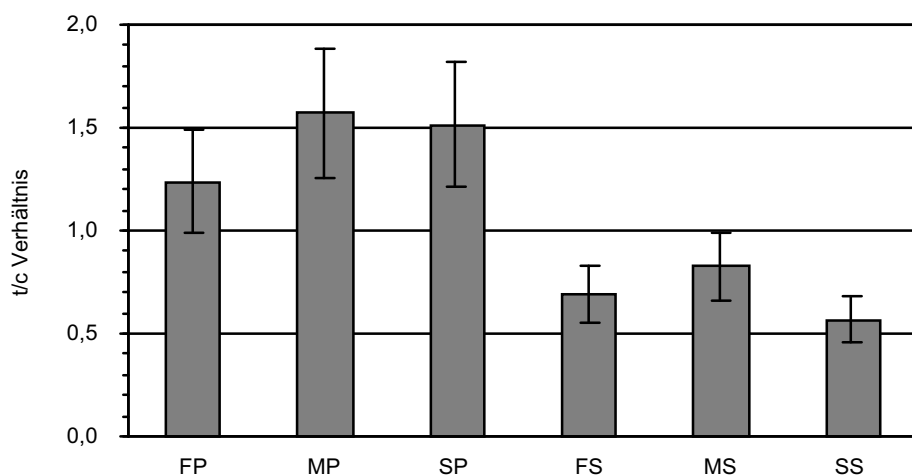


Abbildung 37: mRNA-Expression von Neuropilin-1 in menschlichem Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen als Mittelwert $\pm$ SD. FP: frühe, MP: mittlere und SP: späte Proliferationsphase; FS: frühe, MS: mittlere und SS: späte Sekretionsphase, t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Insgesamt konnte eine stärkere NP-1 mRNA-Expression in der Proliferationsphase im Vergleich zur Sekretionsphase beobachtet werden (Abb. 38). Dieses war statistisch jedoch nicht signifikant (Proliferationsphase vs. Sekretionsphase, $p = 0,099$; Mann-Whitney U-Test).

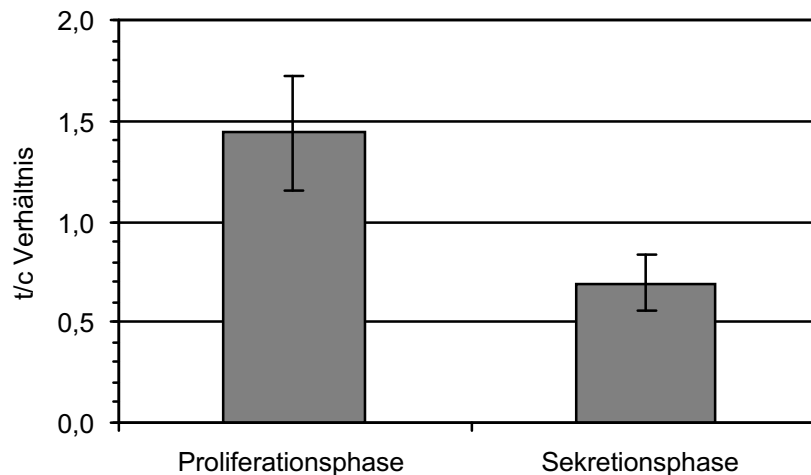


Abbildung 38: mRNA-Expression von Neuropilin-1 in menschlichem Endometrium der Proliferationsphase und der Sekretionsphase als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

3.12 Regulation der endometrialen Ang-1, Ang-2 und Tie-2 Expression durch die Steroidhormone

Um einen Effekt der Steroidhormone auf die endometrielle Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors zu untersuchen, wurden aus drei Endometriumbiopsien die epitheliale Zellpopulation und die Stromazellen isoliert und mit physiologischen Konzentrationen an Östradiol und Progesteron inkubiert. Diese endometrialen Zellen exprimieren die funktionellen Rezeptoren der Steroidhormone und sollten daher empfänglich für eine Stimulation mit den Hormonen sein. Nach der Inkubation der Zellen mit Östradiol (E_2 , $10^{-8}M$) und/oder Progesteron (P , $10^{-6}M$) in Serum-freien Medium über einen Zeitraum von 1 bis 24 Stunden wurde die RNA extrahiert und mittels RT/kompetitiver PCR die Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 untersucht. Als Kontrolle dienten kultivierte Zellen, die nicht mit den Steroidhormonen inkubiert wurden. Die Verunreinigung der isolierten Stromazellen durch Epithelzellen bzw. Epithelzellen durch Stromazellen wurde durch immunhistochemische Färbung des Epithelzell-spezifischen Proteins Zytokeratin untersucht (siehe 3.9.3).

Zudem wurde vor den kompetitiven PCR's der Erfolg der reversen Transkription durch Amplifikation des *housekeeping*-Gens β -Actin überprüft (siehe 3.9.1).

Bei der kompetitiven PCR lässt sich über das Verhältnis von Target zu Kompetitor Bandenintensität der relative mRNA-Gehalt der Proben semiquantitativ bestimmen. Wie sich durch Zugabe der jeweils gleichen Menge von 0,1 amol Kompetitor bei den kompetitiven PCR Ansätzen zeigte, war dieser bei den Angiopietinen und ihrem Rezeptor in Epithel- und Stromazellen vergleichbar. Jedoch waren die Verhältnisse der Target/ Kompetitor-Bandenintensität je nach mRNA und Zelltyp unterschiedlich hoch.

Die Untersuchung der Target/ Kompetitor-Verhältnisse ergab, dass die Ang-1 mRNA-Expression von endometrialen Stroma- und Epithelzellen durch Inkubation der Zellen mit Östradiol und/oder Progesteron in physiologischen Konzentrationen beeinflusst wird. Die Verhältnisse der Target zu Kompetitor-Bandenintensitäten sind in den Abbildungen 39 und 40 als Mittelwert der je Probe dreimal durchgeführten kompetitiven PCR's dargestellt.

Bei den Stromazellen kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer erhöhten Ang-1-Expression. Diese konnte bereits schon nach einer Stunde Inkubation mit den Steroidhormonen beobachtet werden. Mit steigender Inkubationsdauer erhöhte sich die mRNA-Expression von Ang-1 weiter und erreichte ein Maximum nach 4 bis 8 Stunden Inkubation mit Östradiol und/oder Progesteron (Abb. 39).

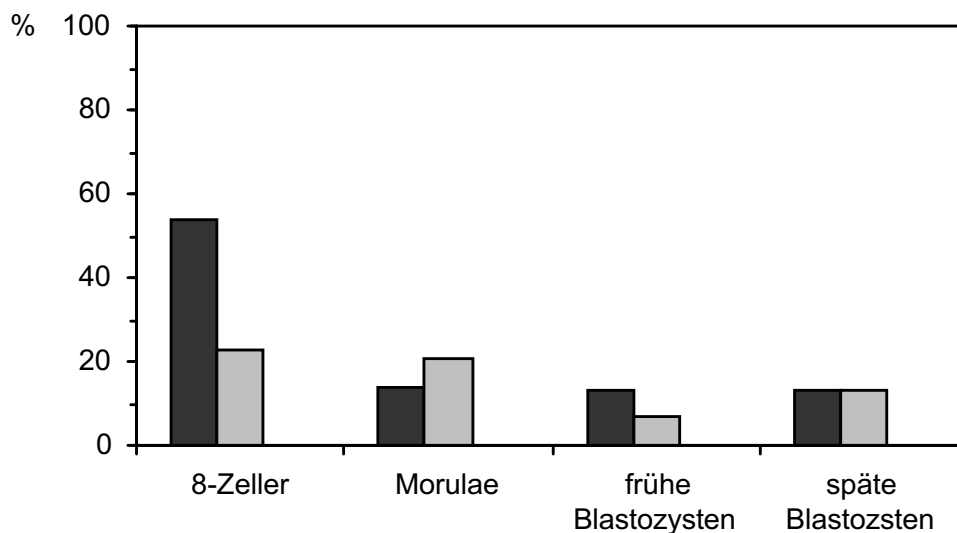


Abbildung 39: Relative Ang-1 mRNA-Expression endometrialer Stromazellen inkubiert mit Östradiol (■) und Progesteron (■) sowie Östradiol und Progesteron (■) als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Bei den Epithelzellen konnte die mRNA-Expression von Ang-1 vor allem durch Inkubation mit Östradiol gesteigert werden. Durch Inkubation mit dem Steroidhormon kam es bereits nach einer Stunde zu einer zwei bis drei Mal stärkeren Ang-1 mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Bei Inkubation mit Progesteron bzw. Östradiol und Progesteron kam es dagegen erst nach 8 bis 24 Stunden zu einer Erhöhung des Ang-1 mRNA-Gehalts der Zellen (Abb. 40).

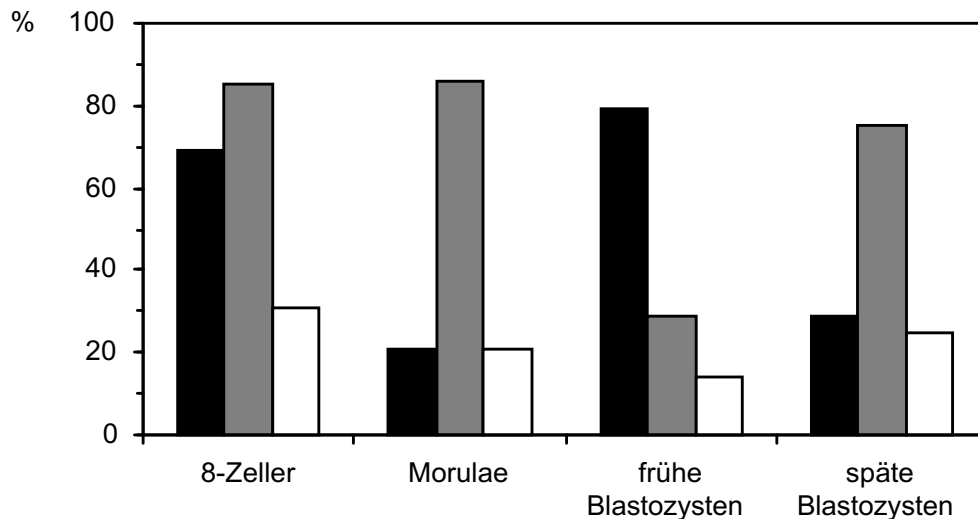


Abbildung 40: Relative Ang-1 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen inkubiert mit Östradiol (■) und Progesteron (■) sowie Östradiol und Progesteron (■) als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Auch die Expression der Ang-2 mRNA wurde in endometrialen Stromazellen im Vergleich zur Kontrolle durch Inkubation mit physiologischen Konzentrationen an Östradiol und Progesteron gesteigert. Bereits nach einstündiger Inkubation mit Östradiol, Progesteron bzw. Östradiol und Progesteron erhöhte sich die Ang-2 mRNA-Expression um das Zwei- bis Dreifache. Im Vergleich dazu erfolgte bei längerer Inkubation mit den Steroidhormonen nur eine geringe Steigerung der Ang-2 Expression. Nach 24 Stunden Inkubation mit den Steroidhormonen erniedrigte sich die Ang-2 Expression der Zellen, die mit Östradiol und/oder Progesteron inkubiert wurden, stark und fiel bis zum Wert der Kontrolle.

Die Ang-2 Expression endometrialer Epithelzellen konnte wiederum hauptsächlich durch Inkubation mit Östradiol beeinflusst werden. Dabei erhöhte sich der nachweisbare mRNA-Gehalt von Ang-2 mit steigender Inkubationsdauer und erreichte einen im Vergleich zur Kontrolle etwa doppelt so hohen Wert nach 24 Stunden Inkubation mit Östradiol.

Die Inkubation der Epithelzellen mit Progesteron bzw. mit Östradiol und Progesteron hatte dagegen keinen eindeutigen Einfluss auf die Ang-2 mRNA-Expression. Es konnten Schwankungen im Ang-2 mRNA-Gehalt beobachtet werden. Jedoch folgten diese keinem erkennbaren Muster. Die Verhältnisse der Target zu Kompetitor-Bandenintensitäten von Ang-2 in Stroma- bzw. Epithelzellen sind als Mittelwert der je Probe dreimal durchgeführten kompetitiven PCR's in den Abbildungen 41 und 42 dargestellt.

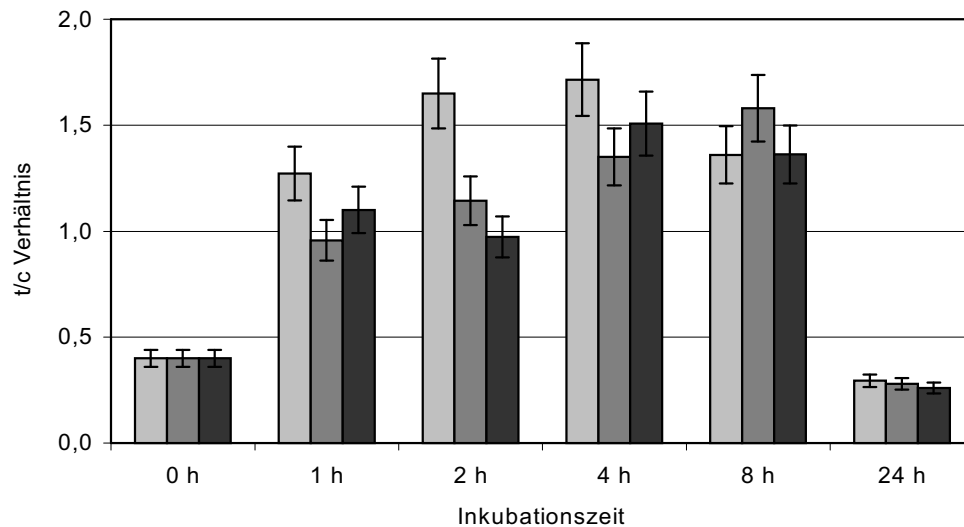


Abbildung 41: Relative Ang-2 mRNA-Expression endometrialer Stromazellen inkubiert mit Östradiol (□), Progesteron (■) oder Östradiol und Progesteron (■) als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

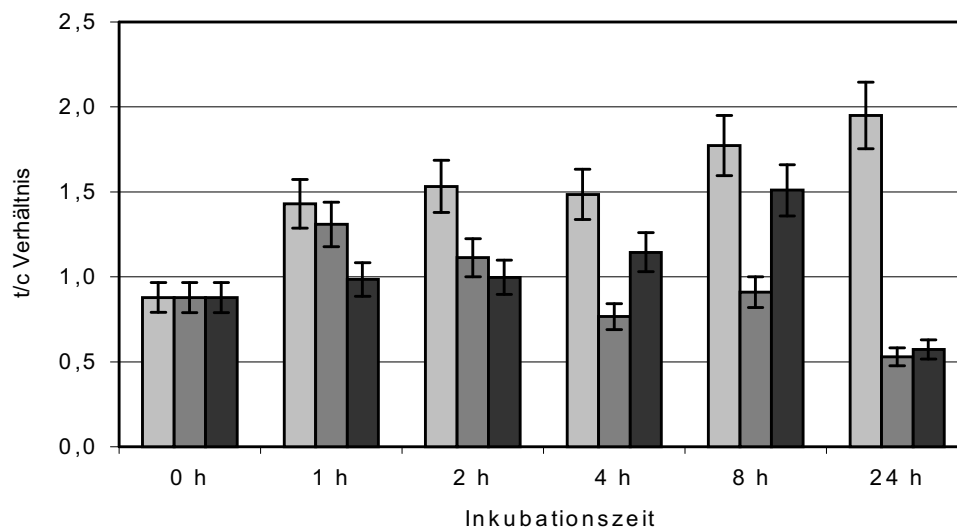


Abbildung 42: Relative Ang-2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen inkubiert mit Östradiol (□), Progesteron (■) oder Östradiol und Progesteron (■) als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Im Gegensatz zu den Angiopoietinen konnte die mRNA-Expression des Rezeptors Tie-2 weder in endometrialen Stromazellen noch in Epithelzellen durch Inkubation der Zellen mit Östradiol und/oder Progesteron merklich beeinflusst werden. Es konnten Schwankungen in der Tie-2 mRNA-Expression in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit den Steroidhormonen beobachtet werden, die jedoch keinem erkennbaren Muster folgten (Abb. 43 und 44).

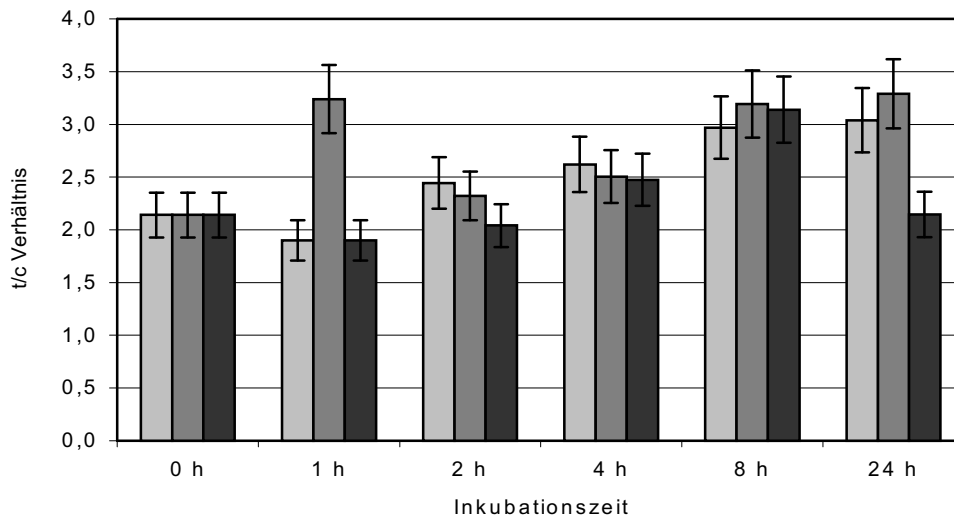


Abbildung 43: Relative Tie-2 mRNA-Expression endometrialer Stromazellen inkubiert mit Östradiol (□), Progesteron (■) oder Östradiol und Progesteron (■) als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

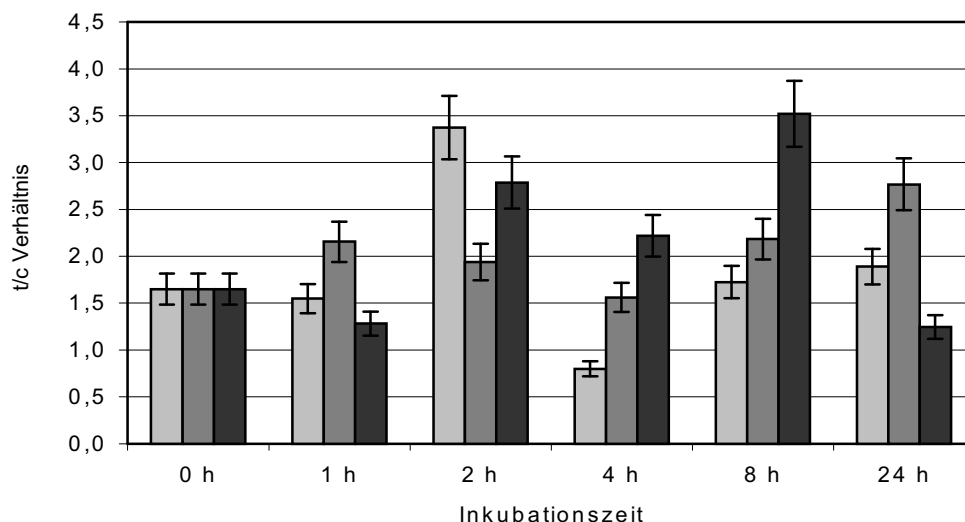


Abbildung 44: Relative Tie-2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen inkubiert mit Östradiol (□), Progesteron (■) oder Östradiol und Progesteron (■) als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

3.13 Wirkung von *human chorionic gonadotropin* (HCG) auf die endometriale Expression von VEGF, Ang-1, Ang-2 und Tie-2

Human chorionic gonadotropin (HCG) ist eines der ersten Produkte des Embryos und konnte in menschlichen Präimplantationsembryonen bereits im 8-Zell-Stadium, d.h. zu Beginn der Aktivierung des embryonalen Genoms nachgewiesen werden. HCG ist ein Trophoblast-spezifisches Protein, welches in erster Linie das Corpus Luteum unterhält und so die Produktion von Progesteron anregt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass HCG die Differenzierung und Dezidualisierung endometrieller Stromazellen fördert (Han et al., 1999). Es wird daher vermutet, dass HCG bei der embryonalen Implantation eine Rolle spielt und dass es am Embryo-maternalen Dialog beteiligt ist. Eine Möglichkeit wäre, dass HCG die endometriale Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren beeinflusst. Um dieses zu untersuchen, wurden aus drei Endometriumbiopsien die Stromazellen isoliert und mit definierten Mengen an HCG 24 Stunden lang inkubiert.

Dann wurde die RNA extrahiert und mittels RT/kompetitiver PCR die mRNA-Expression von VEGF und den Angiopoietinen untersucht. Aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten von Target und Kompetitor-Bande lässt sich semiquantitativ der spezifische mRNA-Gehalt der jeweiligen Probe bestimmen. Jede kompetitive PCR wurde dreimal wiederholt und je Probe aus den einzelnen Verhältnissen der Target zu Kompetitor-Bandenintensitäten der Mittelwert errechnet.

Der Gehalt an Ang-1, Ang-2 und Tie-2 mRNA in kultivierten, endometrialen Stromazellen war vergleichbar, wie sich durch Zugabe von jeweils 0,1 amol Kompetitor in den PCR-Ansatz der kompetitiven PCR ergab. Bei der VEGF kompetitiven PCR wurden im Unterschied dazu 1 amol Kompetitor zugesetzt, d.h. der Gehalt an VEGF-mRNA ist in den Zellen um etwa das Fünffache höher.

Die Untersuchung der Target/Kompetitor Verhältnisse zeigte, dass die mRNA-Expression von VEGF, Ang-1, Ang-2 und Tie-2 in endometrialen Stromazellen durch 24stündige Inkubation der Zellen mit HCG beeinflusst wird. In den Abbildungen 45 bis 48 sind die Target zu Kompetitor-Verhältnisse für VEGF, Ang-1, Ang-2 und Tie-2 als Mittelwerte der je Probe dreimal durchgeführten kompetitiven PCR's dargestellt.

So wurde der Gehalt an VEGF mRNA bei Inkubation mit 5 IU/ ml HCG im Vergleich zur Kontrolle nahezu verdoppelt (Abb. 45). Bei höheren HCG-Konzentrationen verringerte sich die VEGF-Expression jedoch deutlich und der t/c-Wert fiel sogar unter den der Kontrolle.

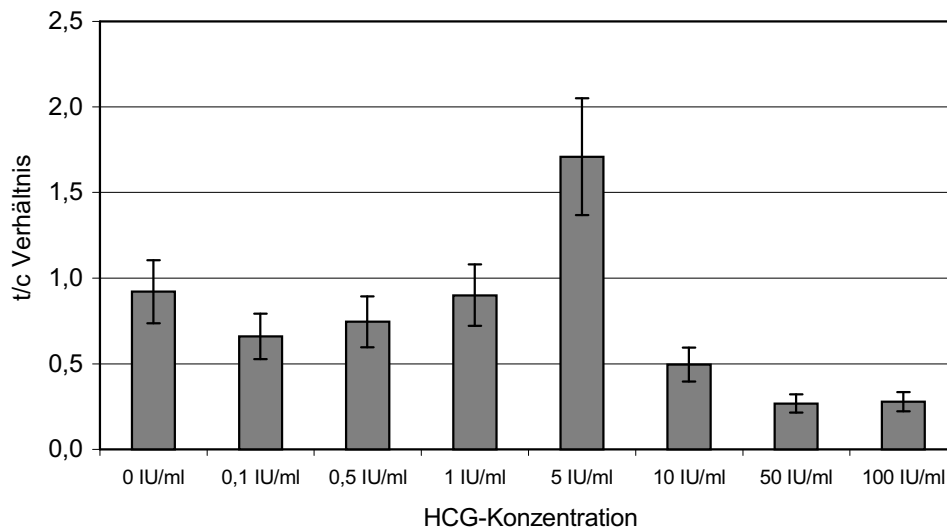


Abbildung 45: Relative VEGF mRNA-Expression endometrialer Stromazellen nach 24stündiger Inkubation mit HCG als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Auch der mRNA-Gehalt von Ang-1 in endometriellen Stromazellen wurde durch Inkubation mit HCG deutlich beeinflusst. Bei 1 IU/ml bzw. mit 5 IU/ml HCG betrug dieser im Vergleich zur Kontrolle nahezu das Doppelte. Wie auch bei VEGF hatten geringere HCG-Konzentrationen dagegen keinen Einfluss auf die Ang-1 Expression der Stromazellen. Bei höheren HCG-Konzentration von 50 bzw. 100 IU/ml sank die Ang-1 Expression wieder und das Target/Kompetitor Verhältnis lag sogar unter dem Wert der Kontrolle (Abb. 46).

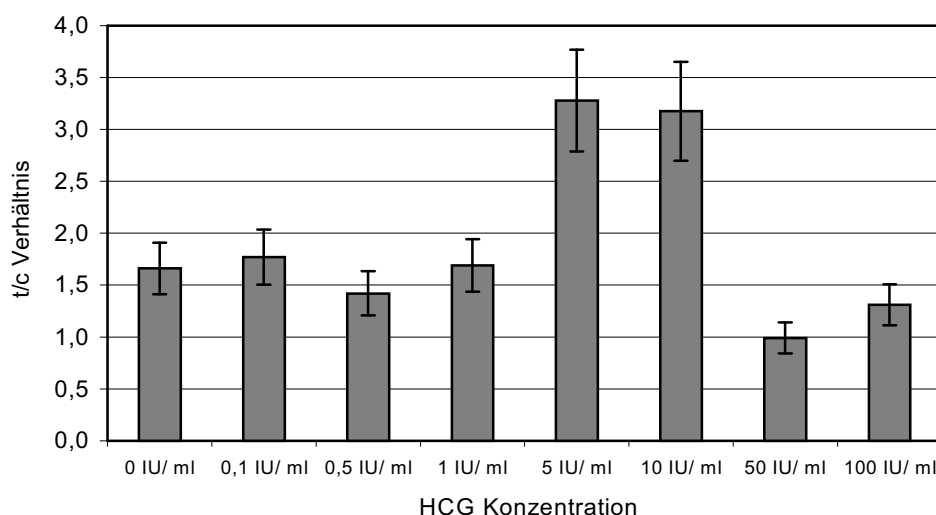


Abbildung 46: Relative Ang-1 mRNA-Expression endometrialer Stromazellen nach 24stündiger Inkubation mit HCG als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Der Gehalt an Ang-2 und Tie-2 mRNA wurde durch Inkubation der Stromazellen mit 1 bis 5 IU/ml HCG ebenfalls deutlich gesteigert. Bei geringeren HCG-Konzentrationen konnte wiederum kein Effekt auf die Ang-2 Expression beobachtet werden (Abb. 47 und 48).

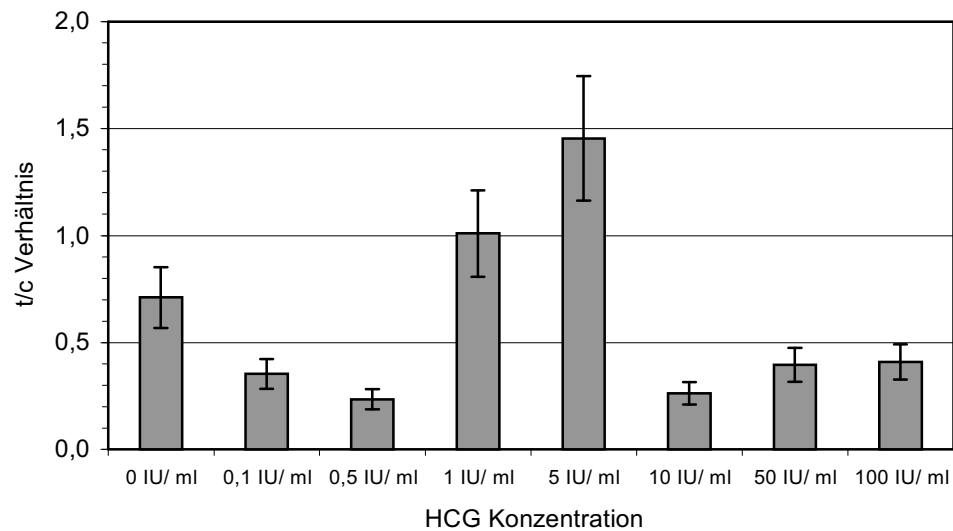


Abbildung 47: Relative Ang-2 mRNA-Expression endometrialer Stromazellen nach 24stündiger Inkubation mit HCG als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

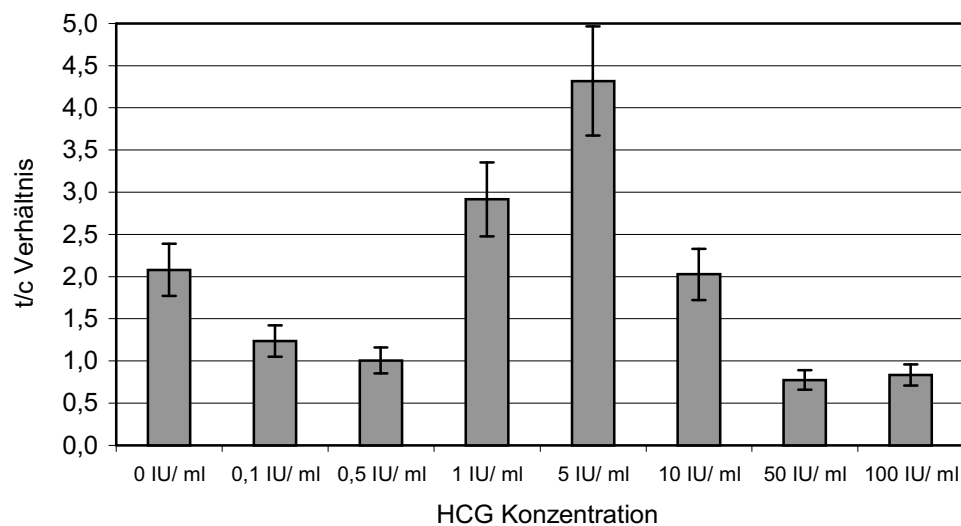


Abbildung 48: Relative Tie-2 mRNA-Expression endometrialer Stromazellen nach 24stündiger Inkubation mit HCG als Mittelwert $\pm$ SD. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

3.14 Einfluss von IL-1 β auf die Expression des VEGF-Systems dezidualisierter Stromazellen

Eine weitere Möglichkeit für die Interaktion zwischen Embryo und Endometrium bei der embryonalen Implantation wäre eine Beeinflussung angiogenetischer Wachstumsfaktoren durch embryonal produziertes IL-1 β .

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden bei 5 Endometriumbiopsien der Proliferationsphase und bei 3 Biopsien der Sekretionsphase die Stromazellen isoliert und durch Kultivierung mit physiologischen Mengen an Östradiol und Progesteron über einen Zeitraum von 9 Tagen dezidualisiert. Die Zuordnung der Biopsien in die Zyklusphasen erfolgte anhand der Zyklusanamnese. Nach der Dezidualisierung erfolgte eine 24stündige Inkubation der Zellen mit Interleukin-1 β (IL-1 β), dem IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1 ra) sowie mit IL-1 β und IL-1 ra. Als Kontrolle dienten Zellen, die 9 Tage lang ohne Zusatz von Östradiol und Progesteron kultiviert wurden, d.h. nicht dezidualisiert waren, sowie dezidualisierte Zellen, die nicht mit IL-1 β und/oder IL-1 ra inkubiert wurden. Die RNA wurde aus den Zellen extrahiert und mittels RT/ kompetitiver PCR wurde die mRNA-Expression von Komponenten des VEGF-Systems in den Zellen analysiert. Jede kompetitive PCR wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert der einzelnen Verhältnisse von Target zu Kompetitor-Bandenintensität je Probe bestimmt. Wie zuvor bereits beschrieben, wurde der Erfolg der reversen Transkription durch eine β -Actin PCR kontrolliert (siehe 3.9.1).

Wie sich durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Kompetitor bei den PCR-Ansätzen zeigte, war der relative mRNA-Gehalt von Komponenten der VEGF-Familie in den dezidualisierten Zellen der einzelnen Biopsien sehr verschieden. Bei der kompetitiven PCR zum Nachweis von VEGF wurden je nach Biopsie zwischen 1 und 5 amol Kompetitor zugesetzt. Beim VEGFR-1 waren Kompetitor-Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 amol erforderlich, beim VEGFR-2 0,5 bis 5 amol und beim Antagonisten sFlt 0,01 bis 0,05 amol. In allen untersuchten, dezidualisierten Stromazellkulturen war der relative mRNA-Gehalt von VEGF und VEGFR-2 am höchsten und der des Antagonisten sFlt am niedrigsten, wie sich durch die Menge an Kompetitor ergab. Es konnte keine Korrelation der Kompetitor-Konzentration mit der Zyklusphase der Biopsie festgestellt werden.

Abbildung 49 zeigt repräsentativ anhand der dezidualisierten Stromazellen einer Biopsie die Produkte der kompetitiven PCR's. In den ersten beiden Spalten sind die PCR-Produkte der Kontrollen dargestellt. Zu sehen sind die VEGF Target-Bande bei 297 bp, die VEGF Kompetitor-Bande bei 188 bp, die Target- und Kompetitor-Banden der

VEGF-Rezeptoren 1 und 2 bei 655 bp, 485 bp, 751 bp und 412 bp, sowie die Target-Bande und die Kompetitor-Bande des Antagonisten sFlt bei 643 bp und 475 bp.

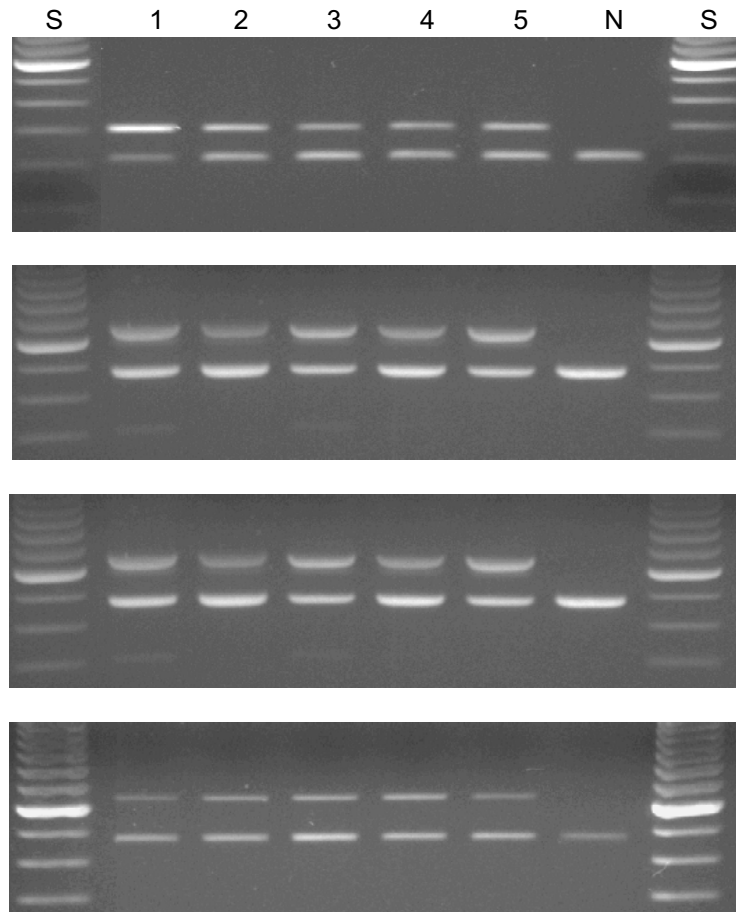


Abbildung 49: mRNA-Expression von VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 und sFlt in kultivierten Stromazellen einer Biopsie. 2% Agarosegel gefärbt mit Ethidiumbromid. Von links nach rechts dargestellt: nicht dezidualisierte Zellen (1), dezidualisierte Zellen (2), dezidualisierte Zellen die mit IL-1 β (3), IL-1 ra (4) und IL-1 β + IL-1 ra (5) inkubiert wurden. N: Negativkontrolle der kompetitiven PCR, S: 100 bp DNA-Standard.

Durch Untersuchung der Target/Kompetitor-Verhältnisse wurde der relative mRNA-Gehalt von Komponenten der VEGF-Familie in den einzelnen Proben ermittelt. Es konnte keine Beeinflussung der mRNA-Expression der VEGF-Familie durch IL-1 β oder dem IL-1 ra nachgewiesen werden. Abbildung 50 zeigt repräsentativ für die Stromazellen einer Biopsie die relative mRNA-Expression von Komponenten der VEGF-Familie nach Inkubation der Zellen mit IL-1 β , IL-1 ra und IL-1 β + IL-1 ra.

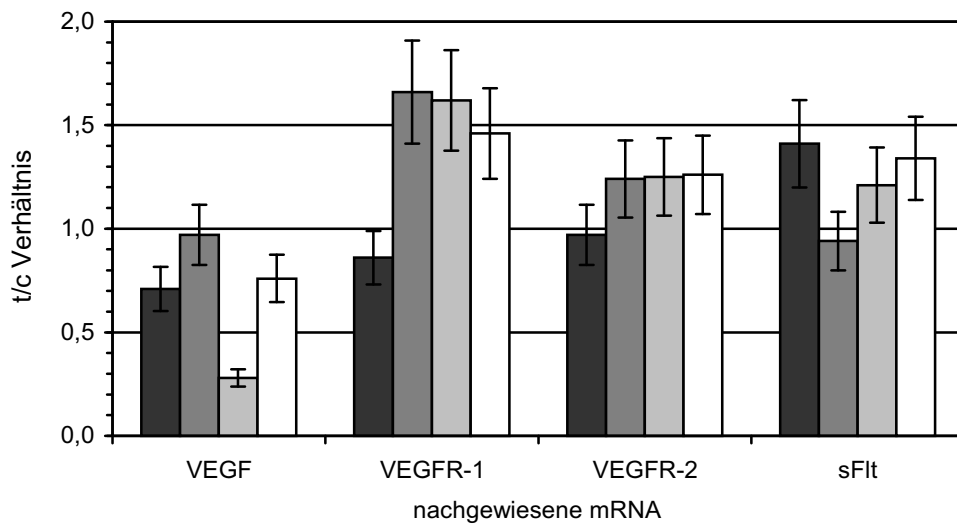


Abbildung 50: Relative mRNA-Expression von Komponenten der VEGF-Familie in dezidualisierten, endometrialen Stromazellen einer Biopsie als Mittelwert $\pm$ SD. Die Zellen wurden zuvor mit IL-1 β (■), IL-1 ra (■) oder IL-1 β und IL-1 ra (■) inkubiert. Als Vergleich ist die dezidualisierte Kontrolle (□) dargestellt. t/c: Verhältnis Target/Kompetitor-Bandenintensität.

Bei allen untersuchten, endometrialen Stromazellkulturen konnten zwischen den einzelnen Proben starke Schwankungen in der Expression von VEGF, den VEGF-Rezeptoren sowie dem Antagonisten beobachtet werden. Diese folgten jedoch keinem erkennbaren Muster und waren unabhängig von einer Inkubation der Zellen mit IL-1 β oder dem IL-1 ra.

4 DISKUSSION

Angiogenese ist das Aussprossen von Kapillaren aus einem bereits existierenden Endothel und als solche ein grundlegender Prozess bei der Bildung neuer Blutgefäße. Unter physiologischen Bedingungen findet Angiogenese jedoch nur im weiblichen Reproduktionssystem, bei der Wundheilung und in der Embryonalentwicklung statt. Sonst kommt diese lediglich unter pathologischen Bedingungen wie z.B. beim Wachstum von Tumoren vor. Die Bedeutung der Angiogenese im weiblichen Reproduktionssystem konnte in einem Mausversuch gezeigt werden. Durch systemische Gabe des Angiogenese-Inhibitors AGM-1470 kam es bei nicht-schwangeren, weiblichen Mäusen zu einer Hemmung des Aufbaus von Corpus Luteum und Endometrium (Klauber *et al.*, 1997). Die mit AGM-1470 behandelten Mäuse wiesen weniger und kleinere Corpora Lutea, weniger endometriale Drüsen, eine geringere Proliferationsrate der endometrialen Stromazellen, sowie eine geringere Anzahl an proliferierenden Epithelzellen und Blutgefäßen auf. Damit konnte gezeigt werden, dass die endometriale Angiogenese ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung eines rezeptiven Endometriums ist.

Auch bei der embryonalen Implantation ist Angiogenese zwingend erforderlich, da eine intensive Vaskularisierung des dezidualisierten Endometriums und die Bildung der Plazenta ausschlaggebend für die Nährstoffversorgung des Embryos und somit für den Erhalt der Schwangerschaft sind. So führte die systemische Gabe des Angiogenese-Inhibitors AGM-1470 bei schwangeren Mäusen zu einer vollständigen Inhibierung der Embryonalentwicklung, zurückzuführen auf Störungen bei der Dezidualisierung, der Bildung der Plazenta und des Dottersacks, ebenso wie der Embryonalentwicklung der Blutgefäße (Klauber *et al.*, 1997).

Die ersten Untersuchungen zur Entwicklung der endometrialen Blutgefäße im Verlauf des Menstruationszyklus wurden bereits 1940 durchgeführt. Bei der Transplantation von Endometrium in die vordere Augenkammer von Rhesusaffen konnte eine zunehmende Vaskularisierung des Gewebes beobachtet werden, gefolgt von einer Periode der Gefäßregression, die mit der Menstruationsblutung endete (Markee J.E., 1940). Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Proliferation endometrialer Endothelzellen untersucht, mit unterschiedlichen Ergebnissen. Während Ferenczy *et al.* (1979) eine erhöhte Endothelzell-Proliferation in der frühen und mittleren Proliferationsphase sowie in der mittleren Sekretionsphase nachweisen konnten, beobachteten andere Arbeitsgruppen ein stetes Wachstum des Endothels im Verlauf des Menstruationszyklus (Goodger *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1998). Durch einen *chick chorioallantoic membrane* (CAM)- Assay mit nativem Endometrium unterschiedlicher Zyklusphasen wurde das angiogenetische

Potential des gesamten Endometriums untersucht. Es wurde beobachtet, dass das Endometrium über den gesamten Menstruationszyklus hinweg ein hohes angiogenetisches Potential besitzt, jedoch mit einem signifikant erhöhten VDI (*vascular density index*) in der frühen Proliferationsphase und in der frühen und späten Sekretionsphase im Vergleich zur späten Proliferationsphase (Maas *et al.*, 2001).

Die physiologische Angiogenese im Rahmen der embryonalen Implantation ähnelt der Angiogenese unter pathologischen Bedingungen beim Tumorwachstum. Sowohl der implantierende Embryo, als auch der wachsende Tumor müssen Angiogenese induzieren und Anschluss an die Blutgefäße finden, damit ihre Nährstoffversorgung und dadurch ihr Wachstum gewährleistet ist. Daher ist ein sehr viel versprechender Ansatz für die experimentelle Krebstherapie die Inhibierung der Tumor-Angiogenese und viele Untersuchungen zur Regulation der molekularen und zellulären Vorgänge angiogenetischer Prozesse konzentrieren sich auf die Gefäßentwicklung bei Tumoren. So entstammt z.B. die Hypothese, dass Angiogenese durch einen „*angiogenic switch*“-Mechanismus reguliert wird, der seinerseits durch einen Wechsel im Gleichgewicht zwischen angiogenetischen Induktoren und Inhibitoren ausgelöst wird, der Tumorforschung (Hanahan und Folkman, 1996).

Trotz der einzigartigen Rolle der Angiogenese im zyklischen Endometrium, bei der embryonalen Implantation oder bei der Entwicklung von Tumoren sind die molekularen Mechanismen der Angiogenese bis heute noch weitestgehend unverstanden. Eine Vielzahl an möglichen Mediatoren angiogenetischer Prozesse wurde identifiziert, dazu zählen der *fibroblast growth factor* (FGF), der *transforming growth factor* (TGF- α), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und die Angiopoietine (Übersichtsartikel Rees und Bicknell, 1998; Smith, 1998). Die Meisten dieser Faktoren besitzen jedoch ein breites Spektrum an Zielzellen und Funktionen. VEGF und die Angiopoietine wirken dagegen spezifisch an Endothelzellen und sind ausschließlich an angiogenetischen Prozessen beteiligt. Daher sollten diese bei der Regulation angiogenetischer Prozesse von besonderer Bedeutung sein.

4.1 Expression des VEGF-Systems in Maus-Präimplantationsembryonen

Das VEGF-System konnte bislang in nahezu allen zum Reproduktionstrakt gehörenden Geweben nachgewiesen werden, so z.B. im Eileiter und Ovar, in der Plazenta, sowie im Endometrium des Menschen (Gordon *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996; Charnock-Jones *et al.*, 1993; Shifren *et al.*, 1996; Torry *et al.*, 1996; Krüssel *et al.*, 1999). Zudem konnte

VEGF in embryonalen Implantationsstellen und in Trophoblastzellen der Ratte und der Maus, unmittelbar nach erfolgter Implantation des Embryos, detektiert werden (Breier *et al.*, 1992; Jakeman *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Beobachtungen wird eine Beteiligung des VEGF-Systems bei der Angiogenese im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation vermutet.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchung beschreibt erstmals die Expression des VEGF-Systems in Präimplantationsembryonen. Aus praktischen und ethischen Gründen wurden die Untersuchungen an Embryonen der Maus durchgeführt. Insgesamt wurden 173 einzelne Maus-Präimplantationsembryonen, vom 8-Zell-Stadium bis zum Stadium des *hatching* Blastozysten auf die mRNA-Expression von Komponenten des VEGF-Systems untersucht. Die VEGF-mRNA konnte in allen untersuchten, embryonalen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Dabei wurde festgestellt, dass die VEGF-mRNA Expression mit den ersten Zellteilungen beginnt und dass sie bis zum Zeitpunkt der embryonalen Implantation stetig zunimmt. Auch die mRNA der transmembranären Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 konnte in allen untersuchten Embryonalstadien nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression des VEGFR-1 nahm dabei im Verlauf der Präimplantationsentwicklung zu. Dagegen folgte die Expression der VEGFR-2 mRNA keinem erkennbaren Muster. Ein Nachweis der mRNA des Antagonisten sFlt gelang nicht.

Die VEGF-Rezeptoren konnten zuvor bereits im Endometrium nachgewiesen werden (Krüssel *et al.*, 1999). Durch die embryonale VEGF-Expression und die endometrielle Expression der VEGF-Rezeptoren ist somit eine parakrine Wechselwirkung zwischen Embryo und Endometrium möglich. Der Nachweis der VEGF-Rezeptoren im Endometrium gelang sowohl in isolierten Epithelzellen, als auch in isolierten Stromazellen (Krüssel *et al.*, 1999). Vom Präimplantationsembryo produziertes VEGF, vor allem das des *hatching* Blastozysten, wäre demnach in der Lage, direkt an der Implantationsstelle an diese Rezeptoren zu binden und Angiogenese zu induzieren. Weiterhin kann vom Präimplantationsembryo produziertes VEGF an Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche der endometriellen Epithel- und Stromazellen binden. Diese sind wichtige Regulatoren anderer Heparin-bindender Wachstumsfaktoren (Schlessinger *et al.*, 1995) und es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von VEGF an Heparan-Sulfat-Proteoglykane die Freisetzung anderer angiogenetischer Wachstumsfaktoren, wie z.B. des *basic fibroblast growth factor* (bFGF) aus der ECM bewirkt (Jonca *et al.*, 1997).

Durch die embryonale Expression der transmembranären Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 ist auch eine autokrine Wechselwirkung zwischen embryonalem VEGF und den VEGF-Rezeptoren, ebenso wie eine parakrine Wechselwirkung zwischen embryonalen

VEGF-Rezeptoren und endometriellem VEGF möglich. VEGF wird im Endometrium in der Sekretionsphase, d.h. zum Zeitpunkt der Implantation, verstärkt exprimiert. Allerdings konnte festgestellt werden, dass VEGF hauptsächlich an der apikalen Seite des Epithels exprimiert wird und dass das VEGF-Protein in das Lumen sezerniert wird (Hornung et al., 1998). Somit stünde es lokal an der Implantationsstelle nicht zur Verfügung. Daher könnte eine parakrine Wechselwirkung zwischen endometriellem VEGF und embryonalen VEGF-Rezeptoren nur vor Beginn der Implantation, so lange der Embryo sich noch im Lumen befindet, erfolgen. Die Embryonalentwicklung der Blutgefäße setzt jedoch erst nach der Implantation des Embryos in das Endometrium ein. Es ist daher unwahrscheinlich, dass über die VEGF-Rezeptoren des Präimplantationsembryos Angiogenese induziert wird.

Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass durch parakrine Wechselwirkung zwischen endometriellem VEGF und embryonalen Rezeptoren, oder durch autokrine Wechselwirkung zwischen embryonalem VEGF und VEGF-Rezeptoren andere, bisher noch unbekannte Signale des VEGF-Systems vermittelt werden. Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass die mRNA von VEGF und den transmembranären Rezeptoren auch in Zygoten der Maus nachgewiesen werden konnte. Bei der Maus wird das embryonale Genom erst nach dem 2-Zell-Stadium aktiviert, daher müssen diese mRNA's maternalen Ursprungs sein. Die Tatsache, dass die maternale mRNA von VEGF und den Rezeptoren auf die Zygote übertragen wird, ist ein weiteres Indiz für zusätzliche, bereits zu Beginn der Embryonalentwicklung benötigte Funktionen des VEGF-Systems.

Auch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine besitzen eine Vielzahl von Funktionen, die erst nach und nach entdeckt worden sind, wie z.B. das Interleukin-1 (IL-1). Ursprünglich wurden die Interleukine als Moleküle entdeckt, die von Leukozyten produziert werden und die auf Leukozyten wirken. Später konnte gezeigt werden, dass einige der Interleukine auch von Nicht-Leukozyten produziert werden und auf Nicht-Leukozyten wirken. IL-1 z.B. wird von vielen Zellen, wie B-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und auch Endothelzellen exprimiert. Zunächst wurde dem IL-1 nur eine Funktion bei Entzündungsreaktionen zugeschrieben. So stimuliert IL-1 unter Anderem T- und B-Lymphozyten und verursacht die Produktion von Prostaglandinen und Kollagenase (Übersichtsartikel Dinarello, 1994). Erst einige Jahre später wurde entdeckt, dass IL-1 auch für die embryonale Implantation von Bedeutung ist (Sheth et al., 1991). Diese Vermutung konnte mittlerweile bestätigt werden, indem gezeigt werden konnte, dass bei Mäusen durch intraperitoneale Gabe des IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1 ra) die embryonale Implantation verhindert wird (Simón et al., 1994). Möglicherweise ist auch

VEGF pleiotrop und die Induktion von Angiogenese nur eine der Funktionen, die der Wachstumsfaktor ausübt.

Die Expression von VEGF wurde zuvor bereits in menschlichen Präimplantationsembryonen untersucht. Krüssel *et al.* (2000) konnten die VEGF-mRNA in einzelnen, menschlichen Präimplantationsembryonen ebenfalls vom 8-Zell-Stadium bis zum Stadium der *hatching* Blastozyste nachweisen. Jedoch war die Anzahl der von ihnen untersuchten Embryonen mit insgesamt 33 vergleichsweise gering. Zudem handelte es sich dabei um Embryonen, die sich aus pathologisch fertilisierten Zygoten entwickelt hatten. Es ist somit fragwürdig, ob und in welchem Maße sich die transkriptionelle Aktivität dieser Embryonen von der durch regulär fertilisierte Zygoten entstandenen Embryonen unterscheidet. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur Expression des VEGF-Systems in Präimplantationsembryonen wurde eine weitaus größere Zahl an Embryonen verwendet. Zudem waren diese regulär fertilisiert und bis zum entsprechenden Stadium *in vivo* entwickelt.

Durch Immunhistochemie an Paraffinschnitten von Maus-Uteri, in die zuvor Blastozysten transferiert wurden, sollte das VEGF-Protein im Präimplantationsembryo lokalisiert werden. Obwohl pro Uterus jeweils ca. 30 Embryonen transferiert wurden, waren in den wenigsten Gewebeschnitten Blastozysten zu sehen. Zudem wiesen diese keine normale Morphologie auf, d.h. die innere Zellmasse und das Trophektoderm waren oftmals nicht klar zu erkennen. Dies ist möglicherweise auf die Behandlung mit Formalin zur Fixierung des Gewebes und auf die Paraffineinbettung zurückzuführen. Der Präimplantationsembryo ist gegenüber einer Behandlung mit diesen Reagenzien sicherlich empfindlicher, als ein Gewebe, wie das Endometrium. Dennoch konnten VEGF und der VEGFR-1 in den Präimplantationsembryonen lokalisiert werden, nicht jedoch der VEGFR-2. VEGF und der VEGFR-1 fanden sich in beiden Anteilen des Embryos, d.h. sowohl in der inneren Zellmasse als auch im Trophektoderm. Es wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass hauptsächlich der Trophoblast-Anteil der Blastozyste VEGF exprimiert, da dieser bei der Implantation der in das Endometrium vordringende Teil ist und vom Trophoblasten sezerniertes VEGF somit lokal für die Angiogenese an der Implantationsstelle zur Verfügung stünde. Auch die Proteine der VEGF-Rezeptoren wären eher im Trophoblast-Anteil der Blastozyste, als in der inneren Zellmasse, zu erwarten.

Ein Nachweis des vom Embryo produzierten VEGF-Proteins mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Test gelang nicht. Möglicherweise liegt die vom Embryo produzierte Menge an VEGF-Protein unter dem Detektionslimit des Tests von 3 pg/ml. Geht man davon aus, dass die nachgewiesene mRNA auch in Protein translatiert wird, so könnten

jedoch auch sehr kleine Mengen an Protein in einer autokrin/parakrinen Weise zur Angiogenese an der Implantationsstelle beitragen. Durch *knock-out* Experimente in der Maus konnte erkannt werden, dass die Wirkung von VEGF streng Dosis-abhängig ist (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Ungewöhnlicherweise führte schon die funktionelle Inaktivierung eines VEGF-Allels (heterozygot^{+/-}) zu vielfältigen Mängeln in der Embryonalentwicklung der Blutgefäße und zu einem embryonal letalen Phänotyp, obwohl die heterozygoten VEGF^{+/-}-Embryonen nach wie vor die VEGF-mRNA exprimierten.

Die biologische Aktivität von VEGF wird jedoch nicht nur durch die gebildete Menge an Protein bestimmt, sondern auch durch die Möglichkeit der Bindung des Proteins an die transmembranären Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Die lösliche Form des VEGFR-1 bindet mit gleicher Affinität an VEGF wie die transmembranären Rezeptoren und verhindert dadurch als kompetitiver Antagonist die Bindung von VEGF an die transmembranären Rezeptoren (Kendall *et al.*, 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass sFlt im Endometrium während der mittleren Sekretionsphase - dem Zeitpunkt der embryonalen Implantation – vermindert exprimiert wird (Krüssel *et al.*, 1999). Dadurch würde zum Zeitpunkt der Implantation die Bindung von VEGF an die endometriellen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 erleichtert und eine Induktion der angiogenetischen Prozesse durch Interaktion des nachgewiesenen, embryonalen VEGF mit endometriellem VEGFR-1 und VEGFR-2 möglich.

Der Beginn der embryonalen Implantation konnte bei der Maus mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität an der Implantationsstelle korreliert werden (Psychoyos 1973). Bei intravenöser Injektion eines blauen Farbstoffes kam es zur Akkumulation des Farbstoffes an der Implantationsstelle. Bei der Maus kann diese erhöhte, vaskuläre Permeabilität am Abend von E 4, zu Beginn der embryonalen Implantation, beobachtet werden. Die molekularen Mechanismen, die zu der Erhöhung der vaskulären Permeabilität an der Implantationsstelle führen sind, ebenso wie die Mechanismen der Angiogenese im Rahmen der Implantation, bislang noch nicht geklärt. Jedoch könnte auch hier das VEGF-System, insbesondere embryonales VEGF, beteiligt sein, da VEGF nicht nur ein potenter, angiogenetischer Wachstumsfaktor ist, sondern auch die Permeabilität bestehender Gefäße erhöht. Derzeit gibt es jedoch noch kein einfaches *in vitro* Modell der embryonalen Implantation, anhand dessen die Mechanismen der Implantation oder die an der Implantation beteiligten embryonalen und endometriellen Faktoren untersucht werden könnten. Paria *et al.* (2001) simulierten daher die embryonale Implantation in einem Mausmodell. Sie transferierten Gelkugeln von der Größe einer Blastozyste an Tag 4 in Uteri scheinschwangerer Mäuse. Die Gelkugeln waren zuvor

mit Faktoren, denen eine Funktion bei der Implantation zugesprochen wird, getränkt worden. Durch intravenöse Injektion eines blauen Farbstoffes wurde der Effekt der Faktoren auf die vaskuläre Permeabilität an der Implantationsstelle untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass bei *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) getränkten Gelkügelchen die vaskuläre Permeabilität an der Implantationsstelle erhöht war, ähnlich wie bei der Implantation einer Blastozyste. Dieser Effekt konnte beim Transfer von mit BSA getränkten Gelkügelchen als Kontrolle nicht beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass der Embryo bei der Erhöhung der vaskulären Permeabilität an der Implantationsstelle eine aktive Rolle spielt und dass embryonale Faktoren, in diesem Fall HB-EGF und IGF-1, diese beeinflussen. Möglicherweise könnte also auch embryonales VEGF in seiner Eigenschaft als Permeabilitäts-erhöhender Faktor an der erhöhten vaskulären Permeabilität an der embryonalen Implantationsstelle beteiligt sein.

4.2 Expressionsmuster der VEGF-Isoformen in Präimplantationsembryonen der Maus

Alternatives Spleissen ist ein wichtiger Mechanismus, durch den es bei vielen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren zur Bildung von Isoformen mit biologisch unterschiedlicher Wirkung kommt. Alle durch alternatives Spleissen des VEGF-Gens generierten mRNA-Isoformen (vgl. Abb. 4) codieren für Proteine, die Angiogenese induzieren und die aktive Mitogene speziell für Endothelzellen sind. Jedoch unterscheiden sich die VEGF-Isoformen hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens gegenüber der Zelloberfläche bzw. extrazellulären Matrix (ECM). VEGF₁₂₀ (bzw. VEGF₁₂₁ beim Menschen) wird frei sezerniert, wohingegen VEGF₁₈₈ (bzw. VEGF₁₈₉ beim Menschen) fest an die Zelloberfläche bzw. ECM assoziiert ist. VEGF₁₆₄ (bzw. VEGF₁₆₅ beim Menschen) schließlich zeigt ein intermediäres Bindungsverhalten.

Durch RT/*nested* PCR mit einem Isoform-differenzierenden Primer wurde das Expressionsmuster der VEGF-Isoformen in Präimplantationsembryonen der Maus untersucht. Hierbei konnten alle drei bekannten VEGF-Isoformen der Maus nachgewiesen werden. In den 8-Zell-Embryonen, den Morulae und den *hatching* Blastozysten war VEGF₁₆₄ die vorherrschende Isoform, gefolgt von VEGF₁₂₀ und VEGF₁₈₈. In den frühen Blastozysten hingegen konnte VEGF₁₂₀ am häufigsten nachgewiesen werden, gefolgt von VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈. In allen untersuchten, embryonalen Entwicklungsstadien konnten Ko-Expressionen der Isoformen VEGF₁₂₀ und VEGF₁₆₄, sowie der Isoformen VEGF₁₆₄ und

VEGF₁₈₈ beobachtet werden. Keiner der untersuchten Präimplantationsembryonen zeigte jedoch eine simultane Expression aller drei Isoformen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Großteil der Präimplantationsembryonen aller untersuchten Entwicklungsstadien die frei sezernierten VEGF-Isoformen bildet.

Cheng *et al.* (1997) konnten zeigen, dass VEGF₁₈₈ *in vivo* im Vergleich zu den anderen Isoformen eine relativ niedrige Bioaktivität hat. Daher wird angenommen, dass hauptsächlich die frei sezernierten Isoformen angiogenetisch aktiv sind, wohingegen das Zell-assoziierte VEGF₁₈₈ eine Depotfunktion ausübt und erst nach Abspaltung durch Proteasen bioverfügbar wird. Die Tatsache, dass in den Präimplantationsembryonen die frei sezernierten VEGF-Isoformen dominieren, bekräftigt die Möglichkeit einer Interaktion des Präimplantationsembryos mit dem Endometrium und der Induktion von Angiogenese durch embryonales VEGF. Nur die frei sezernierten Isoformen können parakrin an die endometriellen VEGF-Rezeptoren binden und sollten somit die Angiogenese bei der embryonalen Implantation bzw. die erhöhte Gefäßpermeabilität an der Implantationsstelle fördern.

Die biologische Aktivität der VEGF-Isoformen wird aber auch durch ihre Fähigkeit verschiedene Rezeptoren zu binden bestimmt. Die Bindungs-Domäne für die Rezeptoren 1 und 2 sowie für den Antagonisten sFlt ist auf den gemeinsamen Exons 1-5 kodiert (Keyt *et al.*, 1996), somit binden alle VEGF-Isoformen mit gleicher Affinität an die beiden transmembranären Rezeptoren und den Antagonisten. VEGF₁₆₄ bindet jedoch zusätzlich auch an den Rezeptor Neuropilin-1 (NP-1). Durch Bindung an NP-1 wird die Bindung von VEGF₁₆₄ an die beiden transmembranären VEGF-Rezeptoren verstärkt. Daher wird angenommen, dass diese Isoform im Vergleich zu den anderen Isoformen eine höhere angiogenetische Aktivität besitzt (Soker *et al.*, 1998). VEGF₁₆₄ war in den Präimplantationsembryonen die am häufigsten und oftmals auch die am stärksten exprimierte Isoform. Auch diese Tatsache bekräftigt die Möglichkeit einer parakrinen Wechselwirkung zwischen embryonalem VEGF und endometriellen VEGF-Rezeptoren und der Induktion von Angiogenese an der Implantationsstelle durch embryonales VEGF.

Auch in menschlichen Präimplantationsembryonen werden die einzelnen VEGF-Isoformen unterschiedlich exprimiert. Krüssel *et al.* (2001) konnten in Blastozysten alle VEGF-Isoformen des Menschen (vgl. Abb. 4), außer VEGF₂₀₆, nachweisen. Im Unterschied zu den Präimplantationsembryonen der Maus war die am stärksten exprimierte Isoform in menschlichen Embryonen VEGF₁₄₅ und nicht VEGF_{164/165}. Diese VEGF-Isoform ist bei der Maus bislang noch nicht bekannt. Das Expressionsmuster der VEGF-Isoformen in Präimplantationsembryonen von Mensch und Maus korreliert jedoch

dahingehend, dass jeweils hauptsächlich die frei sezernierten, angiogenetisch aktiven Isoformen exprimiert werden. Dadurch ist in beiden Spezies, unabhängig von den unterschiedlichen Isoformen, eine parakrine Wechselwirkung zwischen embryonalem VEGF und endometriellen Rezeptoren möglich.

4.3 Expression und zyklische Regulation des VEGF₁₆₄ spezifischen Rezeptors Neuropilin-1 im menschlichen Endometrium

Neuropilin-1 (NP-1) bindet spezifisch die Isoform VEGF₁₆₄ und verstärkt dadurch die Bindung von VEGF₁₆₄ an den VEGFR-2 und das biologische Signal des VEGFR-2. Zu Anfang ist NP-1 jedoch als Rezeptor der Axon-bildenden Semaphorin/Collapsin-Familie identifiziert worden, daher wurde seine Expression bislang hauptsächlich in neuronalen Zellen untersucht. In Zusammenhang mit seiner Bedeutung bei der Entwicklung der Blutgefäße und seiner Funktion als VEGF₁₆₄ spezifischer Rezeptor ist die Expression von NP-1 beim Menschen bislang nur in Endothelzellen, sowie in Tumorzellen untersucht worden (Soker *et al.*, 1998). Zudem existieren Daten über die NP-1 mRNA-Expression im Uterus von Maus und Ratte (Halder *et al.*, 2000; Pavelock *et al.*, 2001).

Die hier vorgestellte Untersuchung beschreibt erstmals die mRNA-Expression von NP-1 im zyklischen Endometrium beim Menschen. NP-1 konnte über den gesamten Menstruationszyklus hinweg im Endometrium nachgewiesen werden, jedoch mit einer höheren NP-1 mRNA-Expression in der Proliferationsphase im Vergleich zur Sekretionsphase. NP-1 könnte somit als VEGF₁₆₄ spezifischer Rezeptor an den angiogenetischen Prozessen im Endometrium beteiligt sein. Die erhöhte NP-1 mRNA-Expression in der Proliferationsphase lässt auf eine Regulation der NP-1 Expression durch Östradiol schließen, welches in dieser Phase des Menstruationszyklus verstärkt freigesetzt wird.

Im Endometrium finden während des gesamten Menstruationszyklus angiogenetische Prozesse statt. Während die Proliferationsphase durch ein ausgeprägtes Wachstum der endometriellen Blutgefäße charakterisiert ist, kommt es in der Sekretionsphase hauptsächlich zu einer Festigung dieser Gefäße. VEGF induziert die Teilung von Endothelzellen und den Zusammenschluss dieser Zellen zu neuen Kapillaren. NP-1 bewirkt durch Bindung von VEGF₁₆₄ eine stärkere Bindung von VEGF₁₆₄ an den VEGFR-2 und so ein stärkeres, biologisches VEGF₁₆₄/VEGFR-2-Signal.

Die erhöhte Expression von NP-1 in der Proliferationsphase könnte somit durch Verstärkung des VEGF₁₆₄/VEGFR-2-Signals ein erhöhtes Wachstum neuer Kapillaren in

dieser Phase des Zyklus bewirken. Dagegen scheint NP-1 bei den angiogenetischen Prozessen im Rahmen der embryonalen Implantation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn der Rezeptor wird zum Zeitpunkt der Implantation, in der mittleren Sekretionsphase, wesentlich geringer exprimiert, als in der Proliferationsphase. Jedoch könnte das Zusammenspiel von VEGF₁₆₄, VEGFR-2 und NP-1 und die damit verbundene Stimulation angiogenetischer Prozesse bei der Implantation auch durch embryonales NP-1 reguliert werden.

Die Expression von NP-1 im Endometrium wurde in dieser Arbeit lediglich auf mRNA-Ebene untersucht. Ob die nachgewiesene mRNA auch in Protein translatiert wird, bleibt noch zu klären. Geht man davon aus, so könnte NP-1 durch Zusammenspiel mit VEGF₁₆₄ und VEGFR-2 die vaskulären Veränderungen im Endometrium, vor allem das ausgeprägte Wachstum der Gefäße in der Proliferationsphase, beeinflussen. Auch wurde bei der Untersuchung zur NP-1 Expression im menschlichen Endometrium nicht zwischen den einzelnen Zelltypen des Gewebes unterschieden. Da das NP-1-Protein bislang jedoch bei den meisten Untersuchungen auf Endothelzellen detektiert wurde (Soker *et al.*, 1998; Halder *et al.*, 2000) scheint es wahrscheinlich, dass NP-1 auch im menschlichen Endometrium auf diesen Zellen lokalisiert ist.

Die NP-1 mRNA konnte zuvor bereits im Uterus der Maus nachgewiesen werden (Halder *et al.*, 2000). Dabei zeigte sich eine verstärkte NP-1 Expression zum Zeitpunkt der embryonalen Implantation. Zudem wurde beobachtet, dass NP-1 ausschließlich in Endothelzellen des dezidualisierenden Stromas exprimiert wird. Die Untersuchungen zur NP-1 Expression im Maus-Uterus wurden an schwangeren Mäusen durchgeführt, daher könnte man vermuten, dass sich das Expressionsmuster von NP-1 im schwangeren Organismus von dem im nicht-schwangeren Organismus unterscheidet. Es wäre somit interessant, die NP-1 Expression in menschlichem Endometrium nach Eintritt einer Schwangerschaft zu untersuchen.

4.4 mRNA-Expression von Neuropilin-1 in Maus-Präimplantationsembryonen

Wie zuvor beschrieben, konnte NP-1 im menschlichen Endometrium über den gesamten Menstruationszyklus hinweg nachgewiesen werden. Im Uterus der Maus wird NP-1 zum Zeitpunkt der embryonalen Implantation verstärkt exprimiert (Halder *et al.*, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass VEGF₁₆₄ in Präimplantationsembryonen der Maus die vorherrschende VEGF-Isoform war. Daher stellte sich die Frage, ob auch NP-1 vom

Präimplantationsembryo exprimiert wird, um in autokrin/parakriner Weise die angiogenetischen Prozesse bei der embryonalen Implantation zu beeinflussen.

Um diese Frage zu klären, wurden insgesamt 109 einzelne Präimplantationsembryonen vom 8-Zell-Stadium bis zum Stadium des *hatching* Blastozysten auf die NP-1 Expression untersucht. Jedoch gelang in 8-Zell-Embryonen, Morulae und *hatching* Blastozysten der Nachweis von NP-1 nicht. Auch in Zygoten der Maus konnte die NP-1 mRNA nicht nachgewiesen werden. Lediglich bei 19% der frühen Blastozysten konnte die NP-1 mRNA detektiert werden. Eventuell ist der Gehalt an NP-1 mRNA im Präimplantationsembryo so gering, dass er mit der verwendeten Methode der RT/*nested* PCR in den meisten Fällen nicht erfasst werden konnte. Allerdings ist diese Methode ausgesprochen sensitiv, so dass es wahrscheinlicher scheint, dass NP-1 für den Präimplantationsembryo noch keine Rolle spielt und daher von diesem auch nicht exprimiert wird.

NP-1 konnte in Zusammenhang mit VEGF₁₆₄ bisher lediglich in Endothelzellen, sowie in Tumorzellen nachgewiesen werden (Soker *et al.*, 1998). Auch im Uterus der Maus wurde NP-1 lediglich in Endothelzellen detektiert (Halder *et al.*, 2000). Im Unterschied dazu konnten die anderen VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 jedoch auch in anderen Zelltypen, wie Epithel- und Stromazellen, nachgewiesen werden. Möglicherweise ist NP-1 aber weitaus spezifischer für Endothelzellen als VEGFR-1 und VEGFR-2 und wird ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert. Dies würde erklären, wieso NP-1 im Präimplantationsembryo nicht nachgewiesen werden konnte.

Dennoch spielt embryonales NP-1 in der Embryonalentwicklung der Blutgefäße eine Rolle, wie durch *knock-out* Experimente in der Maus festgestellt werden konnte (Kitsukawa *et al.*, 1997). Wie auch durch *knock-out* des VEGFR-1 bzw. VEGFR-2 sind NP-1^{-/-} Embryonen embryonal letal und weisen massive Fehlbildungen im kardiovaskulären System auf. Allerdings scheint NP-1 erst zu einem späteren Zeitpunkt als der Präimplantationsperiode für den Embryo von Bedeutung zu sein. Dies zumindest würde erklären, wieso NP-1 in Präimplantationsembryonen der Maus nicht nachgewiesen werden konnte. Zum Zeitpunkt der embryonalen Implantation kann somit nur ein Zusammenspiel von endometriellem NP-1 und VEGFR-2 auf parakrine Weise mit embryonalem VEGF₁₆₄ oder auf autokrine Weise mit endometriellem VEGF₁₆₄ erfolgen.

4.5 Expression der Angiopoietine 1 und 2 und ihres Rezeptors Tie-2 im zyklischen Endometrium

Während die Rolle des VEGF-Systems bei angiogenetischen Prozessen im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation schon von vielen Arbeitsgruppen untersucht worden ist, gibt es in diesem Zusammenhang zu den Angiopoietinen bislang nur wenig Informationen.

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchung konnten die mRNA's der Angiopoietine und ihres Rezeptors im Endometrium in allen Phasen des Zyklus nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Ang-1-Expression in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus. Diese Beobachtung wurde durch eine immunhistochemische Färbung auch auf Protein-Ebene unterstützt. Im Unterschied dazu konnten bei der Expression der Ang-2-mRNA und des Proteins nur geringe zyklische Schwankungen beobachtet werden. Der Rezeptor Tie-2 wurde während des gesamten Menstruationszyklus annähernd gleich stark exprimiert.

Die erhöhte Ang-1-Expression in der Sekretionsphase steht in Einklang mit der in dieser Zyklusphase notwendigen Reifung und Stabilisierung der endometriellen Gefäße. Die Sekretionsphase des Endometriums ist durch ein ausgeprägtes Wachstum und eine starke Windung der, in der Proliferationsphase gebildeten, Spiralarterien charakterisiert (Kaiserman-Abramof and Padykula, 1989). Damit wird der subepitheliale, kapillare Plexus bereit gestellt, in dem der Blutfluss in der frühen und mittleren Sekretionsphase ein Maximum erreicht, in Erwartung eines implantierenden Embryos (Gannon et al, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Ang-1 die Stabilisierung neu gebildeter Gefäße fördert, indem es die Rekrutierung von Perizyten und Zellen der glatten Muskulatur und die Bildung der Basalmembran moduliert (Suri *et al.*, 1996). Die erhöhte Ang-1 Expression im Endometrium der Sekretionsphase deutet darauf hin, dass das Ang-1/Tie-2 Signal für das Wachstum und die Stabilisierung der Spiralarterien in dieser Zyklusphase von Bedeutung ist. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass bei Menorrhagie (verstärkte Menstruationsblutung) die endometriale Ang-1-Expression stark vermindert ist (Hewett *et al.*, 2002).

Das Ang-1-Protein konnte im Endometrium der Proliferationsphase vor allem im Drüsenepithel und im Endothel, aber auch schwach in den Stromazellen detektiert werden. In der Sekretionsphase konnte Ang-1 im Stroma in unmittelbarer Umgebung der Blutgefäße wesentlich stärker nachgewiesen werden. Möglicherweise spiegelt dies die allgemein erhöhte mRNA-Expression von Ang-1 in der Sekretionsphase wieder.

Was die Ang-1 Expression der Epithelzellen angeht, so wäre es interessant zu klären, ob Ang-1 ähnlich wie VEGF apikal in Richtung des Lumens sezerniert wird und somit lokal an der Implantationsstelle nicht zur Verfügung stünde. Möglicherweise wird Ang-1 jedoch auch in Richtung des Stromas sezerniert, wo es auf die subepithelialen Kapillargefäße wirken könnte. Da das Ang-1 Protein im Drüsenepithel jedoch hauptsächlich apikal lokalisiert war, scheint eine apikale Sekretion jedoch wahrscheinlicher.

Im Unterschied zu Ang-1 konnten bei der mRNA-Expression von Ang-2 im Endometrium nur geringe Schwankungen im Verlauf des Menstruationszyklus beobachtet werden. Lediglich zwischen der frühen und mittleren Sekretionsphase ergab sich ein signifikanter Unterschied bei der Ang-2 mRNA-Expression, der jedoch auf Protein-Ebene nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen lassen einen grundsätzlichen Gehalt an Ang-2 mRNA im Endometrium vermuten, der für die dort stattfindenden angiogenetischen Prozesse ausreicht. Ang-2 wirkt als natürlicher Antagonist von Ang-1 und führt als solcher zur Destabilisierung von Gefäßen und zur Gefäßregression. Nur in Gegenwart anderer angiogenetischer Faktoren, wie z.B. VEGF, hat Ang-2 einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der Blutgefäße (Maisonpierre *et al.*, 1997). Es ist daher denkbar, dass die im Endometrium stattfindenden angiogenetischen Prozesse durch die Verfügbarkeit anderer, angiogenetischer Stimuli reguliert werden und nicht durch die Menge an Ang-2. Jedoch könnte das Ang-2/Tie-2 Signal auch durch lokale Unterschiede in der Verfügbarkeit des Liganden reguliert werden, wie auch Li *et al.* (2001) vermuten. Die Autoren beobachteten durch in-situ Hybridisierung eine ungleichmäßige Ang-2-Expression im gesamten Endometrium, die schließlich den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) des Gewebes zugeordnet werden konnte. Bei der in dieser Arbeit dargestellten immunhistochemischen Lokalisierung konnte Ang-2 dagegen hauptsächlich im endometrialen Drüsenepithel und nur schwach in den Stromazellen und den Blutgefäßen nachgewiesen werden. Dies steht auch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Krikun *et al.* (2001), die Ang-2 im Stroma und in den Endothelzellen nachweisen konnten, nicht jedoch im Epithel. Allerdings sind ihre Daten und ihre Schlussfolgerung sehr ungenau. So geben sie z.B. keinen Aufschluss über die Anzahl der untersuchten Endometriumbiopsien.

Bei der Tie-2 Expression konnten in dieser Arbeit weder auf mRNA noch auf Protein-Ebene zyklische Schwankungen beobachtet werden. Auch Krikun *et al.* (2001) fanden keinen Effekt der Zyklusphase auf die Tie-2 Protein-Expression. Im Gegensatz dazu beobachteten Li *et al.* (2001) eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von Tie-2 im Verlauf des Menstruationszyklus. Bei dieser Untersuchung wurde eine semiquantitative RT/PCR angewandt, wobei der mRNA-Gehalt des Targets mit dem

Gehalt an mRNA des *housekeeping*-Gens β -Actin verglichen wird. Diese Methode schließt jedoch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der verschiedenen Primer oder intra-Assay-Variationen (Variationen zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen, z.B. in der Primermenge) nicht aus. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der RT/kompetitiven PCR ist dagegen sicherlich wesentlich genauer. Der mRNA-Gehalt der Proben wird hierbei durch Zugabe einer definierten Menge an Kompetitor semiquantitativ bestimmt. Die Sequenz des Kompetitors entspricht bis auf eine kurze Deletion innerhalb des zu amplifizierenden Fragmentes der Sequenz des Targets. Der Kompetitor hat somit die gleichen Primer-Bindungsstellen wie das Target. Dadurch können Unterschiede in der Bindungsaffinität der Primer und Mengenunterschiede der einzelnen Primer bei der PCR ausgeschlossen werden. Es scheint also wahrscheinlicher, dass Tie-2 im Verlauf des Zyklus gleichmäßig exprimiert wird und dass das Ang-1/Tie-2 Signal nicht durch die Verfügbarkeit des Rezeptors reguliert wird, sondern durch die Menge des Liganden Ang-1, der im Endometrium zyklusspezifisch exprimiert wird. Gleiches gilt z.B. auch für das VEGF-System; während der Ligand im Endometrium zyklusspezifisch exprimiert wird, bleibt die Expression der Rezeptoren im Verlauf des Menstruationszyklus annähernd gleich (Krüssel *et al.*, 1998; Shifren *et al.*, 1996; Torry *et al.*, 1996).

Der Nachweis der mRNA von Ang-1, Ang-2 und Tie-2 gelang zusätzlich in isolierten, endometriellen Epithel- und Stomazellen. Der mRNA-Gehalt der Angiopoietine und ihres Rezeptors war in beiden Zellpopulationen vergleichbar. Auch die Proteine der Angiopoietine konnten in diesen beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden. Bei Tie-2 steht die mRNA-Expression der Stromazellen jedoch im Widerspruch mit der Lokalisierung des Tie-2 Proteins, welches in diesen Zellen nicht detektiert werden konnte. Möglicherweise führen post-transkriptionale Regulationsmechanismen zu dem unterschiedlichen Protein-Expressionsmuster.

Bei allen Untersuchungen mittels RT/kompetitiver PCR wurden starke individuelle Schwankungen innerhalb der einzelnen Proben beobachtet. Dies wurde zuvor schon von anderen Autoren (Li *et al.*, 2001) berichtet. Möglicherweise ist dies auf die angewandte Methode zurückzuführen. Bei der RT/kompetitiven PCR können zwar unterschiedliche Primer-Bindungsaffinitäten und intra-Assay-Variationen (Variationen zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen, z.B. in der Primermenge) bei der PCR ausgeschlossen werden, nicht jedoch intra-Assay-Variationen bei der reversen Transkription. Da die reverse Transkription aber im Unterschied zur PCR nicht exponentiell erfolgt, haben intra-Assay-Variationen dabei sicherlich geringere Auswirkungen als bei einer PCR. Es stellt sich dennoch die Frage, ob diese wirklich vernachlässigbar klein sind, oder ob sie doch zu

einer Ungenauigkeit im Ergebnis führen. Bei der ursprünglichen, kompetitiven RT/PCR wird ein kompetitives RNA-Fragment zugesetzt und nicht wie bei der modifizierten Methode ein kompetitives cDNA-Fragment (Tsai *et al.*, 1996). In diesem Fall können dann auch intra-Assay-Variationen bei der reversen Transkription ausgeschlossen werden.

Die signifikant erhöhte Ang-1-Expression in der Sekretionsphase könnte auf einen Effekt der Steroidhormone, insbesondere des Progesterons zurückzuführen sein. Nach Ausbildung des Corpus Luteum kommt es in dieser Phase des Zyklus zu einer stark erhöhten Sekretion von Progesteron, welches sich dann auf die Ang-1 Expression auswirken könnte. Diese Möglichkeit wurde durch Inkubation endometrieller Zellkulturen mit Progesteron und/oder Östradiol näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass schon durch wenige Stunden Inkubation mit den Steroidhormonen die mRNA-Expression der Angiopoietine und ihres Rezeptors erhöht werden konnte. Während die Ang-1 Expression im Endometrium also sowohl langfristig, über ganze Zyklusphasen hinweg, durch die Steroidhormone reguliert zu werden scheint, scheinen diese die endometrielle Expression von Ang-2 und Tie-2 dagegen nur kurzfristig zu beeinflussen. Dies würde erklären, wieso die Ang-2 und Tie-2 Expression im nativen Endometrium unabhängig von der Zyklusphase annähernd gleich stark war. Bei dieser Untersuchung konnte lediglich ein „grober“ Eindruck der endometriellen Ang-2 und Tie-2 Expression gewonnen werden, wobei kurzzeitige Einflüsse, beispielsweise der Steroidhormone nicht erfasst werden.

4.6 mRNA-Expression von Ang-1 und Ang-2 in Präimplantationsembryonen der Maus

Die Bedeutung der Angiopoietine bei der Embryonalentwicklung der Blutgefäße konnte durch *knock-out* Experimente der Maus erkannt werden. Die funktionelle Inaktivierung von Ang-1 oder Tie-2 führt zu massiven Fehlbildungen der Blutgefäße und zur embryonalen Letalität an E 10.5 (Suri *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1995). Bislang existieren jedoch noch keine Informationen über eine mögliche Bedeutung der Angiopoietine bei angiogenetischen Prozessen zu einem früheren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung d.h. im Rahmen der embryonalen Implantation.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchung beschreibt erstmals die mRNA-Expression der Angiopoietine in Präimplantationsembryonen. Aus praktischen und ethischen Gründen wurden die Untersuchungen an Embryonen der Maus durchgeführt. Die Ang-1 mRNA konnte vom 8-Zell-Stadium bis zum Stadium des *hatching* Blastozysten nachgewiesen werden. Jedoch folgte diese keinem erkennbaren Muster. In 75% der 8-Zell-Embryonen,

71% der Morulae, 30% der frühen Blastozysten und 48% der *hatching* Blastozysten konnte die Ang-1 mRNA detektiert werden. Ein Nachweis der Ang-2 mRNA im Präimplantationsembryo gelang dagegen nicht. Da die verwendete Methode der RT/*nested* PCR, bei der die Ang-2 cDNA mit 2x 40 Zyklen amplifiziert wurde, sehr sensitiv ist, scheint ein methodischer Fehler ausgeschlossen. Wahrscheinlicher ist es, dass der Präimplantationsembryo Ang-2 nicht exprimiert.

Die Ang-1 mRNA konnte ebenfalls in Zygoten der Maus nachgewiesen werden. Da die embryonale mRNA-Synthese zu diesem Zeitpunkt noch nicht begonnen hat, muss es sich dabei auf jeden Fall um maternale mRNA handeln. Wie auch bei VEGF ist es fraglich, welche Funktion das Ang-1 der Zygote ausübt. Angiogenese spielt zu diesem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung für den Embryo noch keine Rolle, daher erfüllt möglicherweise also auch Ang-1 zusätzliche, bisher noch unbekannte Funktionen. Dies würde dann auch den hohen Anteil an 8-Zellern und Morulae mit nachweisbarer Ang-1 mRNA erklären, denn auch in diesem Stadium der Präimplantationsentwicklung muss der Embryo noch keine Angiogenese induzieren.

Geht man davon aus, dass die nachgewiesene Ang-1 mRNA auch in Protein translatiert wird, so könnte das embryonale Ang-1 Protein, vor allem das des *hatching* Blastozysten, an den endometriellen Tie-2 Rezeptor binden und somit in parakriner Weise zu den angiogenetischen Prozessen im Rahmen der embryonalen Implantation beitragen. Ob der Präimplantationsembryo selbst auch den Rezeptor Tie-2 exprimiert bleibt noch zu klären.

4.7 Einfluss von *human chorionic gonadotropin* (HCG) auf die endometriale mRNA-Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren

Eines der ersten Produkte des Embryos ist *Human chorionic gonadotropin* (HCG), das sogenannte Schwangerschaftshormon. HCG konnte durch in-situ Hybridisierung in menschlichen Präimplantationsembryonen bereits im 8-Zell-Stadium, d.h. zu Beginn der Aktivierung des embryonalen Genoms, nachgewiesen werden (Bonduelle *et al.*, 1988). HCG ist ein Trophoblast-spezifisches Protein und gilt somit als frühester Marker der Differenzierung embryonaler Zellen in den späteren embryonalen Anteil (Embryoblast) und den plazentaren Anteil (Trophoblast). Als Schwangerschaftshormon unterhält HCG in erster Linie das Corpus Luteum, regt dadurch die Produktion von Progesteron an und fördert den Erhalt der Schwangerschaft. Zusätzlich zu seinen endokrinen Effekten auf das Corpus Luteum beeinflusst HCG jedoch auch die Differenzierung der endometriellen

Stromazellen in Dezidualzellen (Han *et al.*, 1999), ein Vorgang, der für die Implantation des Embryos und für den Erhalt der Schwangerschaft zwingend notwendig ist.

HCG wird zur Ovulationsinduktion bei der Behandlung von ungewollter Kinderlosigkeit im Rahmen der assistierten Reproduktion (ART) eingesetzt. Als Nebenwirkung kommt es in 0,3-5% der Fälle jedoch zum sogenannten *Ovarian hyperstimulation syndrome* (OHSS), welches potential letal ist und sich klinisch vor allem durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität auszeichnet (Navot *et al.*, 1995). Daher haben sich viele Untersuchungen zu OHSS auf die Expression vasoaktiver Substanzen, wie VEGF, konzentriert. So konnte gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit OHSS die VEGF-Konzentration in der Aszitesflüssigkeit ungewöhnlich hoch ist (McClure *et al.*, 1994). In einem *in vitro* Modell mit ovariellen Zellen konnte die mRNA-Expression von VEGF schon durch geringe Mengen an HCG erhöht werden (Neulen *et al.*, 1995). In einem anderen *in vitro* Modell mit Endothelzellen der Lunge konnte gezeigt werden, dass supraphysiologische Mengen an HCG die Sekretion von VEGF und auch die Sekretion des VEGFR-2 in den Zellen signifikant erhöhen (Albert *et al.*, 2002).

Möglicherweise könnte HCG daher auch die endometrielle Expression angiogenetischer Faktoren beeinflussen. HCG wird spezifisch vom Trophoblast-Anteil des Embryos produziert und sezerniert. Dieser ist bei der embryonalen Implantation auch der in das Endometrium vordringende Anteil des Embryos. So könnte der Trophoblast durch die Sekretion von HCG lokal an der Implantationsstelle die endometrielle Expression angiogenetischer Faktoren beeinflussen, die ihrerseits die nach der Implantation erforderliche Angiogenese induzieren. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden endometrielle Stromazellen isoliert, mit HCG inkubiert und ein Einfluss von HCG auf die mRNA-Expression von VEGF und den Angiopoietinen untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass HCG die Expression von VEGF, den Angiopoietinen und ihres Rezeptors in endometriellen Stromazellen erhöht. Durch Inkubation mit 1 bis 5 IU/ml HCG wurde der mRNA-Gehalt von VEGF, Ang-1, Ang-2 und Tie-2 in den Zellen nahezu verdoppelt. Die gleiche HCG-Konzentration führte auch bei Granulosazellen zu einer Steigerung der mRNA-Expression von VEGF (Neulen *et al.* 1995).

Es stellt sich dennoch die Frage, inwiefern die eingesetzte Menge an HCG mit den physiologischen HCG-Konzentrationen im Endometrium vergleichbar ist. Die vom Trophoblasten sezernierte Menge an HCG-Protein, d.h. die lokale HCG-Konzentration an der Implantationsstelle ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben worden. Es existieren lediglich Daten über den HCG-Gehalt im Serum schwangerer Frauen. Dieser beträgt in der ersten Schwangerschaftswoche durchschnittlich zwischen 10 -30 mIU/ml

(0,01 und 0,03 IU/ml). Die durch den Trophoblasten produzierte Menge an HCG-Protein, die lokal im Endometrium vorhanden ist, ist im Vergleich dazu jedoch sicherlich um ein Vielfaches höher. Licht *et al.* (2001) stellten durch Messung der lokalen HCG-Konzentration im Uterus mittels eines intrauterinen Mikrodialyse-Gerätes fest, dass HCG bei einer intrauterinen HCG-Konzentration von 50 IU im Serum nicht nachweisbar ist. Die im Serum kleinste, nachweisbare Menge an HCG beträgt weniger als 0,005 IU/ml (5 mIU/ml), d.h. die intrauterine HCG-Konzentration ist mindestens um das 10000fache höher als die HCG-Konzentration im Serum. Die Menge von 1 bis 5 IU/ml HCG, bei der ein Effekt auf die endometrielle Expression der Angiopoietine beobachtet werden konnte, könnte demnach sogar noch geringer sein, als die physiologischen HCG-Konzentration im Endometrium. Dennoch wurde ein Effekt von HCG auf die endometrielle Expression der Angiogenesefaktoren beobachtet.

Vom Trophoblast sezerniertes HCG könnte die im Rahmen der embryonalen Implantation stattfindenden Prozesse auf zweierlei Art und Weise beeinflussen. Durch Bindung an die HCG-Rezeptoren der endometriellen Stromazellen könnte es direkt die Freisetzung von VEGF und Ang-1 stimulieren, wobei die durch die Faktoren geförderten angiogenetischen Prozesse verstärkt induziert werden würden. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch, dass HCG lediglich die Dezidualisierung der Stromazellen bewirkt und dass diese VEGF und Ang-1 generell stärker exprimieren, als nicht dezidualisierte Stromazellen. Dass HCG die morphologische und funktionelle Differenzierung von Stromazellen in Dezidualzellen fördert, konnte bereits gezeigt werden (Han *et al.*, 1999). Jedoch konnten die Effekte von HCG auf die Dezidualisierung der Zellen erst nach 10tägiger Inkubation mit HCG beobachtet werden. Dennoch wäre es interessant, die VEGF und Ang-1 Expression von *in vivo* dezidualisierten Stromazellen mit der Expression nicht dezidualisierter Stromazellen bzw. mit HCG inkubierten Stromazellen zu vergleichen.

Wie in dem Zellkulturexperiment gesehen werden konnte, beeinflusst HCG jedoch nicht nur die Expression des Angiogenese-Induktors Ang-1, sondern auch die Expression des natürlichen Antagonisten Ang-2. Zusammen mit VEGF, dessen endometrielle Expression durch HCG ebenfalls stimuliert wird, könnte Ang-2 somit eine verstärkte Induktion angiogenetischer Prozesse bewirken. Unwahrscheinlich ist dagegen, dass die durch HCG erhöhte, endometrielle Ang-2 Expression einen verstärkten, antagonistischen Effekt des Ang-2 zur Folge hat, der zur Regression der endometriellen Gefäße führen würde.

4.8 Einfluss des Zytokins IL-1 β auf die mRNA-Expression des VEGF-Systems in dezidualisierten Stromazellen

Die ersten Schritte bei der embryonalen Implantation sind die Apposition und Invasion des Embryos in das Endometrium. Dabei wird dem IL-1 System eine bedeutende regulatorische Funktion zugesprochen. Alle wichtigen Komponenten des IL-1 Systems, der Ligand IL-1 β , der IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1R tl) sowie der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) konnten sowohl im Endometrium, als auch im Präimplantationsembryo nachgewiesen werden (Simón *et al.*, 1993; Krüssel *et al.*, 1998). Besonders hoch war die Expression des IL-1R tl im Endometrium der Sekretionsphase ebenso wie die IL-1R tl und die IL-1 β Expression im späten Blastozysten. Damit ist eine Interaktion zwischen intra- oder extraembryonalem IL-1 β bzw. IL-1R tl im Rahmen der Präimplantationsentwicklung und der embryonalen Implantation möglich. Die wichtigste, direkte Evidenz bezüglich der Bedeutung von IL-1 β auf die embryonale Implantation war jedoch, dass bei Mäusen durch systemische Applikation des IL-1ra der IL-1 Rezeptor blockiert und so die embryonale Implantation verhindert wurde (Simón *et al.*, 1994). Später konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen Effekt des IL-1ra auf das Endometrium handelte (Simón *et al.*, 1998).

Unmittelbar im Anschluss an die Implantation des Embryos in das Endometrium muss dieser Angiogenese induzieren und die Plazenta ausbilden. Daher war unsere Hypothese, dass embryonales IL-1 β möglicherweise die Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF, beeinflusst. So könnte IL-1 β dem Endometrium signalisieren, die Expression von VEGF oder den transmembranären Rezeptoren zu verstärken bzw. die Expression des Antagonisten zu unterdrücken, womit das angiogenetische Potential des Embryos entscheidend beeinflusst würde. Ein Einfluss von IL-1 β auf die VEGF-Expression konnte zuvor bereits in einem *in vitro* Experiment mit glatten Muskelzellen der Aorta beobachtet werden (Li *et al.*, 1995). Durch Inkubation der Zellen mit 0,1 bis 10 ng/ml IL-1 β kam es bei diesen Zellen zu einer zwei bis vierfach stärkeren VEGF-Expression.

Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation dezidualisierter, endometrieller Stromazellen mit IL-1 β keinen Effekt auf die mRNA-Expression des VEGF-Systems in den Zellen. Zwar konnten innerhalb der einzelnen Proben Unterschiede im mRNA-Gehalt von VEGF und den Rezeptoren beobachtet werden, jedoch waren hierbei keine eindeutigen Veränderungen in der mRNA-Expression durch Inkubation mit IL-1 β zu erkennen. Die bei dem Experiment eingesetzte IL-1 β Konzentration betrug 100 IU/ml (=0,5 ng/ml). Möglicherweise war diese zu gering, um die endometrielle Expression des VEGF-

Systems zu beeinflussen. Laut Hersteller Sigma liegt die wirksame Konzentration des IL-1 β in einem Bereich von 0,1 bis 10 ng/ml. Die bei dem Zellkulturversuch eingesetzte IL-1 β Menge von 0,5 ng/ml stellt somit nahezu die unterste Grenze der wirksamen Konzentration dar.

Die Erkenntnis, dass IL-1 β bei endometriellen Stromazellen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des VEGF-Systems hat, korreliert mit den Ergebnissen von Lebovic *et al.* (2000). Die Autoren stimulierten Stromazellen, die aus Endometriose-Herden gewonnen wurden, und solche aus gesundem Endometrium mit IL-1 β und untersuchten mittels Northern Blot den mRNA-Gehalt von VEGF in den Zellen. Während bei den aus Endometriose-Herden isolierten Zellen die Expression von VEGF durch Inkubation von IL-1 β deutlich gesteigert wurde, konnte dieser Effekt bei den aus gesundem Endometrium gewonnenen Stromazellen nicht beobachtet werden. Es wurde nachgewiesen, dass aus Endometriose-Herden stammende Stromazellen wesentlich mehr IL-1R t1 exprimieren als endometrielle Stromazellen, daher vermuten die Autoren, dass der erhöhten Sensitivität der Endometriose-Stromazellen gegenüber IL-1 β - zumindest teilweise- eine verstärkte Bindung von IL-1 β an den Rezeptor und somit ein verstärktes IL-1 β / IL1R t1 Signal zugrunde liegt.

Die Hypothese, dass embryonales IL-1 β die endometrielle Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren, wie VEGF, oder deren Rezeptoren beeinflusst, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwischen den molekularen Regulatoren der embryonalen Implantation, wie dem IL-1 β , und den Regulatoren der Angiogenese im Rahmen der embryonalen Implantation kein Zusammenhang besteht.

4.9 VEGF und die Angiopoietine bei der Angiogenese im zyklischen Endometrium und im Rahmen der embryonalen Implantation

Trotz der vielen Untersuchungen zur Rolle angiogenetischer Wachstumsfaktoren, wie dem VEGF oder den Angiopoietinen, sowohl bei der physiologischen Angiogenese im weiblichen Reproduktionssystem, als auch bei der pathologischen Angiogenese im Rahmen des Tumorwachstums, sind die genauen molekularen Mechanismen dieser Prozesse nach wie vor unklar. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit geschilderten Experimente, haben jedoch dazu beigetragen, das Wissen um die molekularen Abläufe der angiogenetischen Prozesse im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation zu erweitern.

Die Angiogenese im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation ist von essentieller Bedeutung für die Funktion des weiblichen Reproduktionssystems. Nur ein stark vaskularisiertes Endometrium ist rezeptiv und nur durch Anschluss an die maternalen Gefäße kann der Embryo ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und die Schwangerschaft aufrecht erhalten werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die angiogenetischen Prozesse im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation lediglich durch einen Faktor bzw. dessen Signalweg stimuliert und reguliert werden. Vielmehr scheint, dass die Signale einzelner Faktoren, wie VEGF oder Ang-1, redundant sind und bei Inaktivierung der Faktoren durch andere Signalwege ersetzt werden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass bei *knock-out* von VEGF oder Ang-1 die Schwangerschaft bis zu einem gewissen Punkt bestehen bleibt. Durch *knock-out* von VEGF oder Ang-1 kommt es zu massiven Fehlbildungen im kardiovaskulären System und zur embryonalen Letalität (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996; Suri *et al.*, 1996). Jedoch implantieren die VEGF^{+/-} bzw. die Ang-1^{-/-} Embryonen zunächst regulär und finden Anschluss an die maternalen Gefäße. Erst an E 10 bis E 11 bei VEGF bzw. an E 12.5 bei Ang-1 führen die intra- und extraembryonalen Fehlbildungen im kardiovaskulären System zur embryonalen Letalität.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnte vermutlich nur ein kleiner Teil des Spektrums, der möglicherweise an der Angiogenese im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation beteiligten Faktoren, untersucht werden. Zudem wurden die beiden Anteile des Reproduktionssystems nur getrennt voneinander betrachtet, da es bislang noch kein geeignetes *in vitro* Modell des Systems Embryo-Endometrium gibt. So werden als solches zwar endometrielle Epithelzellen oder Zytotrophoblast-Zellen kultiviert und analysiert (Satayaswaroop *et al.*, 1979; Coutifaris *et al.*, 1990), oder auch Kokultur-Experimente mit endometriellen Zellen und Blastozysten durchgeführt, jedoch scheint bei allen Ansätzen das Fehlen angemessener Epithel-Stroma-Wechselwirkungen, sowie die Ausbildung eines polarisierten Phänotyps, ein limitierender Faktor zu sein (Thie *et al.*, 1995; Classen-Linke *et al.*, 1997).

Auch konnte in dieser Arbeit kein funktioneller Beweis für die Bedeutung von VEGF oder den Angiopoietinen bei der endometriellen Angiogenese *in vivo* erbracht werden. Die dargestellten Ergebnisse bekräftigen jedoch die Vermutung, dass eine Vielzahl von Faktoren, wie VEGF und die Angiopoietine, an den angiogenetischen Prozessen im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation beteiligt sind und dass das Gleichgewicht an Angiogenese-Induktoren und Inhibitoren den „angiogenic switch“ auslöst (Hanahan und Folkman 1996).

Alle Untersuchungen zur Expression bestimmter mRNA's wurden an Präimplantationsembryonen der Maus durchgeführt, da die "verbrauchende" Forschung an menschlichen Präimplantationsembryonen nach dem ESchG in Deutschland verboten ist. Inwieweit die Erkenntnisse zur mRNA-Expression im Präimplantationsembryo der Maus auf den Menschen übertragbar sind, ist fraglich. So weist die embryonale Implantation bei Mensch und Maus generell große Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede auf. Die einzelnen Schritte der Implantation, d.h. Apposition, Invasion und Nidation, sind in beiden Fällen die Gleichen. Jedoch existieren z.B. zeitliche Unterschiede und Unterschiede in der hormonellen Regulation. Während bei der Maus die Implantation der Blastozyste an Tag 3.5 nach Ovulation stattfindet, erfolgt diese beim Menschen erst an Tag 6 bis 7. Bei der Maus wird die Rezeptivität des Endometriums durch Östradiol bestimmt, wohingegen die Rezeptivität des menschlichen Endometriums durch Progesteron aufrecht erhalten wird (Übersichtsartikel Ma *et al.*, 1999). Auch bei anderen Faktoren, denen eine Funktion bei der embryonalen Implantation zugesprochen wird, können zwischen Mensch und Maus Unterschiede beobachtet werden. So ist z.B. der *leukemia inhibitory factor* (LIF) bei der Maus essentiell für die embryonale Implantation. Bei funktioneller Inaktivierung von LIF (homozygot LIF^{-/-}) findet keine Implantation der sich normal entwickelnden Blastozysten statt. Dieser Effekt ist eindeutig endometrial bedingt, da beim Transfer von LIF^{-/-} Embryos in Wildtyp-Ammenmäuse eine normale Implantationsrate beobachtet werden konnte (Stewart *et al.*, 1992). Beim Menschen konnte die Funktion von LIF bei der embryonalen Implantation dagegen bislang noch nicht eindeutig geklärt werden. Untersuchungen deuten darauf hin, dass LIF auch hier eine wichtige Rolle bei der embryonalen Implantation spielt. So wurde beobachtet, dass bei Frauen mit idiopathischer Infertilität die endometriale Sekretion von LIF erniedrigt ist (Laird *et al.*, 1997; Hambartsoumian *et al.*, 1998). Es wird jedoch vermutet, dass LIF beim Menschen im Unterschied zur Maus sowohl auf das Endometrium, als auch auf den Embryo wirkt (Vogiagis *et al.*, 1999; Lass *et al.*, 2001).

Durch das weitere Sammeln von Daten zur Expression und Regulation angiogenetischer Wachstumsfaktoren im Endometrium und im Präimplantationsembryo bei Mensch und Maus könnten die molekularen Mechanismen der endometriellen Angiogenese möglicherweise in Zukunft geklärt werden. Die Untersuchung des physiologischen mRNA-Expressionsusters bestimmter Faktoren bei Präimplantationsembryonen könnte zur Diagnose von Embryonen mit dem optimalen Implantationspotential verwendet werden. Damit würde sich ein Ansatzpunkt für den klinischen Einsatz dieser Methode im Rahmen der IVF-Behandlung ergeben, analog zur Präimplantationsdiagnostik, welche zur genetischen Untersuchung von Präimplantationsembryonen verwendet wird. Dadurch

könnten die Schwangerschaftsraten der IVF-Behandlung möglicherweise deutlich erhöht werden. Auch könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der endometriellen Angiogenese zu einem therapeutischen Ansatz bei der Behandlung endometrieller Erkrankungen wie der Endometriose oder der Menorrhagie, die mit angiogenetischen Funktionsstörungen assoziiert werden, führen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Angiogenese, das Wachstum neuer Blutgefäße aus einem bereits existierenden Endothel, ist ein grundlegender Prozess bei der Ausbildung des rezeptiven Endometriums ebenso wie bei der embryonalen Implantation. Das Endometrium ist neben dem Ovar das einzige Gewebe des adulten Organismus, in dem unter physiologischen Bedingungen Angiogenese stattfindet, dennoch sind die molekularen Mechanismen der endometrialen Angiogenese bislang noch weitestgehend ungeklärt. Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und die Angiopoietine (Ang-1 und Ang-2) sind potente, angiogenetische Wachstumsfaktoren mit einer hohen Spezifität für Endothelzellen. Ihnen wird daher eine wichtige Rolle bei der Regulation angiogenetischer Prozesse zugesprochen.

In dieser Arbeit sollte die Expression des VEGF-Systems und der Angiopoietine im zyklischen Endometrium und bei der embryonalen Implantation untersucht werden. Da es bislang noch kein geeignetes *in vitro* Modell des Systems Embryo-Endometrium gibt, konnten die beiden Anteile des Reproduktionssystems lediglich getrennt voneinander betrachtet werden. Es wurden Komponenten des VEGF-Systems und der Familie der Angiopoietine im Präimplantationsembryo nachgewiesen, ebenso wie die Expression und die zyklische Regulation der Angiopoietine im Endometrium analysiert. Um das System Embryo-Endometrium zu simulieren, wurden endometriale Zellen mit dem Embryo-spezifischen Faktor HCG inkubiert und eine Beeinflussung der endometrialen VEGF- und Angiopoietin- Expression durch diesen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass VEGF im Embryo in allen Stadien der Präimplantationsentwicklung exprimiert wird, insbesondere in den späten Blastozysten, d.h. zum Zeitpunkt der Implantation. Dabei dominieren die frei sezernierten, angiogenetisch aktiven VEGF-Isoformen. Auch die transmembranären VEGF-Rezeptoren 1 und 2 werden vom Präimplantationsembryo exprimiert, nicht jedoch die lösliche Form des VEGFR-1, die als Antagonist fungiert. Die mRNA von Ang-1 konnte in Präimplantationsembryonen aller Entwicklungsstadien ebenfalls nachgewiesen werden. Somit könnte embryonales VEGF bzw. Ang-1, vor allem das des späten Blastozysten, die im Rahmen der embryonalen Implantation erforderliche Angiogenese auf autokrin/ parakrine Weise stimulieren. Die Expression von VEGF und Ang-1 in der Zygote lässt zusätzliche, bisher noch unbekannte Funktionen der Wachstumsfaktoren vermuten. Es konnte nachgewiesen werden, dass die endometriale mRNA-Expression und Protein-Distribution von Ang-1 zyklusabhängig ist, mit einer maximalen Expression in der Sekretionsphase. Dies steht in Einklang mit der in dieser Zyklusphase notwendigen Reifung und Stabilisierung der in der Proliferationsphase gebildeten Blutgefäße und lässt

auf eine Regulation der Ang-1 *in vivo* Expression durch die Steroidhormone schließen. Im Gegensatz dazu werden Ang-2 bzw. der Rezeptor Tie-2 in nativem Endometrium über den Menstruationszyklus hinweg nahezu gleich exprimiert. *In vitro* jedoch wird die endometriale Expression beider Angiopoietine sowie ihres Rezeptors durch die Steroidhormone beeinflusst, wie in Zellkulturexperimenten mit primären, endometrialen Zellen beobachtet werden konnte. Durch Kulturexperimente der Primärzellen mit dem embryonalen Faktor HCG konnte die endometriale Expression von VEGF und den Angiopoietinen stimuliert werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass der Embryo durch Sekretion von HCG die Expression angiogenetischer Faktoren im Endometrium beeinflusst und so die angiogenetischen Prozesse an der Implantationsstelle stimuliert.

6 LITERATUR

- Albert C., Garrido N., Mercader A. *et al.* (2002): The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Hum. Reprod.*, **8**, 409-418
- Barleon B., Sozzani S., Zhou D. *et al.* (1996): Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt. *Blood*, **87**, 3336-3343
- Beier-Hellwig K., Sterzik K., Beier H.M. (1998): Molekulare und zellbiologische Aspekte der endometrialen Rezeptivität und ihre Diagnostik. *Der Gynäkologe* **4** (31), 325-338
- Bhatt H., Brunet L.J., Stewart C.L. (1991): Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88** (24), 11408-12
- Bonduelle M.L., Dodd R., Libaers I. *et al.* (1988): Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod*, **3** (7), 909-14
- Braude P., Bolton V., Moor, S. (1988): Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, **332**, 459-61
- Breier G., Albrecht U., Sterrer, Risau W. (1992): Expression of vascular endothelial growth factor during embryogenic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, **114**, 521-532
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G. *et al.* (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-439
- Carson D.D., De Souza M.M., Regisford E.G.C. (1998): Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. *Bio. Essays*, **20**, 577-583
- Chakraborty I., Das S.K., Dey S.K. (1995): Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *J. Endocrinol.*, **147**, 339-352
- Chard T. (1996): Cytokines in implantation. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 385-396
- Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M., Rajput-Williams J. *et al.* (1993): Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol. Reprod.*, **48**, 1120-1128

- Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M., Boocock C.A. *et al.* (1994): Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol. Reprod.*, **51** 524-530
- Cheng S.Y., Nagane M., Huang H.J.S., Cavenee W.K. (1997): Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF(121) and VEGF(165) but not VEGF(189). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12081-12087
- Clark D.E., Smith S.K., Sharkey A.M., Charnock-Jones D.S. (1996): Localization of VEGF and expression of its receptors Flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum. Reprod.*, **11**, 1090-1098
- Clark D.E., Smith, S.K., He, Y. *et al.* (1998): A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol. Reprod.*, **59**, 1540-1548
- Classen-Linke I., Kusche M., Knauthe R. *et al.* (1997): Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive endothelial cells. *Cell. Tissue Res.*, **287**, 171
- Clegg K.B., Pikó L. (1983): Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A)⁺ RNA in early mouse embryos. *Dev. Biol.*, **95**, 331-341
- Cohen T., Gitay-Goren H., Sharon R. *et al.* (1995): VEGF₁₂₁ a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan-sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11322-11326
- Coutifaris C., Babaloo G.O., Feinberg R.F. *et al.* (1990): Purified human cytotrophoblasts: surrogates for the blastocyst in *in vitro* models of implantation? *Adv. Ass. Reprod. Techn.*, 687-695
- Cullinan E.B., Abbondanzo S.J., Anderson P.S. *et al.* (1996): Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*, **93** (7), 3115-20
- Das S.K., Wang, X.N., Paria, B.C. *et al.* (1994): Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of ist apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, **120**, 1071-1083

- Davis S., Aldrich T.H., Jones P.F. *et al.* (1996): Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, **87**, 1161-1169.
- Deutsches IVF Register (DIR) (2000): Bundesgeschäftsstelle Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bismarckallee 8-12, 23795 Bad Segeberg
- De Vries C., Escobedo J.A., Ueno H. *et al.* (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, **255**, 989-991
- Dietl J. (2001): Implantation aus molekularer Sicht. *Der Gynäkologe*, **6** (34), 485-493
- Dinarello C.A. (1994): The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB*, **8**, 1314-1325
- Dumont D.J., Gradwohl G., Fong G.H. *et al.* (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.*, **8**, 1897-1909
- ESchG (1990): Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz – ESchG). Bundesgesetzblatt Teil I, 2746-2748.
- Ferenczy A., Bertrand G., Gelfand M.M. (1979): Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **133**, 859-867
- Ferrara N., Henzel W.J. (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 851-858
- Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H. *et al.* (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, **380**, 439-442
- Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.*, **18**, 4-25
- Folkman J., Shing Y. (1992): Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931-10934
- Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M. *et al.* (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, **376**, 66-70
- Fong G.H., Zhang L., Bryce D.M., Peng J. (1999): Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, **126**, 3015-3025
- Fujisawa H., Kitsukawa T. (1998): Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **8**, 587-592

- Gannon B.J., Carati C.J., Verco C.J. (1997): Endometrial perfusion across the normal human menstrual cycle assessed by laser Doppler fluxmetry. *Hum. Reprod.*, **12**, 132-139
- Goodger A.M., Rogers P.A.W. (1994): Endometrial endothelial cell proliferation during the menstrual cycle. *Hum. Reprod.*, **9**, 399-405
- Gordon J.D., Shifren J.L., Foulk R.A. *et al.* (1995): Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol. Surv.*, **50**, 688-697
- Gordon J.D., Messiano S., Zaloudek C.J., Raffe R.B. (1996): Vascular endothelial growth factor localization in the human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **81**, 353-359
- Gospodarowicz D., Abraham J.A., Schilling J. (1989): Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **86**, 7311-7315
- Haimovici F., Anderson D.J. (1993): Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth in vitro. *Biol. Reprod.*, **48** (1), 124-130
- Halder J.B., Zhao X., Soker S. *et al.* (2000): Differential expression of VEGF isoforms and VEGF₁₆₄-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests an role for VEGF₁₆₄ in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis*, **26**, 213-224
- Hambartsoumian E. (1998): Endometrial *leukemia inhibitory factor* (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **39**, 137-143
- Han S.W., Lei Z.M., Rao Ch.V. (1999): Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **147**, 7-16
- Hanahan D., Folkman J. (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364
- Hanahan D. (1997): Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, **277**, 48-50.
- He Z., Tessier-Lavigne M. (1997): Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III: *Cell*, **90**, 739-751

- He Y., Smith S.K., Day K.A. *et al.* (1999): Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (flt-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol.*, **13**, 537-545
- Hewett P., Nijjar S., Shams M. *et al.* (2001): Down-regulation of angiopoietin-1 expression in menorrhagia. *Am. J. Pathol.*, **160**, 773-780
- Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J. *et al.* (1998): flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Dev. Biol.*, **95**, 9349-9354
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. (1994): Manipulating the mouse embryo - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-109
- Hornung D., Lebovic D.I., Shifren J.L. *et al.* (1998): Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertil. Steril.*, **69**, 909-915
- Houck K.A., Ferrara N., Winer J. *et al.* (1991): The vascular endothelial growth factor family. Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.*, **5**, 1806-1814
- Jakeman L.B., Armanini M., Philips H.S., Ferrara N. (1993): Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleotid acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*, **133**, 848-859
- Jonca F., Ortega N., Gleizes P.E., Bertrand N., Plouet J. (1997): Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6'-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24203-24209
- Joukov V., Kaipainen A., Jeltsch M. *et al.* (1997): Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell Physiol.*, **173**, 211-215
- Kaiserman-Abramof I.R., Padykula H.A. (1989): Angiogenesis in the postovulatory primate endometrium: the coiled arteriolar system. *Anat. Rec.*, **224**, 479-489
- Katoh O., Tauchi H., Kawaishi, K. *et al.* (1995): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.*, **55**, 5687-5692
- Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G. *et al.* (1989): Vascular permeability factor, an endothelial mitogen related to PDGF. *Science*, **246**, 1309-1312

- Kendall R.L., Thomas K.A. (1993): Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10705-10709
- Kendall R.L., Wang G., Thomas K.A. (1996): Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 324-328
- Keyt B.A., Nguyen H.V., Berleau L.T. *et al.* (1996): Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5638-5646
- Kitsukawa T., Shimono A., Kawakami A. *et al.* (1997): Neuropilin-Semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron*, **19**, 995-1005
- Klagsbrun M., D'Amore P.A. (1991): Regulators of angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol.*, **53**, 217-239
- Klauber N., Rohan R.M., Flynn E. *et al.* (1997): Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nature Med.*, **3**, 443-446
- Kolodkin A.L., Levengood D.V., Rowe E.G. *et al.* (1997): Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, **90**, 753-762
- Krikun G., Schatz F., Finlay T. *et al.* (2000): Expression of angiopoietin-2 by human endometrial endothelial cells: regulation by hypoxia and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 159-63
- Krüssel J.S., Huang H.Y., Wen Y. *et al.* (1997): Different patterns of interleukin-1 beta- (IL-1 β), interleukin-1 receptor antagonist- (IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I- (IL-1R tI) mRNA-expression in single preimplantation mouse embryos at various developmental stages. *J. Reprod. Immunol.*, **34** (2), 103-20
- Krüssel J.S., Huang H.Y., Simón C. (1998): Single blastomeres within human preimplantation embryos express different amounts of messenger ribonucleic acid for β -actin and interleukin-1 receptor type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 953-959
- Krüssel J.S., Casan E.M., Raga F., Hirchenhain J. *et al.* (1999): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) transmembraneous receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 452-458

- Krüssel J.S., Behr B., Hirchenhain J. *et al.* (2000): Expression of *vascular endothelial growth factor* mRNA in human preimplantation embryos derived from tripronuclear zygotes. *Fertil. Steril.*, **74**, 1220-1226
- Krüssel J.S., Behr B., Milki A.A. *et al.* (2001): *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.*, **7**, 57-63
- Kumazaki T., Hamada K., Mitsui Y. (1994): Detection of mRNA expression in a single cell by direct RT-PCR. *Biotechniques*, **16**, 1017-1019
- Lass A., Weiser W., Munafo A., Loumaye E. (2001): Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fert. Steril.*, **76**, 1091-1096
- Laird S.M., Tuckerman E.M., Dalton C.F. *et al.* (1997): The production of *leukemia inhibitory factor* by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum. Reprod.*, **12**, 569-574
- Lebovic D.I., Shifren J.L., Ryan I.P. *et al.* (2000): Ovarian steroid and cytokine modulation of human endometrial angiogenesis. *Hum. Reprod.*, **15**, Suppl. 3, 67-77
- Lessey B.A., Damjanovich L., Contifaris C. *et al.* (1992): Integrin adhesion molecules in the human endometrium. *J. Clin. Invest.*, **90**, 188-195
- Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J. *et al.* (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-1309
- Li J., Perrella M.A., Tsai J.C. *et al.* (1995): Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 β in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 308-312
- Li X.F., Charnock-Jones D.S., Zhang E. *et al.* (2001): Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 1823-34
- Licht P., Russu V., Wildt L. (2001): On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Sem. Reprod. Med.*, **19**, 37-47
- Ma L., mylene Y., Maas R. (1999): genetic control of uterine receptivity during implantation. *Sem. Reprod. Endocrinol.*, **17**, 205-216
- Maas J.W.M., Groothuis P.G., Dunselman G.A.J. *et al.* (2001): Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Hum. Reprod.*, **16**, 1557-1561

- Maisonpierre P.C., Suri C., Jones P.F. *et al.* (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, **277**, 55-60
- Markee J.E. (1940): Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.*, **28**, 219-308
- Matthews W., Jordan C.T., Gavi, M. *et al.* (1991): A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hemopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **88**, 9026-9030
- McClue N., Healy D.L., Rogers P.A.W. *et al.* (1994): Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet*, **344**, 235-236
- Moore K.L. (1997): Embryologie.
- Murray M.J., Lessey B.A. (1999): Embryo Implantation and Tumor metastasis. Common pathways of invasion and angiogenesis. *Sem. Reprod. Endocrin.*, **17** (3), 275-290
- Navot D., Bergh P.A., Laufer N. (1995): The ovarian hyperstimulation syndrome. In *Reproductive Endocrinology, surgery and technology*, 2215-2232
- Neufeld G., Cohen T., Gitay-Goren H. *et al.* (1996) Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer Metast. Rev.*, **15**, 153-158
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z., (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, **13**, 9-22
- Neulen J., Yan Z., Raczek S. *et al.* (1995): Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 1967-1971
- Norwitz E.R., Schust D.J., Fisher S.J. (2001): Implantation and the survival of the early pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, **345** (19), 1400-1408
- Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. (1950): Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.*, **1**, 3-25
- Pavelock K., Braas K.M., Ouafik L. *et al.* (2001): Differential expression and regulation of the vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and neuropilin-2 in rat uterus. *Endocrinology*, **142**, 613-622

- Paria B.C., Ma W., Tan J. *et al.* (2001): Cellular and molecular response of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *PNAS*, **98**, 1047-1052
- Park J.E., Keller G.A., Ferrara N. (1993): The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 1317-1326
- Park *et al.* (1994): Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25646-25654
- Poltorak Z., Cohen T., Sivan R. *et al.* (1997): VEGF₁₄₅ is a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7151-7158
- Plouet J., Moukadi H. (1990): Characterization of the receptor of vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22071-22074
- Psychoyos A. (1973): Endocrine control of egg implantation. In *Handbook of physiology*, 187-215
- Puri M.C., Rossant J., Alitalo K. *et al.* (1995): The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J.*, **14**, 5884-5891
- Rees M.C.P., Bicknell R. (1998): Angiogenesis in the endometrium. *Angiogenesis*, **2**, 29-35
- Risau W., Flamme I. (1995): Vasculogenesis. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 73-91
- Risau W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674
- Robinson J.R., Stringer S.E. (1995): The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Science*, **114**, 853-865
- Rogers P.A.W., Gargett C.E. (1998): Endometrial angiogenesis. *Angiogenesis*, **2**, 287-294
- Rohde L.H., Carson D.D. (1993): Heparin-like glykosaminoglycans participate in binding of a human trophoblastic cell line (JAR) to a human uterine epithelial cell line (RL95). *J. Cell Physiol.*, **155**, 185-196
- Satayaswaroop P.G., Bressler R.S., De La Pena M.M., Gurpide E. (1979): Isolation and culture of endometrial glands. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **48**, 639
- Sato T.N., Tozawa Y., Deutsch U. *et al.* (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, **376**, 70-74

- Schmidt-Matthiesen H. (1968): Endometrium und Nidation beim Menschen. *Z. Geburtsh. Gynäkol.*, **168**, 113-125
- Schlessinger J., Lax I., Lemmon M. (1995): Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors? *Cell*, **83**, 357-360
- Seetharam L., Gotoh N., Maru Y. et al. (1995): A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF). *Oncogene*, **10**, 135-147
- Selvaggi L., Ribatti D., Loverro G. et al. (1995): Angiogenesis in pre-eclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **59** (1), 83-89
- Senger D.R., Galli S.J., Dvora, A.M. et al. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983-985
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P. et al. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, **376**, 62-66
- Shalaby F., Ho J., Stanford W.L. (1997): A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*, **89**, 981-990
- Sharkey A.M., Charnock-Jones D.S., Boocock C.A. et al. (1993): Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J. Reprod. Fert.*, **99**, 609-615
- Sharkey A.M., Dellow K., Blayney M. et al. (1995): Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol. Reprod.*, **53**, 974-981
- Sheth K.V., Roca G.L., Al-Sedairy S.T. et al. (1991): Prediction of succesful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid. *Fertil. steril.*, **55** (5), 952-7
- Shibuya M., Yamaguchi S., Yaman, A. et al. (1990): Nucleotide sequence and expression of a novel receptor tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, **5**, 519-524
- Shibuya M. (1995): Role of the VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, **67**, 281-316.
- Shifren J.L., Tseng J.F., Zaloudek C.J. et al. (1996): 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. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 3112-3118

- Shima D.T., Kuroki M., Deutsch U. *et al.* (1996): The mouse gene for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3877-3883
- Shweiki , D., Itin A., Neufeld G. *et al.* (1993): Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a hormonally regulated angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, **91**, 2235-2243
- Simón C., Piquette G.N., Frances A., Polan M.L. (1993): Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.*, **77** (2), 549-55
- Simón C., Frances A., Piquett, G.N, *et al.* (1994): Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*, **134** (2), 521-8
- Simón *et al.* (1995): Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Hum Reprod.*, **10** Suppl 2, 43-54
- Simón C., Frances A., Piquette G.N. *et al.* (1997a): Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.*, **82** (8), 2607-16
- Simón C., Mercader A., Gimeno M.J., Pellice, A. (1997b): The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol.*, **37** (1), 64-72
- Simón C., Valbuena D., Krüssel J.S. *et al.* (1998): Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil. Steril.*, **70**, 896-906
- Sinowatz F., Seitz J., Bergmann M., Petzoldt U., Fanghänel J. (1999): Embryologie des Menschen.
- Smith S.K. (1998): Angiogenesis, *vascular endothelial growth factor* and the endometrium. *Hum. Reprod. Update*, **4**, 509-519
- Soker *et al.* (1996): Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF₁₆₅ via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5761-5767
- Soker *et al.* (1998): Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, **92**, 735-745
- Stewart C.L., Kaspar P., Brunet,L.J. *et al.* (1992): Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, **359** (6390), 76-9
- Suri C., Jones P.F., Patan S. *et al.* (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, **87**, 1171-1180

- Suri C., McClain C., Thurston G. *et al.* (1998): Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, **282**, 468-471
- Surveyor *et al.* (1995): Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, **136** (8), 3639-47
- Tabibzadeh S. (1992): Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Reprod.* **7**, 876-882
- Takahashi T., Shirasawa T., Miyak, K. *et al.* (1995): Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF-expression in renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**, 218-226
- Tazuke S.I., Giudice L.C. (1996): Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal: embryonic interactions. *Semin Reprod Endocrinol*, **14** (3), 231-45
- Terman B.I., Carrion M.E., Kovacs E. *et al.* (1991): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 1579-1586
- Terman B.I., Dougher-Vermazen M. (1996): Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metast. Rev.*, **15**, 159-163.
- Tesarik J., Kopečný V., Plachnot M., Mandelbaum J. (1986): Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, **78** (2), 463-470
- Thie M., Harrach-Ruprecht B., Sauer H. *et al.* (1995): Cell adhesion to the apical pole of endothelium: a function of cell polarity. *Eur. J. Cell Biol.*, **66**, 180
- Tischer E., Mitchell R., Hartman T. *et al.* (1991): The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954
- Torrey D.S., Holt V.J., Keenan J.A. *et al.* (1996): Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil. Steril.*, **66**, 72-80
- Tsai S.J., Wiltbank M.C. (1996): Quantification of mRNA using competitive RT/PCR with standard curve methodology. *Biotechniques*, **21**, 862-866
- Vaisman N., Gospodarowicz D., Neufeld G. (1990): Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19461-19466
- Valenzuela D.M., Griffiths J.A., Rojas J. *et al.* (1999): Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1904-1909

- Vogiagis D., Salamonsen L.A. (1999): The role of leukemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J. Endocrinol.*, **160**, 181-190
- Waltenberger J., Mayr U., Pentz S., Hombach V. (1994): Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26988-26995
- Yang Z.M., Chen D.B., Le S.P., Harper M.J.K. (1996): Differential hormonal regulation of leukaemia inhibitory factor (LIF) in rabbit and mouse uterus. *Mol. Reprod. Dev.*, **38**, 148-152
- Yang X.J., Cepko C.L. (1996): Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J. Neurosci.*, **16**, 6089-6099

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. H.G. Bender danke ich für die Möglichkeit, im reproduktionsmedizinischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu können. Ich danke ihm auch für die Übernahme des Referates meiner Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. Jens Hirchenhain möchte ich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seine fortwährende Bereitschaft alle nur möglichen Fragen zu beantworten und die vielen wertvollen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben, danken.

Herrn Dr. Jan-Steffen Krüssel danke ich für die Idee zu dem Forschungsprojekt, das diese Arbeit ermöglicht hat, und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Professor Dr. F. Wunderlich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an meiner Arbeit.

Den Mitarbeitern des endokrinologischen und des onkologischen Labors der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf, insbesondere Frau Erika Maaß und Frau Prof. Dr. Koldovsky, möchte ich an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ich danke den Mitarbeitern des histologischen Labors für ihre Unterstützung bezüglich der Paraffinschnitte und der Immunhistochemie.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Roman, meinen Eltern und Schwiegereltern, ohne deren Unterstützung und Geduld die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich diese Dissertation in der vorgelegten ohne in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.