

**Regulation der Progesteron-Rezeptor-
Isoformen A und B im humanen Endometrium
und ihr Einfluss auf spezifische Zielgene
(Amphiregulin und Calcitonin)**

Stephanie Rebhan

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Regulation der Progesteron-Rezeptor-Isoformen A und B im humanen
Endometrium und ihr Einfluss auf spezifische Zielgene
(Amphiregulin und Calcitonin)

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Stephanie Rebhan

aus Hannover

Berichter: Frau Privatdozentin
Dr.rer.nat. Irmgard Claßen-Linke

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Joseph Neulen

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Probengewinnung	7
2.1.2 Datierung des Zyklustages	7
2.1.3 Einteilung der Zyklusphasen	8
2.2 Immunhistochemie	9
2.2.1 Übersicht der verwendeten Antikörper	9
2.2.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten	10
2.2.3 Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten	11
2.3 ELISA - Calcitonin	14
2.4 Proteinbiochemische Methoden	15
2.4.1 Verwendetes Material	15
2.4.2 Zelltrennung	15
2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	15
2.4.4 Übersicht der verwendeten Antikörper	16
2.4.5 SDS-Gelelektrophorese	16
2.4.6 Western Blot	17
2.4.7 Immunreaktion am Western Blot	18
2.5 Molekularbiologische Methoden	21
2.5.1 RNA-Isolierung	21
2.5.2 cDNA-Synthese - Reverse Transkription	21
2.5.3 PCR (Polymerasekettenreaktion) - Amphiregulin und Calcitonin	22
2.5.4 Primer	22
2.5.5 Detektion des PCR-Produkts	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Datierung des Zyklustages	24
3.2 Untersuchungen der Progesteron-Rezeptor-Isoformen A und B	26
3.2.1 Immunhistochemie	26
Nachweis des Progesteron-Rezeptors an Paraffinschnitten	26
Untersuchung verschiedener PR-Antikörper	26
3.2.2 Immunfluoreszenz	28
3.2.3 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung	34
Quantitative Auswertung	41
Kontrollversuche	44
3.2.4 Western Blots	46
Spezifität der PR-Antikörper	46
Western Blots an Abradatmaterial	47
Western Blots an getrennten Zellen	50
3.3 Untersuchung der Amphiregulin-Expression in humanem Endometrium	52
3.3.1 Immunhistochemie	52
Kontrollen	52
3.3.2 Amphiregulin-Doppelmarkierungen	56
Doppelmarkierung von Amphiregulin mit CD 68	56
Doppelmarkierung von Amphiregulin mit dem Progesteronrezeptor	57
3.3.3 Western Blot-Gradientengel mit Endometriumabradaten	59
3.3.4 RT-PCR	60
3.4 Untersuchung der Calcitonin-Expression in humanem Endometrium	61
3.4.1 Immunhistochemie	61
3.4.2 ELISA	61
3.4.3 RT-PCR	63

4. Diskussion	64
4.1 Progesteron-Rezeptor Isoformen A und B	64
4.1.1 Molekulare Grundlagen	64
Koaktivatoren und Korepressoren	65
4.1.2 Verteilung der PR-Isoformen im humanen Endometrium	67
4.1.3 Unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen des Progesteronrezeptors	70
4.1.4 Mögliche klinische Relevanz der unterschiedlichen Regulation von PR A und PR B	71
PR A und B und Endometrium-Karzinom	71
PR A und B und Endometriose	73
4.2 Progesteron-regulierte Marker der rezeptiven Phase des Endometriums	74
4.2.1 Expression und Progesteronregulation von Amhiregulin	74
4.2.2 Expression und Progesteronregulation von Calcitonin	75
5. Zusammenfassung	77
6. Liste der Endometriumproben	79
7. Anhang	84
8. Literaturverzeichnis	86
9. Danksagung	93

1. Einleitung

Die Reproduktionsbiologie beschäftigt sich mit der Untersuchung der Zellbiologie des Endometriums und der Erforschung der Faktoren, die für eine erfolgreiche Implantation notwendig sind. Das menschliche Endometrium unterliegt zyklischen Veränderungen, die durch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron gesteuert werden. Unter Estradioleinfluss kommt es in der ersten Zyklushälfte, der Follikelphase, zur Proliferation des endometrialen Gewebes, in der zweiten Zyklusphase, der Sekretions- oder Lutealphase, überwiegt das Steroidhormon Progesteron, das die sekretorische Umwandlung des Endometriums bewirkt.

Endokrine und parakrine Faktoren ermöglichen unter Progesteroneinfluss die Implantation des Embryos. Die Fähigkeit des Endometriums, eine befruchtete Eizelle aufzunehmen, ist zeitlich sehr begrenzt. Das sogenannte „Implantationsfenster“, der Zeitraum, in dem die Einnistung möglich ist, liegt ungefähr zwischen dem 6. und dem 10. postovulatorischen Tag (Kao et al., 2002; Beier et al., 1997). Die in dieser Phase durch Progesteron induzierten Moleküle können, sofern sie als implantationsspezifisch identifiziert werden, wichtige Marker für die Rezeptivität des Endometriums darstellen (Giudice, 1999). Implantationsmarker könnten in der Reproduktionsmedizin zur Bestimmung des geeigneten Zeitpunkts des Embryotransfers genutzt werden und somit die Implantationsrate erhöhen. Unser Institut arbeitet seit Jahren an der Identifikation und Charakterisierung solcher progesteronregulierter Markerkandidaten (z.B. Uteroglobulin, $\alpha\beta_3$, LIF) (Beier und Beier-Hellwig, 1998; Beier-Hellwig et al., 1998; Classen-Linke et al., 1998; Classen-Linke et al., 2000). Die Untersuchungen werden an primären Endometriumzellkulturen und an endometrialen Gewebeschnitten durchgeführt sowie im Vergleich dazu an der Brustkrebszelllinie T 47-D, die Steroidhormonrezeptoren besitzt.

Die Steroidhormonrezeptoren wirken als nukleäre Transkriptionsfaktoren, die nach der Bindung des Liganden die Transkription bestimmter Gene aktivieren. D.h., die Steroidhormone können nur dort wirken, wo sich ihre Rezeptoren befinden. Die Lokalisation und zyklusabhängige Expression des Progesteronrezeptors (beide Isoformen) im humanen Endometrium wurde bereits untersucht (Snijders et al., 1992). Während der Proliferationsphase ist er sowohl in den Drüsen als auch im Stroma stark positiv, etwa ab der Mitte der progesterondominierten Lutealphase wird er im Drüsenepithel downreguliert und ist zum Ende der Sekretionsphase kaum noch nachzuweisen. Die Stromazellen zeigen auch in der Sekretionsphase noch deutliche Anfärbungen für den PR. Seit 1983 (Horwitz und Alexander) ist bekannt, dass der PR in zwei verschiedenen Isoformen A und B vorliegt. In ihrer Aminosäuresequenz sind diese beiden Formen identisch, aber die größere PR-B Isoform verfügt über zusätzliche 164 AS an ihrem N-terminalen Ende. Es wurde postuliert, dass beide Isoformen sehr unterschiedliche Funktionen haben und auch unterschiedliche Gene regulieren. So wurde beispielsweise an Knock-Out-Mäusen für die jeweiligen Isoformen (PRAKO bzw. PRBKO) gezeigt, dass die Aktivierung von PR B eine proliferative Wirkung auf das Endometrium hat, wohingegen die Bindung von Progesteron an PR A eher wachstumsinhibierend wirkt. Während die Ablation der PR-B-Isoform keine Veränderungen am Endometrium zur Folge hatte, wiesen die PRAKO-Mäuse schwere endometriale Störungen auf: Eine Implantation fand nicht statt und die Dezidualisierung blieb aus. Unter Progesteron- und Östrogenstimulation kam es bei den PRAKO-Mäusen aber zur Proliferation des Endometriums, die stärker war als sie bei PRKO-Mäusen (bei denen beide PR-Isoformen fehlen) beobachtet wurde (Conneely, 2001). Es gibt Anzeichen dafür, dass beide Isoformen z.T. unterschiedliche Gene regulieren. Die neue Microarray-Technik ermöglicht ein Screening nach progesteronregulierten Proteinen. Durch

dieses Verfahren wurden viele Gene identifiziert, die nur von einer PR-Isoform reguliert zu werden scheinen (Richer et al., 2002).

Zwei Proteine, die als Kandidaten für progesteronregulierte Marker der rezeptiven Phase gehandelt werden, wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre zyklusabhängige Funktion und mögliche PR-Isoform-Spezifität untersucht: Calcitonin und Amphiregulin. Untersuchungen an Mäusen wiesen Amphiregulin als einen für die Implantationsphase spezifischen und progesteronregulierten Marker aus (Das et al., 1995). Im murinen Uterus wird eine selektive Regulation von Amphiregulin durch die PR-A-Isoform diskutiert (Mulac-Jericevic et al., 2000). Im Rattenendometrium ist Calcitonin ein Marker für die rezeptive Phase des Endometriums, es wird als in der Maus ebenfalls vornehmlich durch die PR-A-Isoform reguliert diskutiert (Mulac-Jericevic et al., 2000). Im humanen Endometrium wurde eine Rolle für Calcitonin als Marker für die rezeptive Phase postuliert (Kumar et al., 1998b). In der vorliegenden Studie wurden beide Proteine mittels Immunhistochemie und PCR, Amphiregulin auch mit Western-Blot nachgewiesen und auf eine mögliche Progesteronregulation untersucht.

Zwar wurde die Expression des PR und ihr zyklischer Verlauf im humanen Endometrium bereits beschrieben, über die Verteilung der PR-Isoformen A und B im humanen Endometrium lagen bisher jedoch noch keine übereinstimmenden Ergebnisse vor. Die Arbeitsgruppe um Mote und Clark etablierte PR A- bzw. PR B-spezifische monoklonale Antikörper und untersuchte die Expression der beiden Isoformen am humanen Endometrium mittels einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung (Mote et al., 1999). Wang et al. (1998) verglichen Endometriumschnitte, die mit einem nur gegen die B-Form des PR gerichteten Antikörper markiert waren, mit für beide Rezeptorformen angefärbten Schnitten. Beide Untersuchungen fanden eine stärkere Expression beider Isoformen während der Proliferationsphase und ein Überwiegen der PR A-Form in der Sekretionsphase im Stroma. Mote et al. beschrieben jedoch ein Vorherrschen von PR B im Epithel in der mittelsekretorischen Phase. Mangal et al. (1997) wiesen eine zyklusabhängige Expression von PR A und PR B im humanen Endometrium mittels Western Blot nach.

Vorrangiges Ziel der Arbeit war die Untersuchung der zyklusabhängigen, isoformspezifischen Expression des PR im humanen Endometrium. Um die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zu überprüfen, wurden monoklonale, isoformspezifische Antikörper verwendet, um die Verteilung beider Isoformen während des Zyklus darzustellen.

Nach der Abklärung der Spezifität der Antikörper wurden dazu die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

- 1.) Vergleichende Untersuchungen an Endometriumschnitten unter Verwendung von spezifischen PR A- bzw. PR B-Antikörpern und einem Antikörper, der beide Isoformen erkennt, mittels einfacher Immunfluoreszenz
- 2.) Doppelmarkierungen, bei denen PR A und PR B spezifisch markiert wurden und ihre Koexpression in einzelnen Zellen sichtbar gemacht wurde
- 3.) Western Blot-Untersuchungen an Endometriumabradatproben der verschiedenen Zyklustage mit den isoformspezifischen Antikörpern
- 4.) Western Blots an Endometriumproben, die direkt nach ihrer Gewinnung in Stroma- und Epithelzellfraktion getrennt wurden. Dieses Verfahren ist besonders aussagekräftig, da es die differenzierte Darstellung der Expression in Stroma und Drüsen ermöglicht.

Die Kenntnis der Funktion und der Verteilungsmuster des PR im normalen Endometrium trägt zunächst zu einem besseren Verständnis der physiologischen Vorgänge bei, kann aber

auch Anhaltspunkte für mögliche klinische Anwendungen bieten. Forschungsansätze bestehen in Bezug auf das Endometrium- und Mamma-Karzinom sowie die Endometriose.

Bei der Endometriose handelt es sich um die Ansiedlung endometrialen Gewebes außerhalb des Endometriums, beispielsweise im Myometrium, den Tuben oder den Ovarien. Mehr als 100 000 Frauen in Deutschland leiden unter dieser Erkrankung, die mit starken Schmerzen und häufig mit Infertilität assoziiert ist (Keck, Neulen, Breckwoldt, 2002).

Heute werden die drei genannten Erkrankungen u.a. mit der hormonellen Progesterontherapie behandelt. Bei der Endometriose wird angenommen, dass Gestagene zur Dezidualisierung von Endometrioseherden führen, gefolgt von Stromaödem, Leukozyteninfiltration und Apoptose (Keck, Neulen, Breckwoldt, 2002)

Dabei ist auffällig, dass einige Karzinom- bzw. Endometriosepatienten gut auf die Therapie ansprechen, andere hingegen gar nicht oder nur ungenügend. Während bei den Karzinomen vor Beginn der Hormontherapie der Rezeptorstatus überprüft wird, trifft dies bei Endometriose nicht zu. Wenn die Endometrioseherde aber keine oder nur wenige Progesteronrezeptoren exprimieren, kann Progesteron seine Wirkung nicht entfalten und die Therapie nicht wirken. Außerdem gilt es, die oben beschriebenen Erkenntnisse über die funktionellen Unterschiede der PR-Isoformen A und B zu beachten. Bei der Bestimmung des Progesteronrezeptorstatus von Brust- oder Gebärmutterkarzinomen wird derzeit nicht nach PR A und B unterschieden. In mehreren Studien wurde, wie oben erwähnt, eine proliferative Rolle für PR B und eine wachstumsinhibierende Wirkung mit hemmendem Einfluss auf PR B für PR A beschrieben. Zudem gilt PR B als hormonsensitiver als PR A (Giangrande et al., 1997).

Eine Studie zur Brustkrebsentstehung (Mote et al., 2002) beschreibt den Verlust der koordinierten Expression von PR A und B und die Verschiebung des Verhältnisses der beiden Isoformen zueinander als ein frühes Ereignis in der Brustkrebsentstehung. Obgleich für das Endometriumkarzinom bisher z.T. widersprüchliche Studien über das PR A/PR B-Verhältnis existieren, was sich durch sehr unterschiedliches Studiendesign erklärt (Karzinomzelllinien, Mäuseversuche, histologische Untersuchungen des Endometriums), scheint Einigkeit darüber zu bestehen, dass ein im Vergleich zu normalem Endometrium gestörtes PR A/PR B-Verhältnis vorliegt (z.B. Arnett-Mansfield, 2001). Die Verteilung der PR-Isoformen in Endometrioseherden wurde bisher nur in einer Studie untersucht (Attia et al., 2000), die in den Herden nur PR A, nicht aber die B-Isoform nachweisen konnte. In parallel entnommenen eutopen Endometriumproben derselben Patientinnen fanden sich hingegen beide Isoformen. Das Nicht-Ansprechen auf eine Progesterontherapie ließe sich mit der Abwesenheit der proliferativen B-Isoform erklären. Ein therapeutischer Ansatz für diese bedeutenden gynäkologischen Erkrankungen könnte die Entwicklung selektiver PR-A-Agonisten sein, die den antiproliferativen Effekt der PR-A-Isoform verstärken und einen protektiven Effekt gegen Hyperplasien sowohl des Endometriums als auch der Brustdrüse haben sollen (Mulac-Jericevic, 2003). Vor der klinischen Anwendung solcher selektiver Progesteronrezeptormodulatoren ist es aber wichtig, zunächst die unterschiedlichen physiologischen Funktionen und die Bedeutung des Verhältnisses von PR A- und PR B-Expression im gesunden humanen Endometrium zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Für alle Untersuchungen wurden endometriale Gewebeproben verwandt, die aus den Uteri normo-ovulatorischer Frauen unmittelbar nach Hysterektomie gewonnen wurden. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit den gynäkologischen Abteilungen des Luisenhospitals, des Marienhospitals und des Universitätsklinikums in Aachen sowie dem St.-Antonius-Hospital Eschweiler. Die häufigsten Indikationen für die Hysterektomien waren Uterus myomatosus und Descensus uteri. Die Frauen waren zwischen 30 und 50 Jahre alt (Durchschnittsalter ca. 41 Jahre), hatten einen regelmäßigen Zyklus und nahmen keine Hormonpräparate ein. Die Ethikkommission genehmigte die Entnahme der Gewebeproben aus den Hysterektomiepräparaten.

2.1.1 Probengewinnung

Die Endometriumproben wurden aus dem Korpus- und Fundusbereich entnommen, und so geschnitten, dass sie endometriales Oberflächenepithel an der Oberseite und Myometrium an der gegenüberliegenden Seite enthielten. Ein Gewebeblock mit einem Querschnitt von 0,5 cm und einer Kantenlänge von 1,0 cm wurde jeweils direkt in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren, ein weiterer in 3,7% neutral gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die Einbettung in Paraffin wurden die Proben, nachdem sie über Nacht bei 4°C in 3,7% Formalin inkubiert worden waren, für je 1 h in PBS und 0,86% NaCl gespült, um dann in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert zu werden. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin.

Nach Entnahme der Gewebeproben wurde zusätzlich endometriales Material mit Hilfe eines Skalpells vom Myometrium abgeschabt. Das auf diese Weise gewonnene Abradatmaterial wurde in Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) oder Lysispuffer (RNAwiz™, Ambion, USA) aufgenommen oder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Man kann bei dieser Art der Probengewinnung davon ausgehen, dass es sich nur um endometriales Gewebe handelt, da das Myometrium im Gegensatz zum Endometrium widerstandsfähigeres Gewebe darstellt, das bei dem Abschabeprozess nicht mit abgelöst wird.

2.1.2 Datierung des Zyklustages

Hormonbestimmungen (17β -Estradiol, LH und Progesteron) des Serums vom Tag der Hysterektomie wurden regelmäßig durchgeführt. Die Bestimmung des Zyklustages der einzelnen Proben erfolgte anhand einer erweiterten histologischen Datierung nach Noyes et al. (1950) unter Zuhilfenahme der immunhistochemischen Nachweise für Ki 67 (MIB 1) als Marker der Proliferation, des Progesteronrezeptors (Antikörper gegen beide Isoformen, Klon 10A9, Immunotech, D) und einer Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung zur Beurteilung der Morphologie. Zusätzlich wurden für die Datierung die Steroidhormonbestimmung (Hormonlabor, Prof. Neulen, Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, UK Aachen) im Serum und die Zyklusanamnese berücksichtigt.

2.1.3 Einteilung der Zyklusphasen

Tab. 1: Einteilung der Zyklusphasen nach Hendrickson und Kempson (1997)

Zyklusphase	Korrespondierende Zyklustage
Menstruation	1-3
Frühe Proliferationsphase	4-7
Mittlere Proliferationsphase	8-10
Späte Proliferationsphase	11-14
Frühe Sekretionsphase	15-19 bzw. Tag 1-5 post ovulationem (p.o.)
Mittlere Sekretionsphase	20-23 bzw. Tag 6-9 p.o.
Späte Sekretionsphase	24-28 bzw. Tag 10-14 p.o.

Frühe und späte Proliferationsphase unterscheiden sich durch die zunehmende Schlängelung der Drüsen, die durch das starke Wachstum in dieser Zyklusphase bedingt ist. Die mittlere lässt sich von der späten Proliferationsphase anhand der Abnahme des in der mittleren Proliferationsphase maximalen Stromaödems abgrenzen. Die frühe Sekretionsphase ist ab dem 2. Tag p.o. durch das Auftreten subnukleärer Vakuolen charakterisiert, die ab dem 4. Tag p.o. abnehmen. Ab dem 5. Tag p.o. erscheint deutlich die intraluminale Sekretion. Ab dem 7. Tag p.o. wird Glykogen ins Lumen abgegeben. Die Spiralarteriolen in der Funktionalis werden ab dem 9. Tag p.o. sichtbar. Darauf folgt die Prädezidualisierung um den 9. bzw. 10. Tag p.o., die Drüsen haben die typische Sägeblattform und es werden vermehrt Lymphozyten beobachtet.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Übersicht der verwendeten Antikörper

Tab. 2: Liste der für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper

Antigen	Klon	Quelle	Antikörper- Verdünnung Par- affinschnitte	Antikörper- verdünnung Kryostatschnitte -Immunfluoreszenz
Primärantikörper				
Monoklonal (Maus)				
Progesteronrezeptor, Isoform B, PR Ab 6	hPRa 6	Neomarkers, USA	1:200	1:10
Progesteronrezeptor, Isoform A, PR Ab 7	hPRa 7	Neomarkers, USA	---	1:10
Progesteronrezeptor, beide Isoformen (PR Ab 8)	hPRa2 + hPRa3	Neomarkers, USA	1:100	1:10
PR B	SAN27	Novocastra, UK	1:200	
PR (beide Isoformen)	10A9	Immunotech, Hamburg, D	1:10	
Ki-67	MIB 1	Dianova, Hamburg, D	1:5	
CD 68	PG-M1	Dako, Hamburg, D	1:500	
Calcitonin	CAL-3-F5	Dako, Hamburg, D	1:5	
polyklonal (Kaninchen)				
Calcitonin	IHC 6001	Peninsula Labo- ratories, USA	1:500	
Calcitonin		Zymed Laborato- ries, USA	1:50	
Amphiregulin	Ab-1	Neomarkers, USA	1:200	
Sekundärantikörper				
Texas Red Anti-Maus IgG		Fluorescent Anti- Mouse IgG-Kit, Vector Laborato- ries, USA		1:25
FITC Anti-Maus IgG		Fluorescent Anti- Mouse IgG-Kit, Vector Laborato- ries, USA		1:25

Tab.3: Kontrollen: IgG nicht-immunisierter Tiere

Kontrollen	Quelle
Normal rabbit IgG	Dako, Hamburg, D
Normal mouse IgG	Dako, Hamburg, D

2.2.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Proben werden mit einem Leica-Schlittenmikrotom mit 4 µm Schnittstärke hergestellt und auf APES-beschichtete Objektträger aufgenommen. Die Schnitte werden über Nacht bei 37°C getrocknet, damit sie dem Objektträger fest anhaften. Bevor die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden, erfolgt eine mindestens zwei-stündige Inkubation im Wärmeschrank bei 56°C sowie die Entparaffinisierung in Xylol für zwei mal 10 min. Nach dem Durchlaufen der Alkoholreihe werden die Schnitte kurz in Aqua dest. und anschließend 3-mal 10 min in PBS gespült. Zur Detektion bestimmter Antigene sind verschiedene Vorbehandlungen notwendig. Alle in dieser Arbeit nachgewiesenen Antigene (Amphiregulin, CD 68, PR, Calcitonin) erforderten eine Mikrowellenvorbehandlung zur Demaskierung der Bindestellen. Dazu wurden die Objektträger in Citratpuffer (Stammlösung A 0,1 M Citronensäure, Stammlösung B 0,1 M Natriumcitrat; 4,5 ml Lösung A + 20,5 ml Lösung B auf 250 ml Aqua dest.) für 4 x 5 min bei 600 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung der Gewebeschnitte folgt ein Spülschritt in PBS (3 x in 10 min), an den sich die Blockierung der endogenen Peroxidase anschließt. Dazu werden die Objektträger in 3%igem H₂O₂ für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Spülschritt (PBS 3 x in 10 min) erfolgt die Blockierung mit Serum, die die unspezifische Bindung des Primärantikörpers an geladene Gewebsproteine, z.B. Kollagen, verhindern soll.

Für die Reaktionen mit monoklonalen Primärantikörpern aus der Maus wurde das Histostain Kit der Firma Zymed (Zymed Laboratories, San Francisco, USA) verwendet, für polyklonale Primärantikörper aus dem Kaninchen das Zymed Histostain *plus* Kit. Die Inkubation mit den Serumlösungen der jeweiligen Kits erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Direkt nach der Serumblockierung wird der in 1,5%igem PBS/BSA verdünnte, spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtete Primärantikörper aufgetragen und über Nacht im Kühlraum (bei 4°C) inkubiert. Nach einem gründlichen Spülschritt (3 x in 10 min PBS) wird der zweite Antikörper (unverdünnt), der gegen das Immunglobulin (IgG) des ersten Antikörpers gerichtet ist, auf die Schnitte aufgebracht. Dieser mit Biotin konjugierte zweite Antikörper stammte ebenfalls aus den entsprechenden Zymed Kits, die Inkubationszeit beträgt 30 min. In einem weiteren Schritt wird der Zweitantikörper mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gekoppelt (ebenfalls aus dem Zymed Kit, 10 min).

Bei der hier verwendeten Streptavidin-Biotin-Methode nutzt man die Fähigkeit des Streptavidin, 4 Moleküle Biotin zu binden, als Verstärkungseffekt für die Reaktion. Die freien Stellen des Streptavidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des zweiten Antikörpers. Es folgt ein weiterer Spülschritt (3 x in 10 min PBS) bevor das Enzym Meerrettichperoxidase, ebenfalls Bestandteil des zuletzt aufgetragenen Streptavidin-Peroxidase-Konjugates, durch Reaktion mit dem Chromogen AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, ebenfalls Zymed) sichtbar gemacht wird.

Die Reaktion erfolgt unter mikroskopischer Kontrolle und wird durch Spülen der Schnitte in Aqua dest. gestoppt. Zur Verbesserung des Kontrasts innerhalb eines Präparats empfiehlt es

sich in einigen Fällen, nach der eigentlichen Reaktion eine Gegenfärbung anzuschließen. Dazu wird eine Hämatoxylinlösung auf die Schnitte aufgetropft, die nach ca. 30 s mit Leitungswasser und danach Aqua dest. abgespült wird. Die Schnitte werden mit KAISER's Glycerol-gelatine eingedeckelt.

Kontrollen

Um unspezifische Reaktionen der Primärantikörper auszuschließen, wurden bei allen Reaktionen Kontrollen mitgeführt, die die gleiche Behandlung erfuhren wie die Gewebeschnitte der jeweiligen Reaktion. Anstelle des Primärantikörpers wurden die Kontrollschnitte jedoch mit Immunglobulinen der gleichen Proteinkonzentration von nicht immunisierten Tieren inkubiert. Das Non-Immunserum stammte dabei jeweils von der Tierspezies, in der der Primärantikörper hergestellt wurde, in diesem Fall für monoklonale Antikörper von der Maus und für polyklonale Antikörper vom Kaninchen. Die Kontrollpräparate dienen als Leerpräparate, jede dabei auftretende positive Färbung ist als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion zu bewerten.

Doppelmarkierungen an Paraffinschnitten

Um in demselben Gewebeschnitt mehrere Antigene sichtbar zu machen und beispielsweise die Expression zweier Antigene in derselben Zelle zu zeigen, bedient man sich der Doppelmarkierung. Im Prinzip werden zwei Immunreaktionen hintereinander durchgeführt, wobei zwei verschiedene Chromogene zur Detektion eingesetzt werden. Die hier durchgeführte Doppelmarkierung diente der gleichzeitigen Darstellung von Amphiregulin und dem Makrophagen-Marker CD 68. Zunächst wurden die Schnitte wie oben beschrieben vorbehandelt, und es erfolgte eine Immunreaktion mit Amphiregulin unter Benutzung des Vector-Kits (Vector SG Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, USA), wobei hier Diaminobenzidine (DAB) als Chromogen diente. Nach einem gründlichen Spülschritt in PBS schließt sich die zweite Reaktion mit CD 68 als Primärantikörper und unter Verwendung des Zymed Kits direkt an, die Vorbehandlung entfällt. Das Chromogen zur Detektion war hier AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Zymed).

2.2.3 Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten

Fluoreszenz bedeutet das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Bei Anregung mit kurzwelligen, energiereichen Strahlen emittiert das Fluorochrom langwellige, energieärmere Strahlen definierter Wellenlänge. Die hier verwendeten Fluorochrome FITC und Texas Red geben bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 495-500 nm bzw. 596-604 nm eine Emissionsstrahlung von 514-521 nm bzw. 606-615 nm ab, die als grün bzw. rot erscheint.

Bei der hier durchgeführten Methode handelt es sich um eine indirekte Immunfluoreszenzmethode: Zunächst reagiert der Primärantikörper spezifisch mit dem Antigen, in einem zweiten Schritt bindet der an ein Fluorochrom gekoppelte Sekundärantikörper an den Primärantikörper.

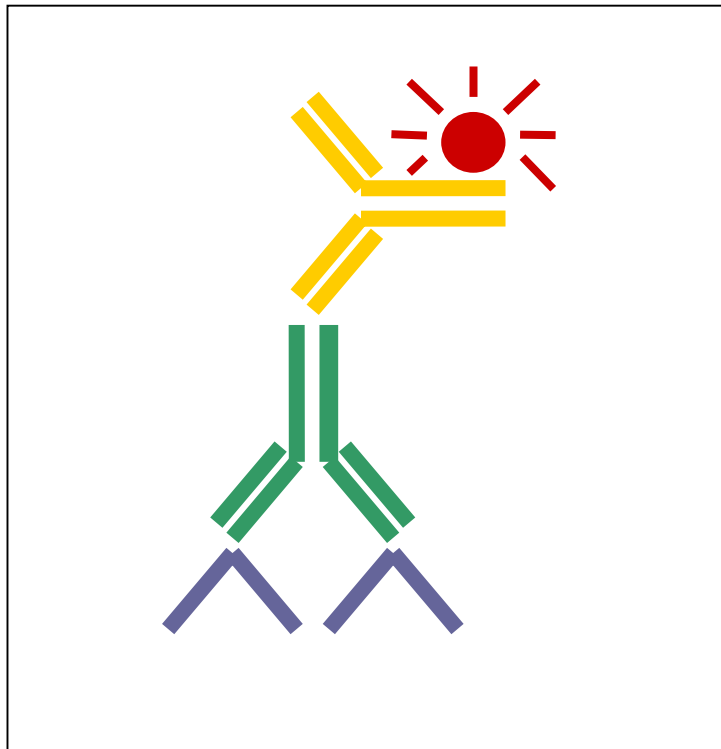


Abb. 2: Indirekte Immunfluoreszenz

Legende:

- *Antigen*
- *Primärantikörper*
- *Sekundärantikörper*
- *Fluorochrom*

Der Sekundärantikörper ist an ein Fluorochrom (hier FITC oder Texas Red) gekoppelt, das bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Energie in Form von Licht emittiert.

Die bei -40°C gelagerten Kryoproben werden mit Tissue Tek (Miles 4583, Elkhart, USA) auf einem Filterpapier fixiert und auf einen Probenhalter angefroren. Mit dem Kryostaten (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) werden $10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, die wegen der besseren Anhaftung auf APES-beschichtete Objektträger aufgezogen werden.

Für den Nachweis des Progesteronrezeptors, eines nukleären Transkriptionsfaktors, an Kryostatschnitten ist eine besondere Fixierung der Gewebeschnitte notwendig, um die Demaskierung des Antigens und damit die Sichtbarmachung des Rezeptors zu gewährleisten. Die Objektträger werden zunächst 10 min bei Raumtemperatur in 3,7% PBS-gepuffertem Formalin fixiert. Direkt danach werden sie in -20°C kaltes Methanol überführt und darin 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 2 min in -20°C kaltem Aceton folgt ein Spülschritt (3 x 5 min in PBS), an den sich die Immunreaktion anschließt.

Die Serumblockierung zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbung durch geladene Proteinmoleküle wie Kollagen erfolgt mit Pferdeserum, das 1:20 in 1,5% PBS/BSA verdünnt wird. Die Schnitte werden in der feuchten Kammer für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

An die Blockierung schließt sich direkt die Inkubation des Primärantikörpers an, die entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum (bei 4°C) erfolgen kann. Als Primärantikörper wurden hier die Progesteron-Rezeptor-Antikörper Ab 6, 7 und 8 der Firma Neomarkers in einer Verdünnung von 1:10 in 1,5% PBS/BSA verwendet. Die Schnitte werden sorgfältig gespült (3 x 5 min in PBS), bevor der fluoreszenzmarkierte, an FITC-gekoppelte Sekundärantikörper (Fluorescent Anti-Mouse IgG Kit, Vector Laboratories, USA) in einer Verdünnung von 1:25 in PBS aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wird. Nach einem weiteren Spülschritt werden die Schnitte mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, USA), das das Ausbleichen der Fluoreszenzfärbung verzögern soll, eingedeckelt und im Dunkeln aufbewahrt. Mit einem geeigneten Film (Fujifilm Superia, 1600 ASA), der ein sehr hohes Auflösungsvermögen bietet, können die Versuchsergebnisse mit einer mikroskopintegrierten Kleinbildkamera (Axiophot, Zeiss) oder einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera (AxioCam, Zeiss) dokumentiert werden.

Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Der Progesteronrezeptor-Antikörper Ab 6, der spezifisch die B-Isoform des Rezeptors erkennt, und der Antikörper Ab 7, der spezifisch gegen die A-Isoform des Rezeptors gerichtet ist, wurden für die Doppelmarkierung verwendet. Die erste Immunreaktion erfolgte unter Verwendung von Ab 6 als Primärantikörper, der über Nacht im Kühlraum (4°C) inkubiert wurde. Der Sekundärantikörper ist in diesem Fall mit dem Fluorochrom Texas Red gekoppelt (Fluorescent Anti-Mouse IgG Kit, Vector Laboratories, USA). Nach einem Spülschritt mit PBS schließt sich die zweite Immunreaktion direkt an, als Primärantikörper dient nun der Progesteronrezeptor-Antikörper Ab 7, während der Sekundärantikörper mit dem Fluorochrom FITC gekoppelt (Fluorescent Anti-Mouse IgG Kit, s.o.) ist. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, die Spülschritte sind dieselben wie oben beschrieben. Die Schnitte werden mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) eingedeckelt und im Dunkeln aufbewahrt.

Um auszuschließen, dass die unterschiedlich starken Anfärbungen für beide Antikörper lediglich aus der unterschiedlichen Intensität des jeweiligen Fluorochroms resultierten, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem die Sekundärantikörper für den gleichen Primärantikörper einmal mit Texas Red und einmal mit FITC gekoppelt wurden. Die mitgeführten Kontrollen wurden nach demselben Protokoll behandelt, anstelle der beiden monoklonalen Primärantikörper wurden die Schnitte mit Non-Immun-Serum aus der Maus inkubiert. Jegliche Anfärbung bedeutet bei dieser Negativkontrolle eine unspezifische Reaktion. Zur photographischen Dokumentation der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden die Schnitte mit einem Mikroskop (Axiovert, Zeiss), das über die notwendigen speziellen Filter für die Fluoreszenzmikroskopie verfügt, mikroskopisch betrachtet und mit einer Digitalkamera (AxioCam, Zeiss) aufgenommen. Die zugehörige Software AxioVision 3.0 (Zeiss) bietet die Möglichkeit, Mehrkanalbilder aufzunehmen, so dass man für einen Gewebeschnitt innerhalb einer Bilddatei sowohl die einzelnen Kanäle (FITC, Rhodamin und Durchlicht) als auch die Überlagerung der Kanäle (hier FITC und Rhodamin) betrachten kann.

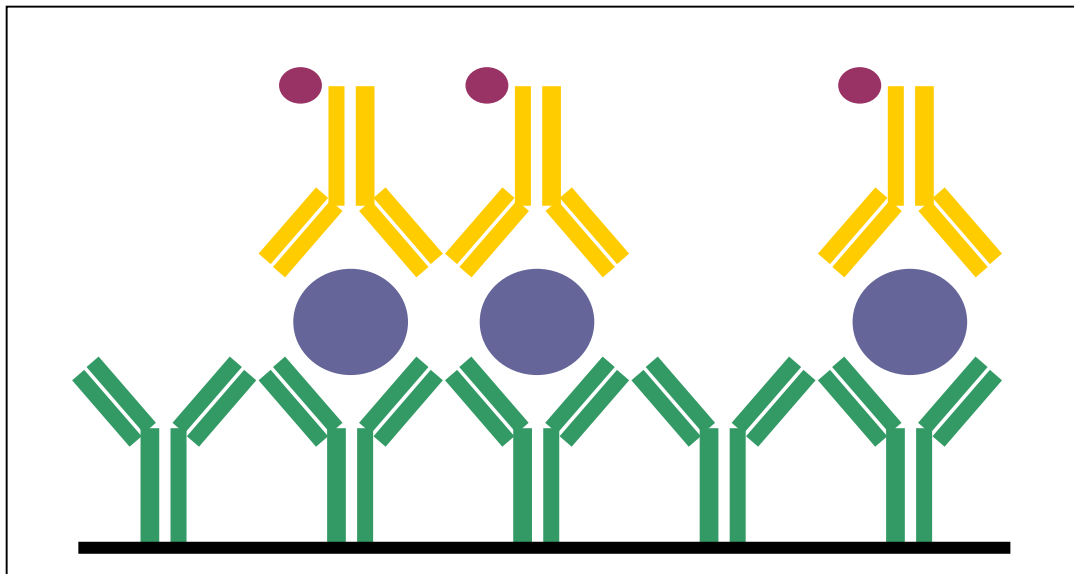


Abb. 3: „Sandwich“- ELISA

Legende:

- auf Mikrotiterplatte fixierter Antikörper
- Antigen
- Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichtet ist
- Peroxidase

Das Antigen bindet an den spezifischen Antikörper, mit denen die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Ein zweiter spezifischer Antikörper, der ein anderes Epitop des Antigens erkennt, bindet an die gebundenen Antigene. Dieser zweite Antikörper ist peroxidasegekoppelt, unter Zugabe des Peroxidasesubstrats kommt es zu einer Farbreaktion, wobei die gemessene Absorption proportional zum Calcitonin Gehalt der Probe ist.

Auswertung der Gewebsschnitte

Die Anzahl der FITC- bzw. Texas-Red positiven Zellen wurde an 15 Gewebsschnitten nach Epithel- und Stromazellen getrennt ausgezählt. Ausserdem wurde die Intensität der Epithel- und Stromazellen mit Hilfe einer vierstufigen Skala bestimmt. (0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = positiv (mind. 50% der Zellen positiv) und 3 = stark positiv (> 75% der Zellen positiv)). Die unspezifische Eigenfluoreszenz der Drüsen in der Sekretionsphase wurde mit „1“ (schwach positiv) bewertet.

2.3 ELISA - Calcitonin

Die Abkürzung ELISA steht für „Enzyme linked immuno sorbent assay“ und beruht ebenfalls auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Die Mikrotiterplatte des ELISA ist mit spezifischen Antikörpern beschichtet. Die Methode bietet die Möglichkeit zur Quantifizierung des Messergebnisses und weist eine sehr hohe Sensitivität auf. Hier wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA für Calcitonin (IBL, Hamburg) verwendet, der eine Sensitivität von 0,5 pg/ml aufwies. Normale Serumwerte für Calcitonin liegen zwischen 0-5 pg/ml. Dieser ELISA wurde für die Erkennung von medullären Schilddrüsenkarzinomen entwickelt, die vermehrt Calcitonin bilden. Der Calcitonin-ELISA wurde an Homogenaten von endometrialen Gewebeproben durchgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Verwendetes Material

Die proteinbiochemischen Analysen wurden an endometrialem Abradatmaterial sowie an direkt nach der Probengewinnung getrennten endometrialen Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden in allen Versuchen T-47D-Zellen verwendet, die sowohl über Progesteronrezeptor A und B verfügen als auch Amphiregulin exprimieren.

2.4.2 Zelltrennung

Um eine exakte Lokalisierung von Proteinen im Westernblot zu gewährleisten, ist es notwendig, die Stroma- und Epithelzellfraktion des Endometriums getrennt zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde die Expression des Progesteronrezeptors untersucht, die während des weiblichen Zyklus in Stroma- und Epithelzellen unterschiedlich verläuft, was eine eigenständige Betrachtung der Kompartimente erforderte.

Das frisch gewonnene Abradatmaterial wird auf Eis ins Labor transportiert und auf ein Uhrgläschen überführt. Unter sterilen Bedingungen wird das endometriale Gewebe mit 2 Skalpellern zerkleinert. Das nun dickflüssige Material wird mit einer 0,125%igen Kollagenaselösung (in DMEM) bei 37°C auf dem Schüttler für eine Stunde angedaut. Durch mehrfaches Pipettieren mit einer Spritze mit Stahlkanüle wird die mechanische Auftrennung unterstützt. Die eigentliche Zelltrennung erfolgt mit Hilfe von feinmaschigen Sieben. Zunächst wird die Zellmasse durch ein Metallsieb mit 250 µm Porengröße gegeben, im Filtrat befinden sich sowohl Stroma- als auch Epithelzellen. Es folgt ein weiterer Filtrierschritt, nun mit der Porengröße 35 µm, bei dem die Stromazellen im Filtrat enthalten sind und die größeren Epithelzellen in dem feinen Netz aufgefangen werden. Drüsenfragmente und Epithelzellen werden vom Netz abgespült und ebenso wie das die Stromazellen enthaltende Filtrat abzentrifugiert (2 x 10 min, 700 rpm), Collagenaserückstände werden durch Spülen entfernt. Bei Endometriumproben ab dem 22. Zyklustag werden zusätzlich die LGLs (large granular lymphocytes) abgetrennt. Die getrennten Epithel- und Stromazellfraktionen werden zur Weiterverarbeitung mit molekularbiologischen (in RNeasyTM-Lysispuffer, Ambion, USA) oder proteinbiochemischen (in NH₄HCO₃) Methoden suspendiert, oder es wird nur das Pellet eingefroren.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um später eine zumindest semiquantitative Analyse der eingesetzten Proteinproben zu gewährleisten, muss gesichert sein, dass für jede Probe die gleiche Ausgangsmenge an Protein eingesetzt wurde. Deshalb wird die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mit der Methode nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bildung von Kupferkomplexen an den Peptidbindungen der Proteine, diese werden wiederum durch ein Phenolreagenz reduziert und färben sich dadurch intensiv blau. Als Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe von Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet.

Den Proben wird zunächst das Reagenz mit den Kupferionen zugesetzt, nach Ausbildung der Kupferkomplexe wird das reduzierende Folinreagenz hinzugegeben.

Nach 40 min Inkubationszeit wird die Probe gegen einen Leerwert bei 650 nm mit einem Plattenreader (SLT *Rainbow*, SLT Labinstrument, D) gemessen.

Bei bekannter Proteinkonzentration ist es nun möglich, die Probenmengen so zu berechnen, dass jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt wird. Die Proben werden aliquotiert, und um das Auftragen größerer Proteinmengen in weniger Volumen zu ermöglichen, werden sie über Nacht lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6, Christ, Osterode).

2.4.4 Übersicht der verwendeten Antikörper

Tab. 4: Liste der für Western Blots verwendeten Antikörper und ihre Verdünnung

Antigen	Klon	Quelle	Antikörperversdünnung Western Blots
Primärantikörper			
monoklonal (Maus)			
Progesteronrezeptor, Isoform B, PR Ab 6	hPRa 6	Neomarkers, USA	1:200
Progesteronrezeptor, Isoform A, PR Ab 7	hPRa 7	Neomarkers, USA	1: 100
Progesteronrezeptor, beide Isoformen (PR Ab 8)	hPRa2 + hPRA3	Neomarkers, USA	1:200
Progesteronrezeptor Isoform B	SAN2 7	Novocastra, UK	1:500
polyklonal (Kaninchen)			
Amphiregulin	Ab-1	Neomarkers, USA	1:1000
Sekundärantikörper			
Ziege-Anti-Maus IgG-HRP gekoppelt	sc2055	Santa Cruz, Heidelberg, D	1:5000
Esel-Anti-Kaninchen IgG-HRP gekoppelt	sc2077	Santa Cruz, Heidelberg, D	1:5000

2.4.5 SDS-Gelelektrophorese

Das zugrundeliegende Prinzip der SDS-Gelelektrophorese beruht darauf, dass die aufzutrennenden Proteine durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und proportional zu ihrer Größe negativ geladen werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld wird dadurch abhängig von ihrem Molekulargewicht, was eine Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit dem Verfahren nach Lämmli (1970) durchgeführt. Durch die Verwendung von 5% Mercaptoethanol wurden reduzierende Bedingungen hergestellt, so dass eventuelle Untereinheiten der Proteine getrennt wurden.

Für die Versuche mit Progesteron-Rezeptoren wurden 10%ige, homogene SDS-Trenngele gegossen. Für die Versuche mit Amphiregulin, dessen Molekulargewicht wesentlich geringer ist, wurden Gradientengele verwendet, die besonders für kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht bis 10 kDa geeignet sind. Die Gele enthalten einen kontinuierlichen Gradienten von 8,3% bis 16,6% Acrylamid. Dazu wurde eine 8,3%ige und eine 16,6%ige Acrylamidlösung angesetzt, beide wurden in einen Gradientenmischer eingefüllt und zwischen zwei Glasplatten gegossen.

Sowohl die homogenen SDS-Gele als auch die Gradientengele wurden mit Aqua dest. überschichtet und polymerisierten über Nacht aus. Dann wurden sie mit einem 4,5%igen Sammelgel überschichtet, in das ein 15-zähliger Kamm eingebracht wurde, der die Probenfächer bildete. Das Sammelgel war nach ca. 1h vollständig polymerisiert.

Die gefriergetrockneten Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen, gut durchmischt („gevortext“), und für 3 min bei 100°C in einem Heizblock gekocht. Darauf folgte ein kurzer Zentrifugationsschritt. Nach Entfernung des Kamms aus dem Sammelgel wurden die Probenfächer mit Laufpuffer gespült. Mit einer Hamiltonspritze wurden je 30 µg Protein in 12 µl Probenpuffer pro Probe aufgetragen. Außerdem wurde jeweils ein Bandenmarker (Rainbow™, Amersham, USA) als Kontrolle mit aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung in der mit einem Tris-Glycin-Puffer (Laufpuffer) gefüllten Elektrophoresekammer erfolgte bei einer Spannung von 600 V und einer Stromstärke von maximal 50 mA und dauerte ca. 1:20 h.

2.4.6 Western Blot

„Blotting“ bedeutet die Übertragung von Molekülen (aus dem Gel mit den aufgetrennten Proteinen) auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran.

Für den Blot benötigt man neben einer Polyvinylidenedifluorid-(PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, Porengröße 0,45 µm, Proteinausschlussgröße 10 kDa) insgesamt 6 Blätter Filterpapier, die auf die Größe der Membran (ca. 17 x 13 cm) zugeschnitten wurden. Es wurde ein diskontinuierliches Puffersystem eingesetzt, der unterschiedliche Salzgehalt der Puffer unterstützt die Wanderungsrichtung der geladenen Moleküle. Die drei Transferpuffer unterscheiden sich im pH-Wert und im Tris/HCl-Anteil. Transfer-Puffer 1 enthält zusätzlich Capronsäure.

Zur Vorbereitung des Blots wurden 3 Blatt Filterpapier in Transferpuffer 1 eingeweicht. In Transferpuffer 2 wurden die zuvor mit Methanol benetzte Membran, darauf ein Blatt Filterpapier und zuoberst das Gel gelegt, nachdem das Sammelgel abgetrennt und verworfen worden war. Membran und Gel sollten sich bei diesem Schritt nicht berühren, da auf der hochempfindlichen Membran sonst Schmierer durch Proteine aus dem Gel entstehen. In Transferpuffer 3 wurden zwei weitere Blatt Filterpapier eingelegt. Filterpapiere, Gel und Membran wurden bei Raumtemperatur in den entsprechenden Puffern equilibriert. Die Blotkammer, die aus zwei horizontal angeordneten Graphitplatten als Elektroden besteht, wurde folgendermaßen zusammengesetzt: Der untere Teil der Kammer stellt die Anode dar. Zunächst wurden die beiden Filterblätter aus Transferpuffer 3 aufgelegt. Darauf wurden ein in Transferpuffer 2 getränktes Filterpapier, die Membran und nun direkt auf die Membran das Gel geschichtet. Den Abschluss bildeten die drei Filterpapiere aus Transferpuffer 1. Nachdem die Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen entfernt wurden, wurde die Blotkammer mit der zweiten Graphitplatte, die die Kathode darstellt, verschlossen und mit einem Gewicht beschwert.

Das Prinzip dieses Semi-dry-Blots beruht darauf, dass die negativ geladenen Proteine wiederum im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern, in diesem Fall also vom Gel auf die Membran übertragen („geblottet“) werden. Der Transfer der Proteine dauerte bei 5mA/cm² und 15°C ca. 40 min.

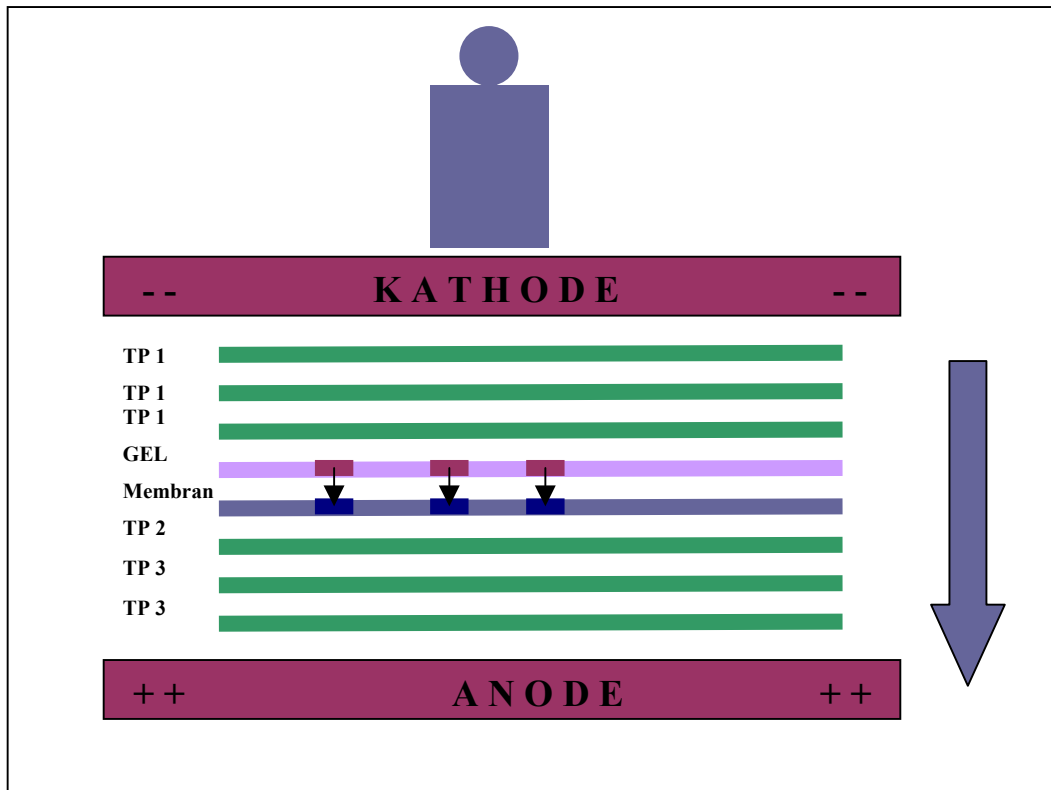


Abb. 4: Blot-Aufbau. Der Pfeil zeigt die Wanderungsrichtung der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode an.

Legende:

- Filterpapier (TP = Transferpuffer)
- Gel
- Membran

2.4.7 Immunreaktion am Western Blot

Nach der vollständigen Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran wird die Membran mit 5%iger Milchpulverlösung (in TBS Tween) in Haushaltsfolie eingeschweißt und für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Reaktionsschritt dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend erfolgte die Inkubation des (in 5%iger Milchpulverlösung verdünnten) Primärantikörpers über Nacht im Kühlraum unter leichtem Schütteln, dazu wurde die Membran ebenfalls in Haushaltsfolie eingeschweißt. Nach einem Spülschritt (3 x 10 min in TBS Tween) wurde der zweite Antikörper in 1%igem Milchpulver 1:5000 verdünnt und die Membran 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgte ein weiterer Spülschritt (3 x 10 min TBS Tween). Der Sekundärantikörper ist an Meerrettichperoxidase gekoppelt (s. Abb.5).

Für die Detektion wurden entweder die ECL- oder die ECL *plus*-Western Blot Detektionsreagenzien (Amersham Biosciences, USA) verwendet. Bei Nutzung der ECL-Reagenzien wurden Substrat 1 und Substrat 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und so auf die Membran pipettiert, dass diese komplett benetzt war. Die Reaktion wurde nach 1 min durch Abgießen der Detektionslösung abgestoppt. Im ECL *plus* -System wurden 100 µl Substrat B zu 4 ml Substrat A gegeben und gut gemischt, die Reaktion wurde hier nach 5 min gestoppt.

„ECL“ steht für Enhanced Chemiluminescence. Lumineszenz bedeutet, dass eine sich in einem angeregten Zustand befindliche Substanz Energie in Form von Licht emittiert. Bei der Chemilumineszenz wird der angeregte Zustand durch eine chemische Reaktion erzeugt. Das ECL-System basiert auf der Reaktion der Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers mit der in der Detektionslösung enthaltenen Substanz Luminol. Das Luminol wird durch die Meerrettichperoxidase oxidiert und dabei durch weitere chemische Substanzen wie Phenole in seiner Wirkung verstärkt (engl.: enhanced). Im angeregten Zustand emittiert das Luminol Licht an den Stellen, wo eine Antigen-Antikörperbindung stattgefunden hat. Die Proteinbanden, an denen eine Antikörperbindung stattgefunden hat, können nun auf einem Film sichtbar gemacht werden, dazu wird die Membran in Saran-Folie eingewickelt und in eine Filmkammer gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Kodak X-Omat UV-Film mit unterschiedlichen Expositionszeiten aufgelegt und entwickelt. Das ECL *plus*-Detektionssystem funktioniert nach dem gleichen Prinzip, nutzt aber eine andere chemische Reaktion und verstärkt somit die Banden, an denen der Antikörper gebunden hat, noch intensiver.

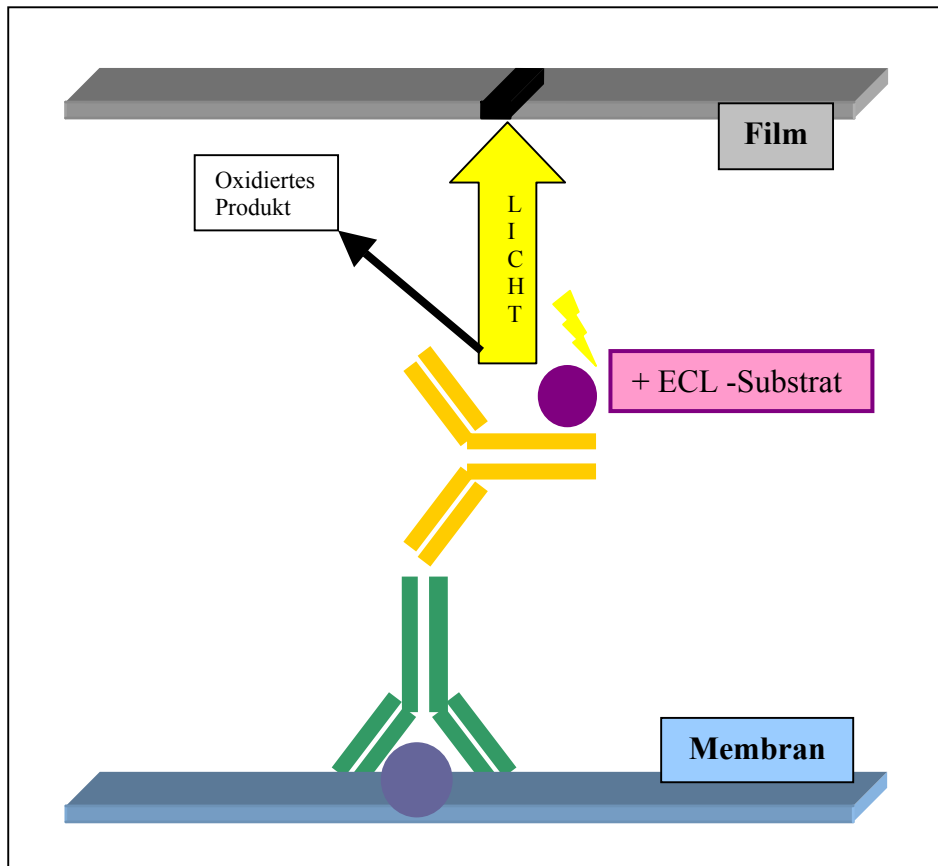


Abb. 5: Schema Immunreaktion Western-Blot

Legende:

- Antigen
- Primärantikörper
- Sekundärantikörper
- Meerrettichperoxidase
- Chemische Reaktion
- Bande

Der Primärantikörper reagiert mit dem vom Gel auf die Membran übertragenen Protein. Der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Unter Zugabe des ECL-Substrats führt eine chemische Reaktion zur Emission von Licht, die auf dem Film in Form von geschwärzten Banden sichtbar wird (nach Produktinformation für ECL Western blotting detection reagents and analysis system, Amersham Biosciences, USA).

Auswertung der Western Blots

Die Dichte (OD) der PR-spezifischen Western-Blot-Banden (bei 94 bzw. 114 kDa) wurde mit einer Kodak Image Station 440 (Kodak, Stuttgart, Germany) für die einzelnen Proben bestimmt. Der für die Banden ermittelte Dichtewert wurde zur Normierung durch den Wert für die jeweilige Bande bei 46 kDa geteilt. Dieses Protein ist in allen Proben mit dem gleichen Anteil vorhanden. Diese Auswertung ermöglicht den quantitativen Vergleich des PR-Gehalts der Endometriumproben im Western Blot.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Um einer Kontamination mit RNAsen vorzubeugen, fanden bei der Arbeit mit RNA nur mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) angesetzte Lösungen sowie RNase-freie Reagenzien und Pipettenspitzen Verwendung. Grundsätzlich wurde mit Handschuhen gearbeitet.

Die endometrialen Abradatproben wurden in 0,6 ml RNAwiz™-Lysispuffer (Ambion, USA) mit einem Potter-Homogenisator sehr sorgfältig homogenisiert. Anschließend wurde jedem Eppendorf-Gefäß 120 µl Chloroform zugegeben und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die RNAsen zu inaktivieren. Darauf folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (12 000 rpm bei 4°C). Der Überstand wurde in ein RNase-freies Gefäß überführt, und ca. 250 µl RNase-freies Ethanol zugegeben.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Quiagen, D). Dieses Verfahren nutzt bestimmte Silica-Gel-Membranen, an die die RNA bindet. Das zuvor zugegebene Ethanol schafft die geeigneten Bedingungen für die Bindung an die Membran. Die RNeasy®-Säule mit der Membran wurde in ein Sammelgefäß eingesetzt, die Probe auf die Säule pipettiert und kurz anzentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Es folgten ein Waschschriff mit RW1 Puffer sowie zwei Waschschriffe mit RPE-Puffer aus dem Kit, nach jedem Schritt wurde die Säule mit einem neuen Sammelgefäß kurz zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Säule auf ein neues Sammelgefäß überführt und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert, der Ansatz wurde kurz anzentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit demselben Gefäß wiederholt und das Eluat in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Zur Bestimmung der gewonnenen RNA-Menge wurden 5 µl RNA-Lösung auf 500 µl RNase-freies Wasser verdünnt und eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm durchgeführt. Der Reinheitsgrad der RNA wurde durch Bestimmung des Verhältnisses zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt.

Um DNA-Reste zu entfernen, wurden die Proben nach der RNA-Isolierung mit dem DNA-free-Kit (Ambion, USA) behandelt, das mit einer DNase-I-Verdauungsreaktion die Reste kontaminierender DNA abbaut.

2.5.2 cDNA-Synthese - Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA in DNA wurde mit Hilfe des 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Das Kit verwendet eine AMV (avian myo-

blastosis virus)-Reverse Transkriptase, die RNA- oder DNA-abhängig DNA synthetisiert. Je Probe wurden ca. 5 µg RNA in cDNA umgesetzt. Die Probe wurde mit einem Mastermix und oligo-dT Primern (dNTP set, Fermentas, Litauen) zunächst 10 min bei 25°C inkubiert, was zur Denaturierung der RNA führt, anschließend 1h bei 42°C, in dieser Phase erfolgt die cDNA-Synthese. Um die Reverse Transkriptase zu denaturieren, wurde der Probenansatz anschließend für 5 min auf 99°C erhitzt.

Die Qualität der synthetisierten cDNA kann durch ein DNA-Kontroll-Gel ermittelt werden. Anschließend wurde mit je 2µl der neu synthetisierten cDNA eine PCR (s. 2.4.3) mit einem Primer für das Housekeeping-Gen 1A durchgeführt. Das Agarosegel des PCR-Produkts wurde eingescannt und die Dicke der einzelnen Banden densitometrisch bestimmt. Der 1A-Bandendicke entsprechend wurde in einer zweiten 1A-PCR mehr oder weniger cDNA pro Probe eingesetzt und die entstandenen Banden wiederum verglichen. Durch diesen 1A-Angleich entscheidet sich, wieviel cDNA pro Endometriumprobe eingesetzt werden muss, um vergleichbare semiquantitative Ergebnisse zu erhalten.

2.5.3 PCR (Polymerasekettenreaktion) - Amphiregulin und Calcitonin

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf der Amplifikation einer bestimmten Nukleotidsequenz durch zwei Primer, die sich an die DNA-Einzelstränge anlagern. Mit Hilfe der Polymerase und den dem Ansatz zugegebenen Nukleotiden erfolgt dann die komplementäre Verlängerung (Elongation) des Strangs.

Um die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge zu spalten, ist ein Denaturierungsschritt (92°C, 1 min) notwendig. Für den zweiten Schritt, das sogenannte *Annealing*, bei dem sich die Primer an die nun als Einzelstrang vorliegende DNA anlagern, ist eine Temperatur von 52°C (Amphiregulin) bzw. 63°C (Calcitonin) erforderlich, diese Temperatur ist primerspezifisch. Auf die Anlagerung des Primers folgt die Polymerisation oder Elongation. Während dieser dritten Phase erfolgt die Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase (Roche, Mannheim), deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt (2 min). Nach dem Durchlaufen eines solchen Zyklus liegt wieder eine doppelsträngige DNA vor, da die Komplementierung an beiden Strängen der DNA abläuft, hat sich die DNA verdoppelt. Für die Amphiregulin-PCR wurden 40 Zyklen an einem Trio-Thermoblock TB1 Cyclet (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für die Calcitonin-PCR wurden 38 Zyklen mit demselben Thermoblock benötigt.

Die anfängliche Denaturierungs-Temperatur betrug 92°C (2 min), und die Temperatur für die letzte Elongation 72°C (3 min), anschließend wurde das PCR-Produkt auf 4°C gekühlt. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten PCR an Endometriumabradatproben wurde dem PCR-Master-Mix je nach Probe (entsprechend dem 1A-Angleich) zwischen 2 und 4 µl cDNA zugesetzt.

2.5.4 Primer

Amphiregulin Primer

Für die Amphiregulin-PCR wurden die Primer aus dem Human Amphiregulin Relative RT-PCR Kit von Ambion (USA) verwendet. Die Primersequenzen waren up 5' AGT ATG ATA ACG AAC CAC CAA AT und down 3' TTT TCC CCA CAC CGT TCA CC.

Calcitonin-Primer

Die verwendeten Calcitonin-Primer der Firma Sigma (Darmstadt, D) hatten folgende Sequenzen: *up* 5' CAG ATC TAA GCG GTG CGG TAA TC 3', *down* 5' GAC ATC TCT GGG GGA CTC AAA G 3'.

2.5.5 Detektion des PCR-Produkts

Um die amplifizierten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde je Probe 35 µl des PCR-Produkts mit je 10 µl DNA-loading auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Das Agarosegel enthielt auf 100 ml TAE-Puffer 4 µl Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und anschließend mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden kann. Zur Identifizierung der DNA-Banden wurde neben den Proben ein Bandenmarker (Gene Ruler™, 100 bp ladder, ready to use, Gibco) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei ca. 95 mV für 1,5 – 2 h unter Verwendung von TAE als Laufpuffer. Das Gel wurde auf dem Transilluminationstisch fotografiert und später eingescannt.

3. Ergebnisse

Ziel der Untersuchungen war die genaue Lokalisation der PR-Isoformen A und B in den verschiedenen Zelltypen des Endometriums (Stroma vs. Epithel) sowie die Veränderung ihrer Expression im Verlauf des Zyklus. Des Weiteren wurden zwei als progesteronabhängig diskutierte Proteine, Amphiregulin und Calcitonin, auf ihre zyklusabhängige Expression und Progesteronregulation im humanen Endometrium untersucht.

3.1 Datierung des Zyklustages

Zur genauen Datierung der Endometriumproben und ihrer Zuordnung zu einem Zyklustag wird eine erweiterte histologische Bestimmung nach Noyes et al. (1950) angewandt. Alle Proben werden immunhistochemisch auf die Verteilung des Progesteronrezeptors und des Proliferationsmarkers Ki 67 (MiB) untersucht. Die unterschiedliche Verteilung der beiden Marker in den Zyklusphasen läßt Rückschlüsse auf den Zyklustag der zu datierenden Probe zu. Zur Beurteilung der Morphologie wird außerdem ein HE-(Hämatoxylin-Eosin)-Präparat angefertigt (s. *Abb. 6*). Zusätzlich werden am Tag der Probengewinnung regelmäßig die Hormone 17 β -Estradiol, LH und Progesteron bestimmt (siehe Kap. 6, Liste der Serumwerte der hier verwendeten Endometriumproben). Dem erfahrenen Untersucher gelingt so eine Zuordnung der Proben auf $\pm$ 1 Zyklustag (Classen-Linke, Alfer, Habilitation bzw. Dissertation, 2000).

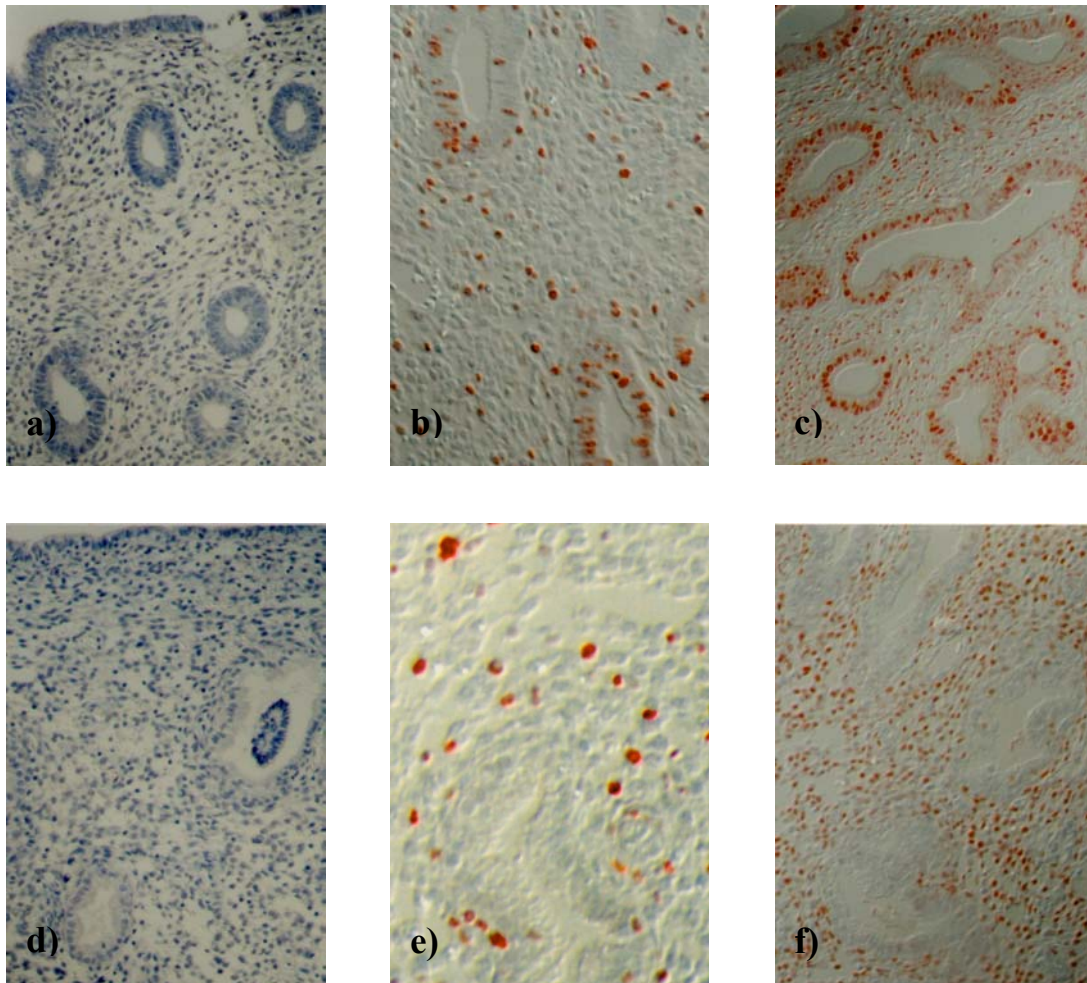


Abb.6: Immunhistochemische Färbungen zur Datierung des Zyklustages

obere Reihe: Proliferationsphase, 12./13. Zyklustag

a) HE, b) Ki 67 (MiB), c) PR (beide Isoformen, Klon 10A9)

untere Reihe: Sekretionsphase, 23./24. Zyklustag

d) HE, e) Ki 67 (MiB) , f) PR (beide Isoformen, Klon 10A9)

(b), e) und f) mit Gegenfärbung)

In der Proliferationsphase ist Ki 67 stark in den Drüsen und im Stroma exprimiert (b), in der Sekretionsphase hingegen nur noch im Stroma (e). Auch der Progesteronrezeptor ist in der Proliferationsphase in den Drüsen sehr stark und auch im Stroma deutlich angefärbt (c). In der Sekretionsphase dagegen sind die Drüsen negativ, das Stroma jedoch weiterhin stark positiv für den Progesteronrezeptor.

3.2 Untersuchungen der Progesteron-Rezeptor-Isoformen A und B

3.2.1 Immunhistochemie

Nachweis des Progesteron-Rezeptors an Paraffinschnitten

Bekannt ist aufgrund vorausgehender Untersuchungen mit Antikörpern gegen beide Isoformen A und B (Classen-Linke, I., 2000; Alfer, J., 2000), in Übereinstimmung mit der Literatur (Bergeron et al., 1988; Snijders et al., 1992; Shiozawa et al., 1996), dass das Verteilungsmuster des Progesteronrezeptors im Endometrium folgendermaßen verläuft: In der Follikelphase sind sowohl Stroma als auch Drüsenepithelzellen stark positiv für den Progesteronrezeptor, etwa in der Mitte der progesterondominierten Lutealphase nimmt der Progesteronrezeptor in den Drüsen stark ab, bleibt im Stroma aber weiterhin positiv. Gegen Ende der Sekretionsphase ist der Progesteronrezeptor in den Drüsen kaum noch nachweisbar. Das Myometrium ist während des gesamten Zyklus stark positiv für den Progesteronrezeptor markiert. Untersuchungen zur immunhistochemischen Detektion der PR-Isoformen wurden von Wang et al. (1998) und von Mote et al. (1999, 2001) mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt.

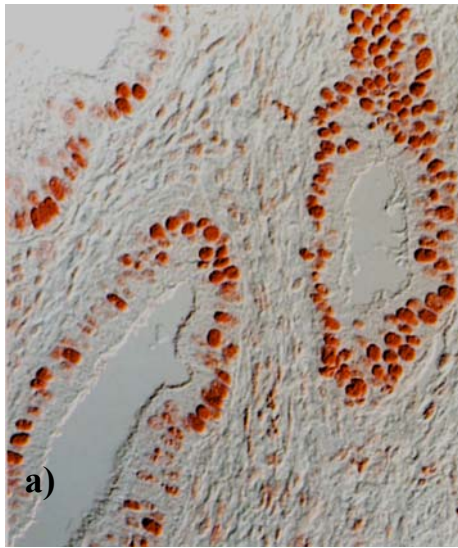
Untersuchung verschiedener PR-Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Progesteron-Rezeptor(PR)-Antikörper wurden auf ihre Paraffingängigkeit und Spezifität hinsichtlich der Isoformen untersucht.

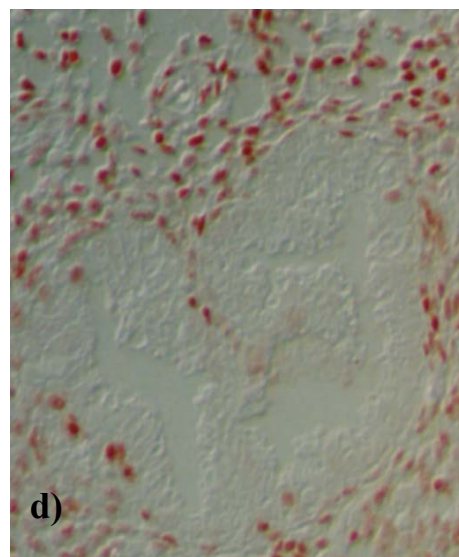
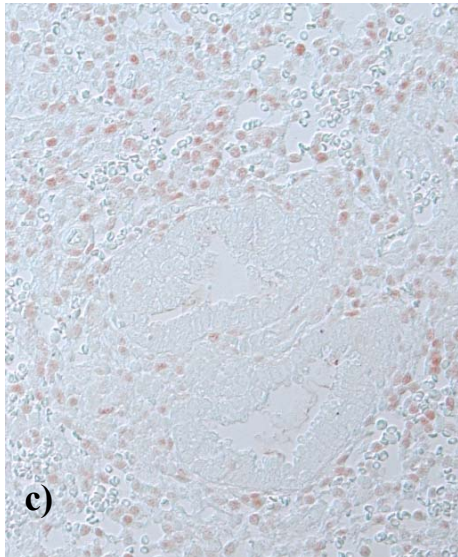
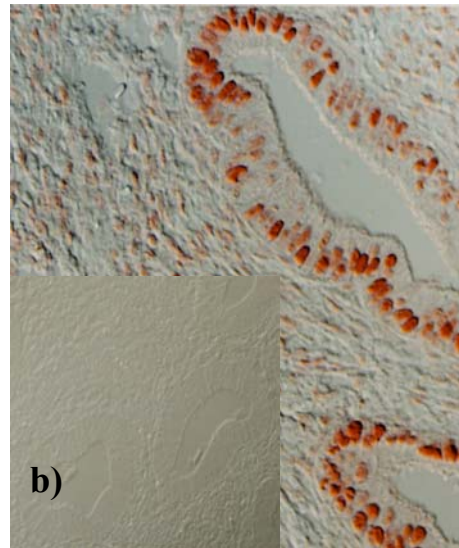
Die Antikörper PR 10A9, PR B (Novocastra) und PR Ab 8 (Neomarkers) erwiesen sich als paraffingängig, PR Ab 6 und PR Ab 7 (beide Neomarkers) als nicht für Paraffinschnitte geeignet, wohl aber für Kryostatschnitte. Dieselben Antikörper wurden auf ihre Spezifität hinsichtlich der PR-Isoformen überprüft. Der Antikörper PR 10A9 erkennt beide PR-Isoformen und wird in unserem Labor routinemäßig zur Unterstützung der Datierung der Endometriumproben nach Zyklustag eingesetzt. Auch der PR Ab 8 (Neomarkers), der eine Mischung aus zwei Klonen (hPRa2, hPRa3) enthält, erkennt beide Isoformen. Der PR-Antikörper B (Novocastra) soll laut Herstellerangaben nur die B-Isoform des Rezeptors erkennen. In mehreren Parallelversuchen unter gleichen Bedingungen mit Endometriumproben der verschiedenen Zyklustage ließ sich jedoch keinerlei Unterschied in der Markierung von Proben, die mit dem beide Rezeptorformen erkennenden Antikörper PR Ab 8 (Neomarkers), und Proben, die mit dem PR-B-Antikörper (Novocastra) inkubiert wurden, feststellen (s. *Abb. 7*). Zum Teil zeigte der PR-B-Antikörper sogar eine stärkere Anfärbung als der PR Ab 8-Antikörper. Zudem zeigte dieser Antikörper im Western-Blot sowohl die Bande für PR B, als auch die für PR A. Daraus ergab sich, dass der PR-B-Antikörper (Novocastra) nicht als spezifisch für die B-Isoform angesehen werden kann. An Paraffinschnitten ließen sich also mit den hier untersuchten Antikörpern die beiden Progesteron-Isoformen nicht einzeln spezifisch darstellen und untersuchen.

Da die PR-Antikörper Ab 6 und Ab 7, die für immunhistochemische Methoden spezifisch für die B- bzw. die A-Isoform sind, nicht paraffingängig, aber für Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten geeignet sind, wurde diese Methode für die vergleichenden Untersuchungen der Isoformen verwendet.

PR Ab 8 (Neomarkers)



PR B (Novocastra)



*Abb. 7: Vergleich der PR-Antikörper Ab 8 (a) und c); Neomarkers)
und PR B (b) und d); Novocastra)*

a) und b): Proliferationsphase, 12./13.ZT , Insert: Negativkontrolle
c) und d): Sekretionsphase, 23./24.ZT

Auch in der Sekretionsphase ist kein Unterschied in den Anfärbungsmustern der beiden Antikörper zu erkennen.

3.2.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Kryostatschnitten wurden die Antikörper PR Ab 8, PR Ab 7 und PR Ab 6 der Firma Neomarkers verwendet. Für die Immunfluoreszenz sind diese Antikörper sehr gut geeignet. Der Antikörper PR Ab 6 (Neomarkers) erkennt spezifisch die längere B-Isoform des Progesteronrezeptors, wohingegen der Antikörper PR Ab 7 (Neomarkers) in der Immunfluoreszenz aufgrund von spezifischen Konformationsänderungen nur die kürzere PR-A-Isoform erkennt. Der sowohl für Paraffin- als auch Kryostatschnitte verwendbare Antikörper PR Ab 8 erkennt beide PR-Isoformen. Die Verwendung dieser drei Antikörper ermöglichte die vergleichende Untersuchung der unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Verteilung der beiden PR-Isoformen an Endometriumproben der verschiedenen Zyklusstadien.

Zunächst wurden in parallelen Versuchen mit identischen Versuchsbedingungen 15 Endometriumproben verschiedener Zyklustage untersucht, indem serielle Gewebeschnitte mit dem PR Ab 7, PR Ab 6 und PR Ab 8 inkubiert wurden. Alle Antikörper wurden mit dem Fluorochrom FITC als Zweitantikörper gekoppelt und sichtbar gemacht, so dass die PR-positiven Zellkerne grün erschienen. Die Kontrollen, die anstelle des Primärantikörpers mit IgG aus nicht-immunisierten Tieren inkubiert wurden, zeigten keinerlei Anfärbung.

Diese Versuchsanordnung erlaubt den direkten Vergleich der drei Antikörper an vergleichbaren Kryostatschnitten derselben Endometriumprobe. Auf diese Weise wurde die Intensität und Lokalisation der Anfärbung für die PR-Isoformen in Bezug auf den Zyklus an Proben unterschiedlicher Zyklustage untersucht.

Frühe Proliferationsphase:

Um den fünften Zyklustag findet man sowohl für PR A als auch für PR B positive Zellen im Stroma; in den Drüsen ist ein Nebeneinander positiver und negativer Zellen zu beobachten. In der mittleren bis späten Proliferationsphase sind Stroma- und Drüsenzellen für PR A und PR B stark positiv, wobei die Drüsen noch stärker angefärbt sind als das Stroma. (s. *Abb. 8a*).

Späte Proliferationsphase:

In der späten Proliferationsphase sind in den Drüsen nach wie vor beide Isoformen stark positiv. Die Drüsen sind stärker positiv als das Stroma, außerdem überwiegt die PR-A-Isoform (s. *Abb. 8b*).

Frühe Sekretionsphase:

Die Übergangsphase, während der der Progesteronrezeptor in den Drüsen negativ wird, scheint um den 18. bis 19. Zyklustag zu liegen. Während der Übergangsphase sind PR-negative und PR-positive Drüsen bzw. positive und negative Zellen innerhalb einer Drüse zu erkennen (s. *Abb. 8c*).

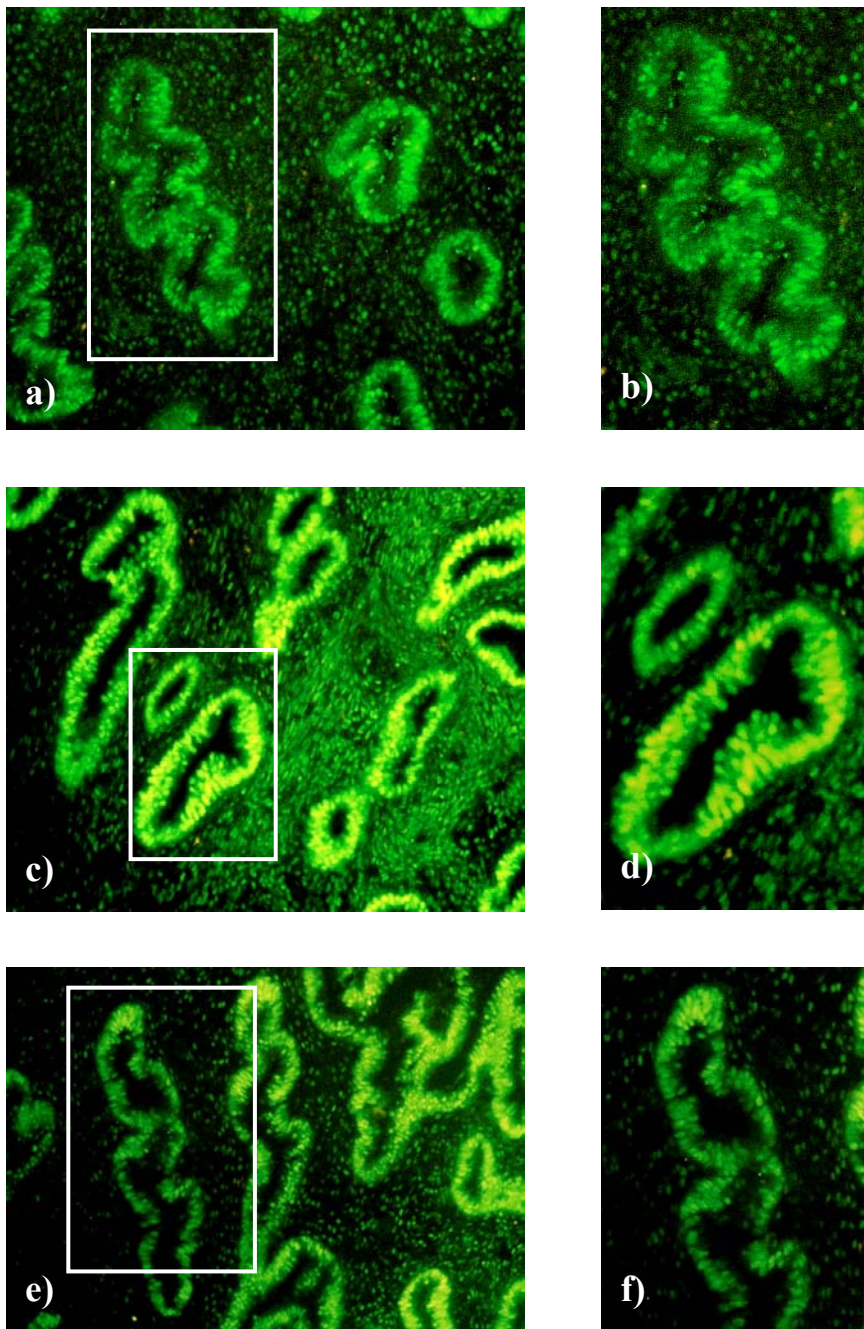
Mittlere bis späte Sekretionsphase:

In der mittleren bis späten Sekretionsphase unterscheidet sich die Expression der PR-Isoformen. Während dieser Phase geht die Expression des Progesteronrezeptors in den Drüsen zurück, sowohl die von PR A als auch die von PR B. Im Stroma ist die PR-A-Isoform weiterhin stark vorhanden, die PR-B-Isoform nimmt jedoch zum Ende des Zyklus hin stark ab, verschwindet aber nicht ganz (s. *Abb. 8d*).

In der späten Sekretionsphase um den 28. Zyklustag zeigen die Drüsen keinerlei Anfärbung für den PR-A-Antikörper (Ab 7) mehr, während das Stroma für denselben Antikörper noch

stark positiv ist. Der PR-B-Antikörper (Ab 6) weist in der spätsekretorischen Phase lediglich eine schwache Anfärbung im Stroma und eine leichte Markierung der Drüsen auf.

Es besteht ein Unterschied zwischen Drüsen der Basalis und Functionalis. Die Drüsen der Basalis sind länger positiv und weisen weniger zyklische Veränderungen auf als die der Functionalis, die hier vornehmlich untersucht wurde. Das Myometrium ist über den gesamten Zyklus positiv für beide PR-Isoformen.

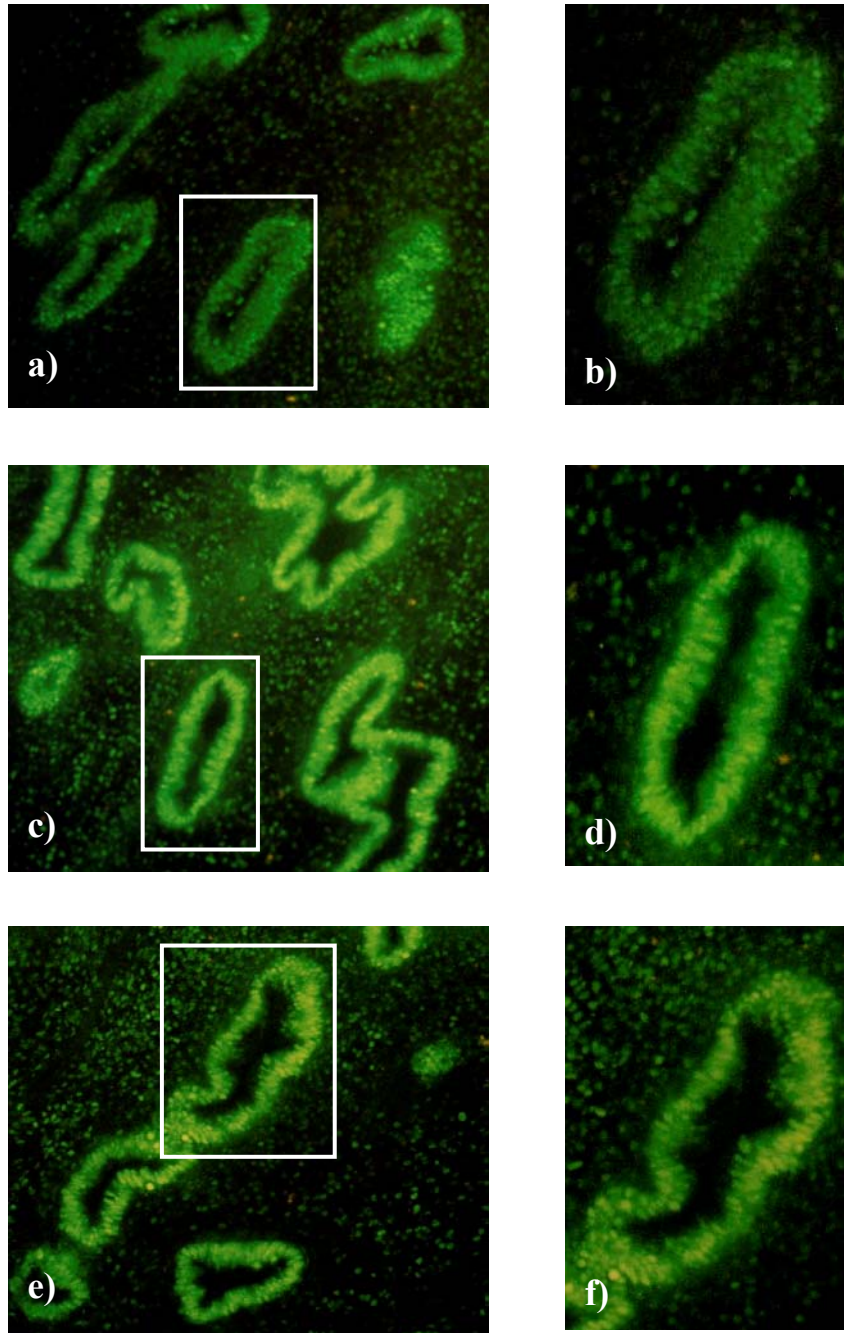


*Abb. 8a: Immunfluoreszenzdarstellung der Progesteronrezeptor-Isoformen
Proliferationsphase – 10./11. Zyklustag*

- a) u. b): Ab 6 (PR B-Isoform) an FITC gekoppelt
c) u. d): Ab 7 (PR A-Isoform) an FITC gekoppelt
e) u. f) : Ab 8 (PR A und PR B) an FITC gekoppelt

Die Abbildungen b), d) und f) zeigen Vergrößerungen der in a), c) und e) mit einem Rechteck markierten Areale.

In der Proliferationsphase sind beide PR-Isoformen sowohl in den Drüsen als auch im Stroma vorhanden.

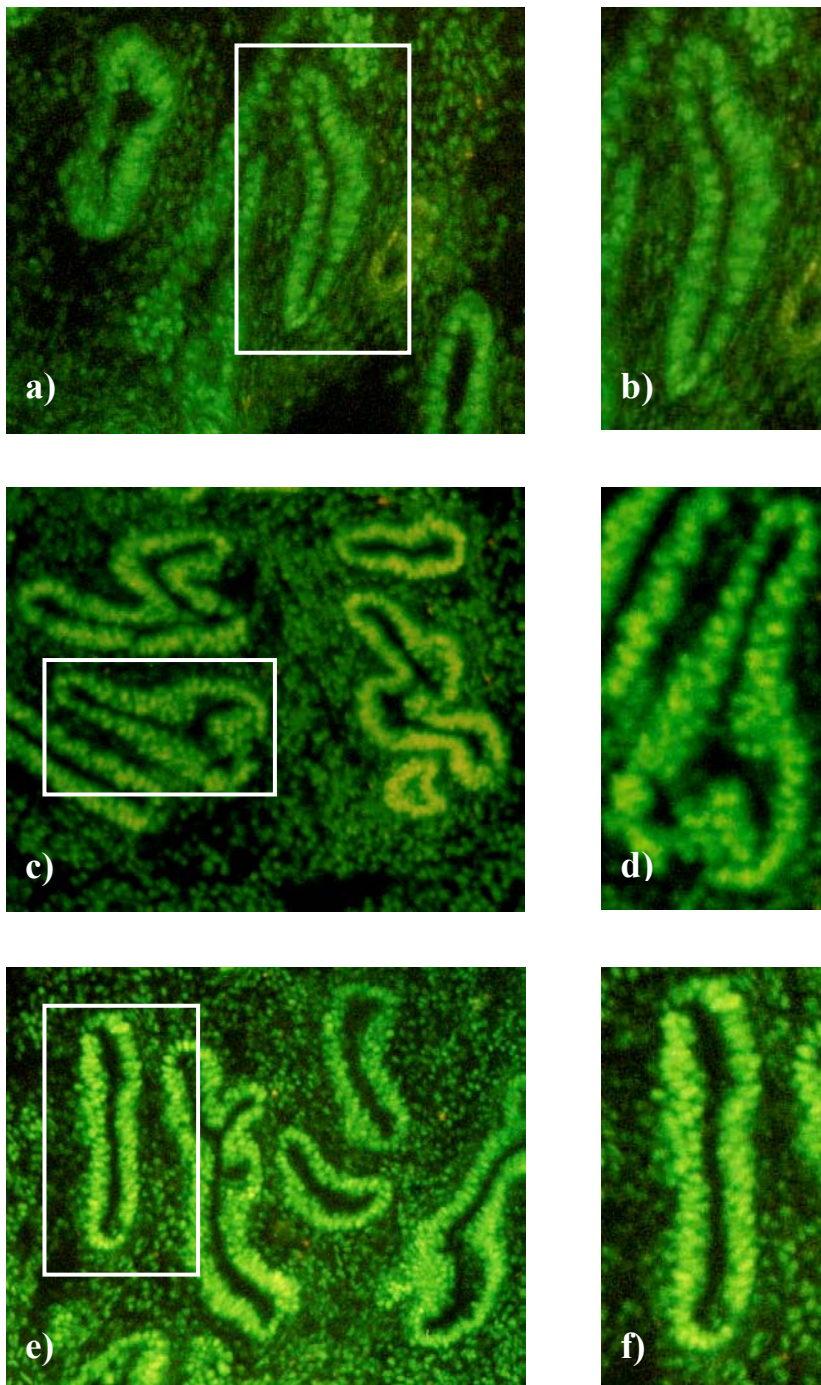


*Abb. 8b: Immunfluoreszenzdarstellung der Progesteronrezeptor-Isoformen
Späte Proliferationsphase – 13. Zyklustag (LH-Peak)*

- a) u. b): Ab 6 (PR B-Isoform) an FITC gekoppelt
- c) u. d): Ab 7 (PR A-Isoform) an FITC gekoppelt
- e) u. f): Ab 8 (PR A und PR B) an FITC gekoppelt

Die Abbildungen b), d) und f) zeigen Vergrößerungen der in a), c) und e) mit einem Rechteck markierten Areale.

In der späten Proliferationsphase sind beide PR-Isoformen sehr stark in den Drüsen, aber auch im Stroma vorhanden.

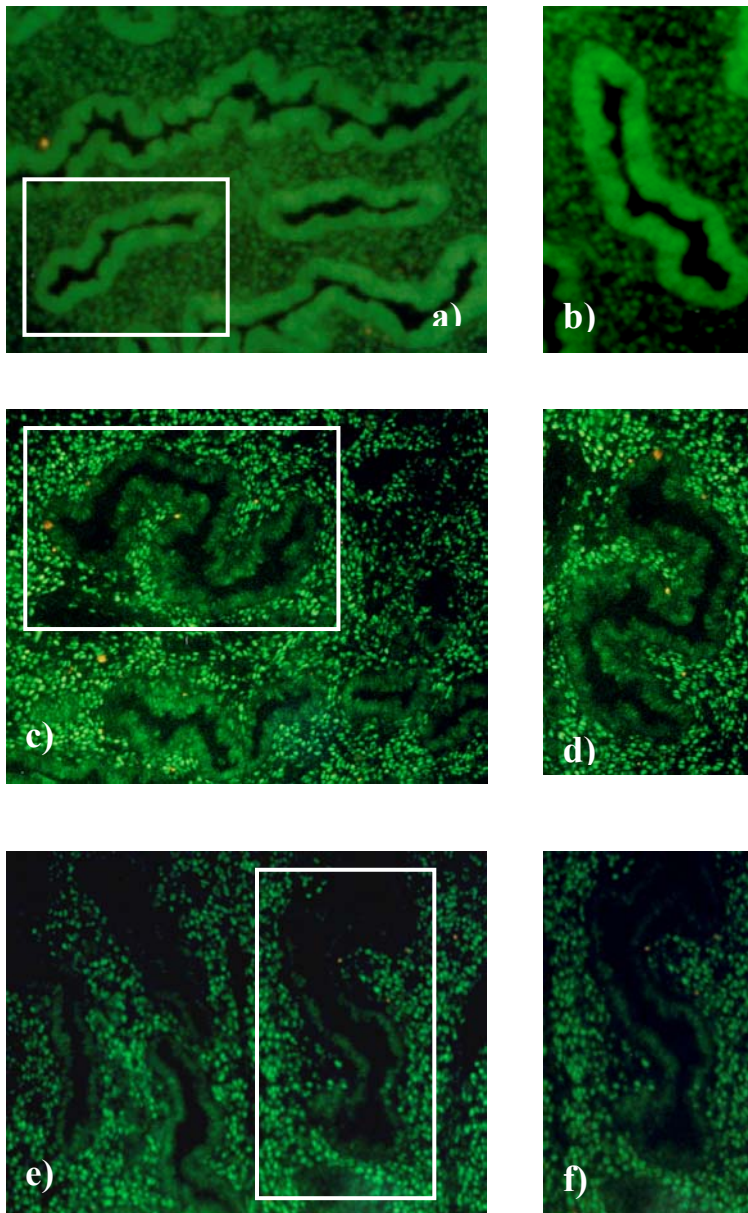


*Abb. 8c : Immunfluoreszenzdarstellung der Progesteronrezeptor-Isoformen
Frühe Sekretionsphase – 17. Zyklustag*

- a) u. b): Ab 6 (PR B-Isoform) an FITC gekoppelt
c) u. d): Ab 7 (PR A-Isoform) an FITC gekoppelt
e) u. f): Ab 8 (PR A und PR B) an FITC gekoppelt

Die Abbildungen b), d) und f) zeigen Vergrößerungen der in a), c) und e) mit einem Rechteck markierten Areale.

In der frühen Sekretionsphase sind weiterhin beide PR-Isoformen sowohl in den Drüsen als auch im Stroma vorhanden.



*Abb. 8d: Immunfluoreszenzdarstellung der Progesteronrezeptor-Isoformen
Späte Sekretionsphase – 25. Zyklustag*

- a) u. b): Ab 6 (PR B-Isoform) an FITC gekoppelt
- c) u. d): Ab 7 (PR A-Isoform) an FITC gekoppelt
- e) u. f): Ab 8 (PR A und PR B) an FITC gekoppelt

Die Abbildungen b), d) und f) zeigen Vergrößerungen der in a), c) und e) mit einem Rechteck markierten Areale.

In der späten Sekretionsphase werden die Drüsen für beide Rezeptor-Isoformen negativ. Die Anfärbung der Drüsen für PR Ab 6 ist auf Eigenfluoreszenz zurück zurückzuführen, es liegt keine spezifische Kernfärbung vor. Die PR A-Isoform überwiegt im Stroma.

3.2.3 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

Um die relative Änderung von PR A und PR B besser untersuchen zu können, wurden Doppelmarkierungen durchgeführt. Dazu wurden 25 Endometriumpuben verschiedener Zyklustage verwendet. Der PR-A-Antikörper (Ab 7) wurde mit einem Sekundärantikörper gekoppelt, der das Fluorochrom FITC (markierte Zellen erscheinen grün) enthielt, der Antikörper gegen die PR-B-Isoform (Ab 6) wurde mit einem Texas-Red gekoppelten Sekundärantikörper (rot) verbunden. Diese Methode erlaubt die Untersuchung beider Isoformen an demselben Gewebeschnitt und macht den direkten Vergleich auf der Ebene der einzelnen Zellen möglich. Mit Hilfe einer speziellen Software (AxioVision 3.0, Zeiss) ist es möglich, die als Mehrkanalbilder aufgenommenen Fotos einzeln (nur für FITC oder Texas Red) oder in einer Überlagerungstechnik für beide Fluorochrome zu betrachten. Zellen, die sowohl für PR A und für PR B positiv sind, d.h. sowohl mit FITC als auch mit Texas Red markiert sind, erscheinen orange; Zellen, in denen FITC überwiegt, bleiben grünlich angefärbt. So lässt sich einerseits die Kolokalisation beider PR-Isoformen innerhalb einer Zelle zeigen, andererseits lassen sich Zellen darstellen, die nur für eine Isoform positiv sind.

Die bereits für die Einfachmarkierungen beschriebenen Verläufe und Lokalisationen der beiden PR-Isoformen wurden in den Doppelmarkierungen bestätigt (Beschreibung siehe auch Bildunterschriften, *Abb. 9* und *Abb. 10 a-e*) und durch die Darstellung der Kolokalisation PR-A- und PR-B-positiver Zellen in den Overlaybildern verdeutlicht.

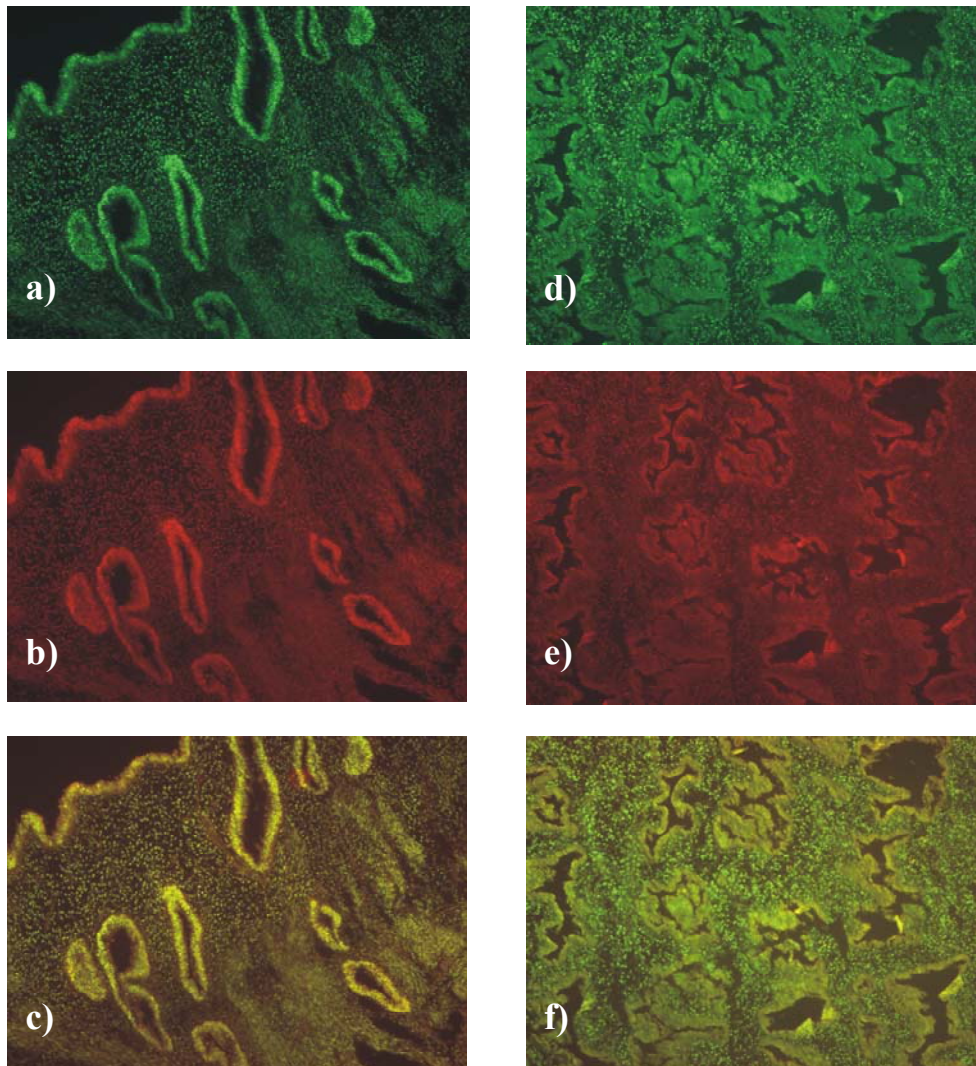


Abb. 9: Gegenüberstellung der PR-Isoform-Expression in der Proliferations- und späten Sekretionsphase

a), b) und c) Proliferationsphase, 9.-11. ZT
d), e) und f) späte Sekretionsphase, 26.-28. ZT

In grün (durch Kopplung mit FITC) ist die PR A-Isoform dargestellt, in rot (durch Kopplung an Texas Red) die PR-B Isoform. Die Bilder c) und f) zeigen das Mischbild, das entsteht, wenn beide Färbungen übereinandergelegt werden. In der Proliferationsphase zeigt sich eine deutliche Anfärbung sowohl der Drüsen als auch des Stromas für beide Isoformen. In der spätsekretorischen Phase dagegen, bleibt das Stroma positiv für PR A, während PR B stark abnimmt. In den Drüsen sind für beide Isoformen keine positiven Zellkerne mehr abgrenzbar.

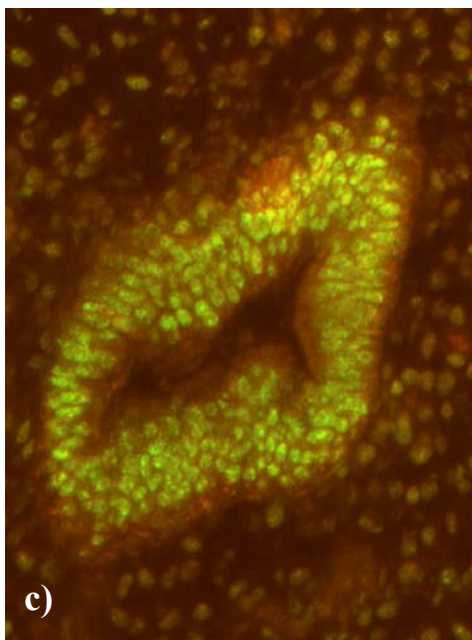
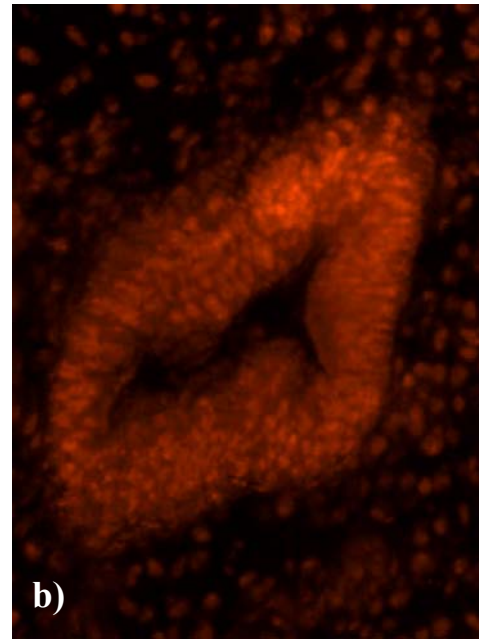
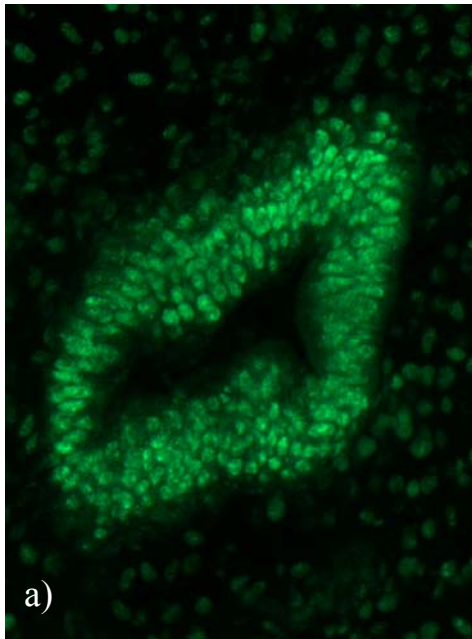
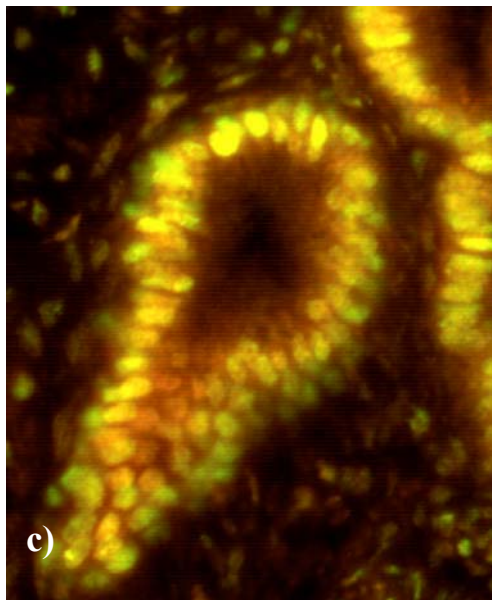
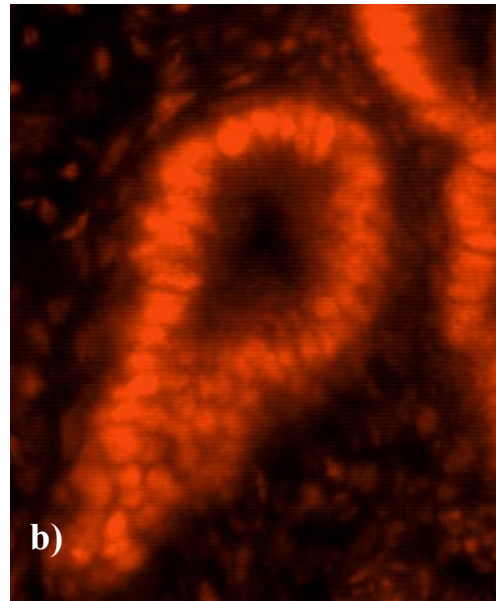
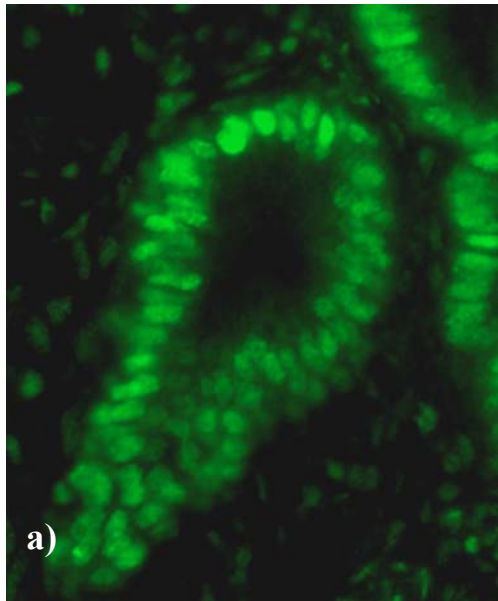


Abb. 10a: Doppelimmunfluoreszenz – Proliferationsphase, 9.-11. Zyklustag

- a) PR Ab 7 (A-Isoform) an FITC gekoppelt
- b) PR Ab 6 (B-Isoform) an Texas Red gekoppelt
- c) Mehrkanalbild (FITC und Texas Red übereinandergelegt).

In der Proliferationsphase sind beide PR-Isoformen sowohl in den Drüsen als auch im Stroma stark exprimiert.



*Abb. 10b: Doppelimmunfluoreszenz
Späte Proliferationsphase, 13./14. Zyklustag*

- a) PR Ab 7 (A-Isoform) an FITC gekoppelt.
- b) PR Ab 6 (B-Isoform) an Texas Red gekoppelt.
- c) Mehrkanalbild (FITC und Texas Red übereinandergelegt).

In der späten Proliferationsphase sind beide PR-Isoformen stark in den Drüsen und schwächer aber dennoch deutlich im Stroma exprimiert.

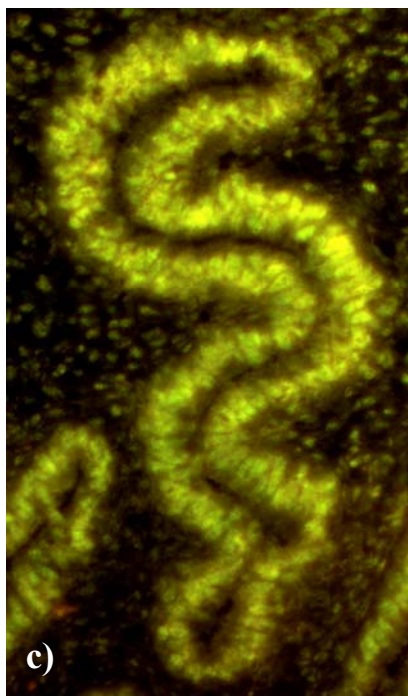
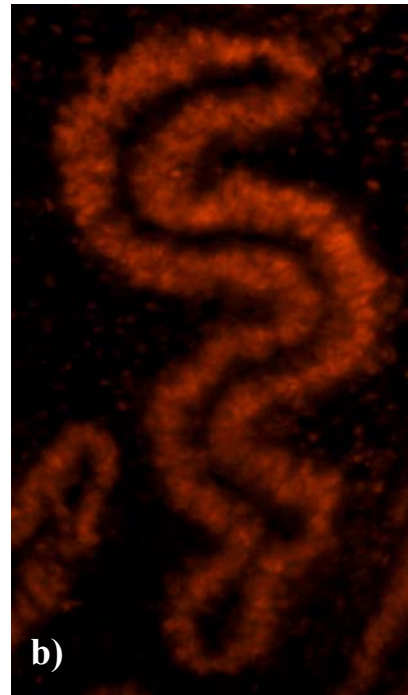
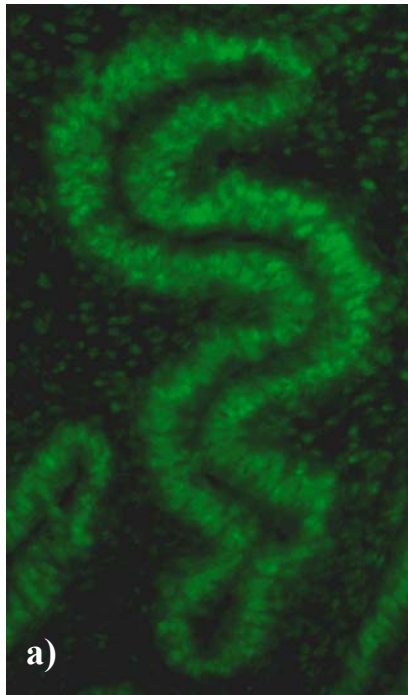


Abb 10c: Doppelimmunfluoreszenz – frühe Sekretionsphase, 17. Zyklustag

- a) PR Ab 7 (A-Isoform) an FITC gekoppelt.
- b) PR Ab 6 (B-Isoform) an Texas Red gekoppelt.
- c) Mehrkanalbild (FITC und Texas Red übereinandergelegt).

In der frühen Sekretionsphase sind beide PR-Isoformen stark in den Drüsen nachzuweisen, im Stroma überwiegt die PR-A-Isoform etwas.

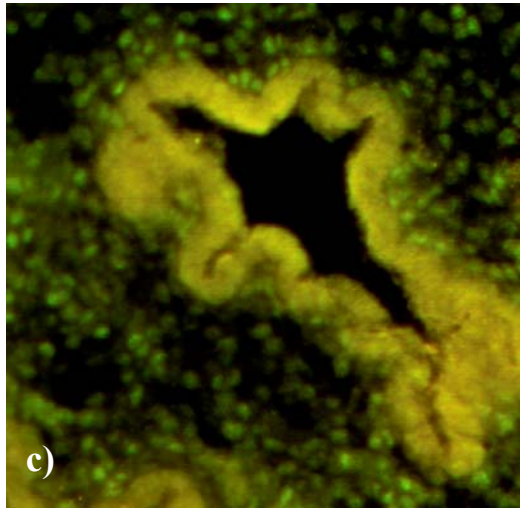
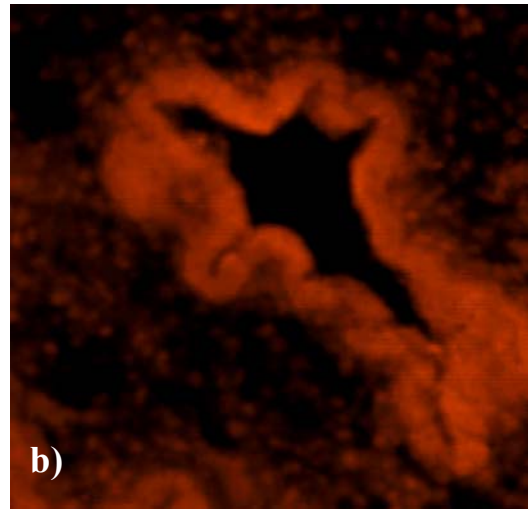
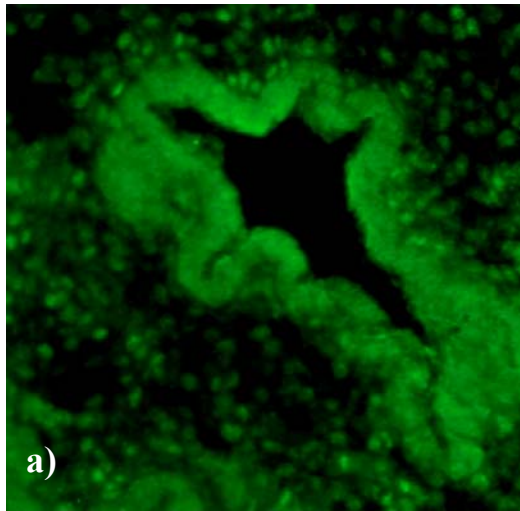


Abb. 10d: Doppelimmunfluoreszenz – mittlere Sekretionsphase, 22./23. Zyklustag

- a) PR Ab 7 (A-Isoform) an FITC gekoppelt.
- b) PR Ab 6 (B-Isoform) an Texas Red gekoppelt.
- c) Mehrkanalbild (FITC und Texas Red übereinandergelegt).

In der mittleren Sekretionsphase beginnen die Drüsen, negativ für beide PR-Isoformen zu werden. Die PR-B-Isoform nimmt im Stroma ab, so dass es zu einem relativen Übergewicht der PR-A-Isoform kommt.

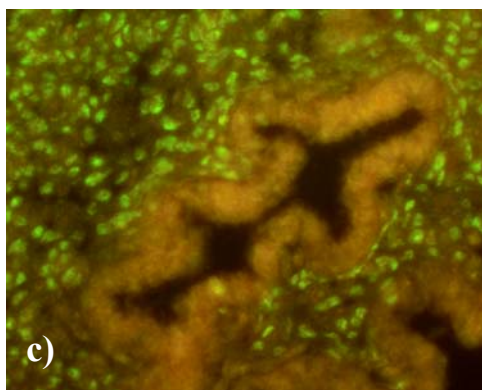
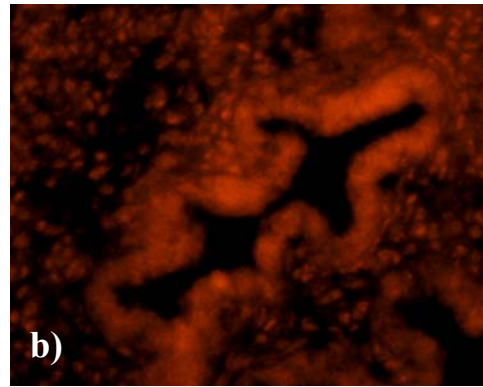
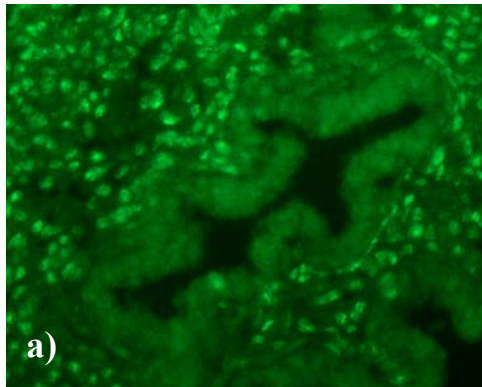


Abb 10e: Doppelimmunfluoreszenz – späte Sekretionsphase , 25.-27. Zyklustag

- a) PR Ab 7 (A-Isoform) an FITC gekoppelt.
- b) PR Ab 6 (B-Isoform) an Texas Red gekoppelt.
- c) Mehrkanalbild (FITC und Texas Red übereinandergelegt).

In der späten Sekretionsphase sind die Drüsen weitestgehend negativ für beide PR-Isoformen. Es ist keine Kernfärbung mehr sichtbar, die diffuse Anfärbung wird durch Eigenfluoreszenz hervorgerufen. Im Stroma ist in dieser Zyklusphase die PR-A-Isoform stark positiv, die PR-B-Isoform dagegen nur sehr schwach nachweisbar. Dies wird auch im Mischbild c) deutlich, in dem das Stroma grün erscheint.

Quantitative Auswertung

Für 15 Endometriumpuben wurden zur Quantifizierung der Ergebnisse stichprobenartig die FITC- bzw. Texas-Red-positiven Zellen in fünf Quadranten der Schnitte ausgezählt. Dabei wurden die Drüsen- und Stromazellen getrennt ausgezählt. Es wurden stets mehr PR A- als PR-B-positive Zellen gezählt (PR A/PR B immer > 1), unabhängig von der Lokalisation oder der Zyklusphase. Um die zyklusabhängigen Schwankungen der PR-Isoformen zu erfassen, ist die Berücksichtigung der Intensität der Anfärbung notwendig. Daher wurden die Intensität der Reaktion nach der folgenden Skala beurteilt: 0 – negativ, 1 – schwach positiv, 2 – positiv, 3 – stark positiv.

Für die Epithelzellen zeigte sich während der Proliferations- und frühen Sekretionsphase eine starke Anfärbung sowohl für PR A (an FITC gekoppelt) als auch PR B (an Texas Red gekoppelt). Ab dem 22. ZT sind die Epithelzellen nur noch schwach positiv bzw. zeigt sich in den Drüsen keine spezifische nukleäre Anfärbung mehr, sondern lediglich eine unspezifische Eigenfluoreszenz (mit 1 bewertet). Für den Verlauf der Intensität der Stromazellen fällt besonders auf, dass die Intensität von PR A in der zweiten Zyklushälfte deutlich stärker ist als die Intensität von PR B (s. *Abb. 11*).

Bei der Darstellung des Intensitätsverlaufs der Isoformen über den Zyklus (s. *Abb. 12*) zeigt PR A während der Proliferationsphase durchweg stark positive Drüsenzellen, die zumeist eine intensivere Anfärbung aufweisen als die sie umgebenden Stromazellen, die aber auch deutlich angefärbt sind. Dieses Verhältnis kehrt sich am Übergang zur mittsekreterischen Phase (um den 19. ZT) um, und PR A ist nun deutlich stärker im Stroma als in den Drüsen vorhanden, in denen nur noch eine Eigenfluoreszenz auftritt. Die PR-B-Isoform weist eine sehr starke Intensität der Drüsen während der Proliferationsphase auf, die im Zyklusverlauf immer mehr abnimmt, bis die Drüsen negativ werden bzw. nur noch die Eigenfluoreszenz sichtbar bleibt. Im Gegensatz zu PR A kommt es aber zu keinem Anstieg von PR B im Stroma während der Sekretionsphase, es kommt vielmehr zu einer Abnahme, so dass insgesamt nur noch sehr wenig PR B im Endometrium vorhanden ist.

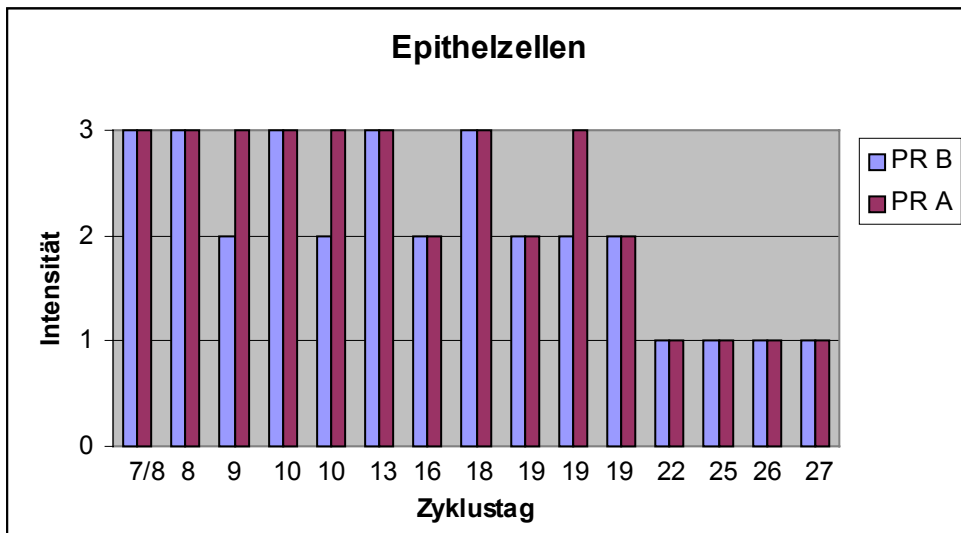
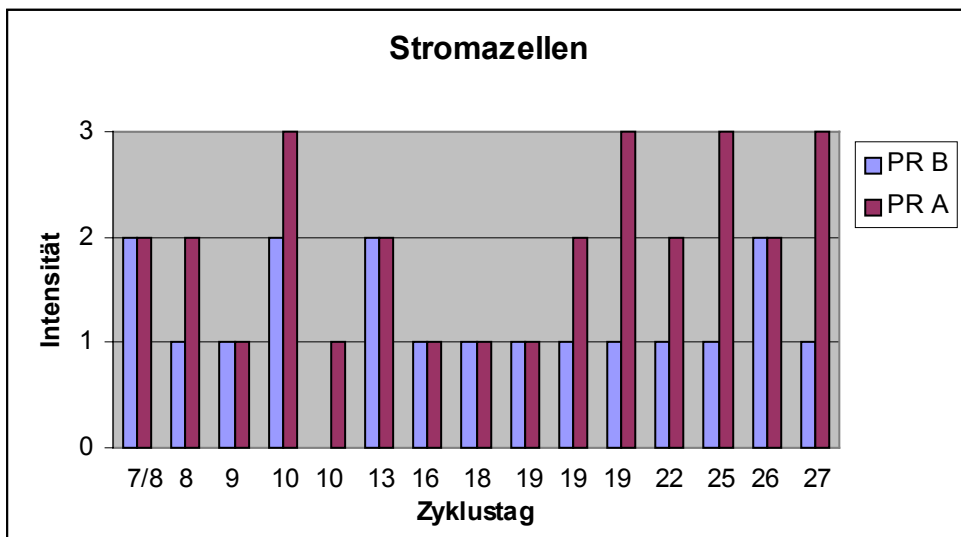


Abb. 11: Darstellung der Intensität von PR A und PR B im Verlauf des Zyklus – nach Stroma- und Epithelzellen getrennt

In den Stromazellen ist die Intensität der PR-A-Anfärbung in der spätsekretorischen Phase noch stark, die Intensität von PR B nimmt ab. Die Drüsenepithelzellen färben sich für beide Isoformen in der Proliferations- und frühen Sekretionsphase intensiv an, in der späten Sekretionsphase nimmt die Anfärbung stark ab.

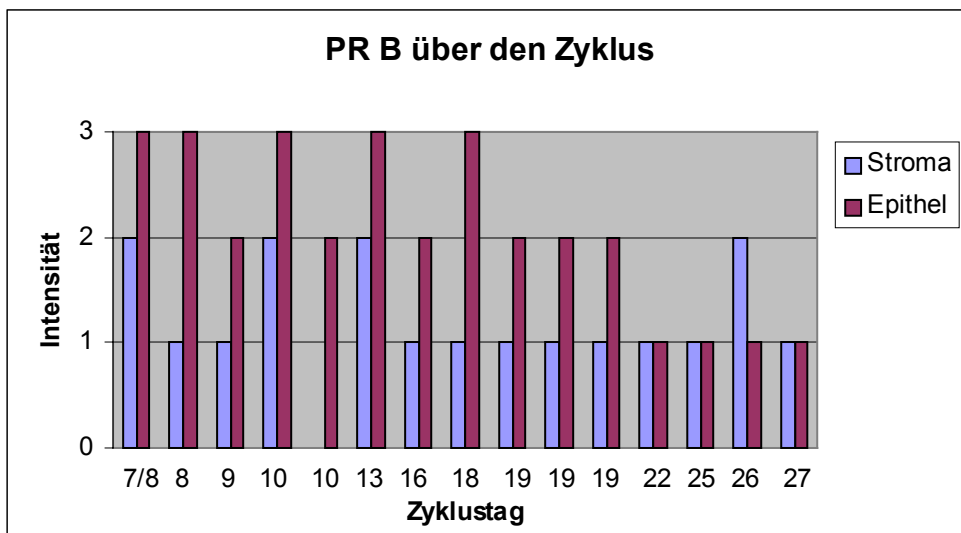
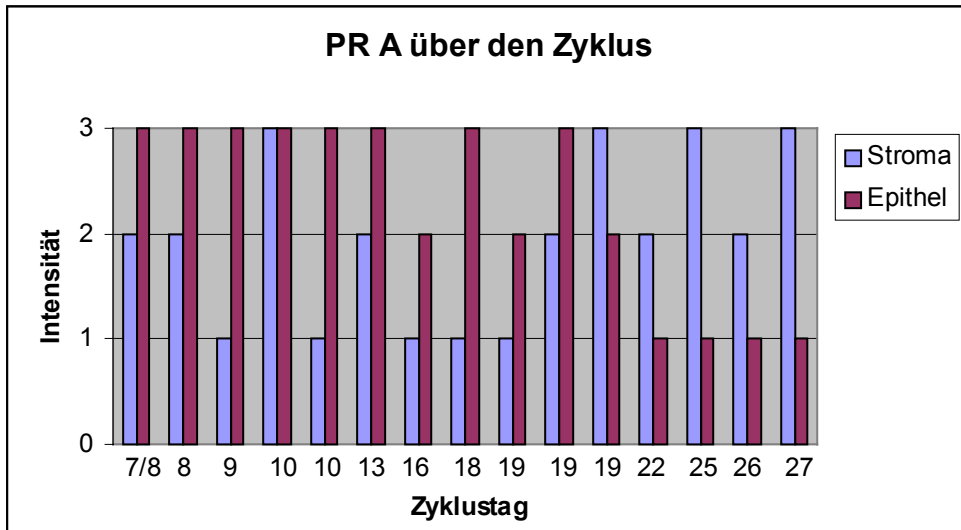


Abb. 12: Darstellung der Intensität von PR A und PR B im Verlauf des Zyklus – nach Isoformen getrennt

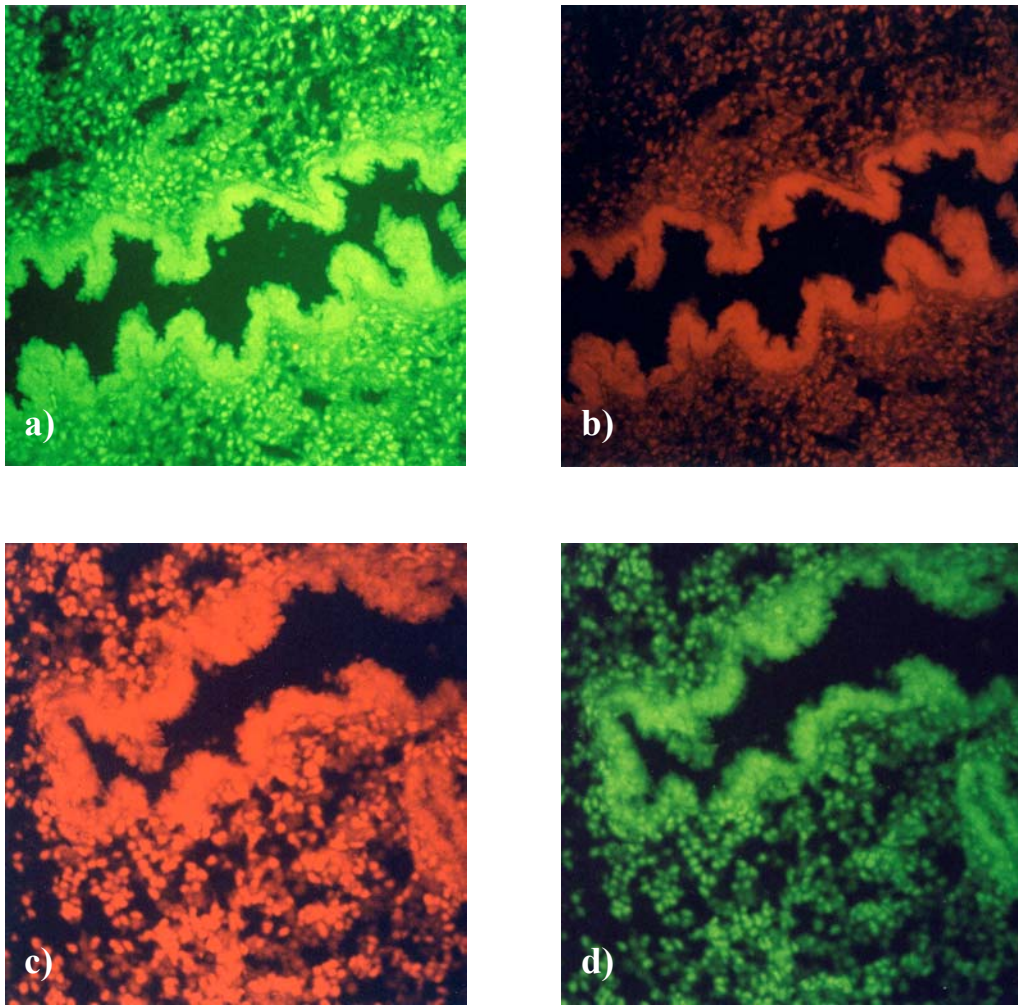
Im Verlauf des Zyklus bleibt PR A im Stroma positiv und nimmt von der frühen zur späten Sekretionsphase noch an Intensität zu, während die Epithelzellen an Intensität verlieren.

PR B zeigt durchgehend niedrigere Intensität im Stroma als im Epithel, wobei die Epithelzellen im Verlauf des Zyklus schwächer werden.

Kontrollversuche

Die mitgeführten Kontrollen wurden anstelle der beiden Primärantikörper jeweils mit Non-Immunserum inkubiert. Es zeigte sich keinerlei spezifische Anfärbung. In einigen Präparaten vorhandene Anfärbungen konnten als unspezifische Artefakte identifiziert werden.

Um sicherzugehen, dass die beschriebenen Unterschiede zwischen PR A und PR B im Grad der Anfärbung wirklich auf deren unterschiedliche Verteilung im Gewebe zurückzuführen sind und nicht aufgrund eventueller unterschiedlicher Fluorochromintensitäten entstanden, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt (s. *Abb. 13*). Dazu wurden 6 Endometriumproben parallel nach dem bekannten Versuchsprotokoll (also Ab 7 mit FITC und Ab 6 mit Texas Red) behandelt und an vergleichbaren Schnitten die Antikörper mit dem jeweils anderen Fluorochrom gekoppelt (also Ab 7 mit Texas Red und Ab 6 mit FITC). In der Proliferationsphase, in der PR A und PR B in Drüsen und Stroma stark exprimiert sind, ließ sich, wie hier zu erwarten, kein Unterschied erkennen. An einer spätsekretorischen Probe jedoch, bei der für das Stromakompartiment eine unterschiedliche Expression der Isoformen besteht, wurde gezeigt, dass die unterschiedliche Anfärbung nicht durch die Fluorochromintensitäten beeinflusst wurde.



*Abb. 13: Kontrollversuch zur Doppelimmunfluoreszenzmethode
Späte Sekretionsphase, 26.-28. Zyklustag*

- a) PR Ab 7 (A-Isoform) an FITC gekoppelt
- b) PR Ab 6 (B-Isoform) an Texas Red gekoppelt
- c) PR Ab 7 (A-Isoform) an Texas Red gekoppelt
- d) PR Ab 6 (B-Isoform) an FITC gekoppelt

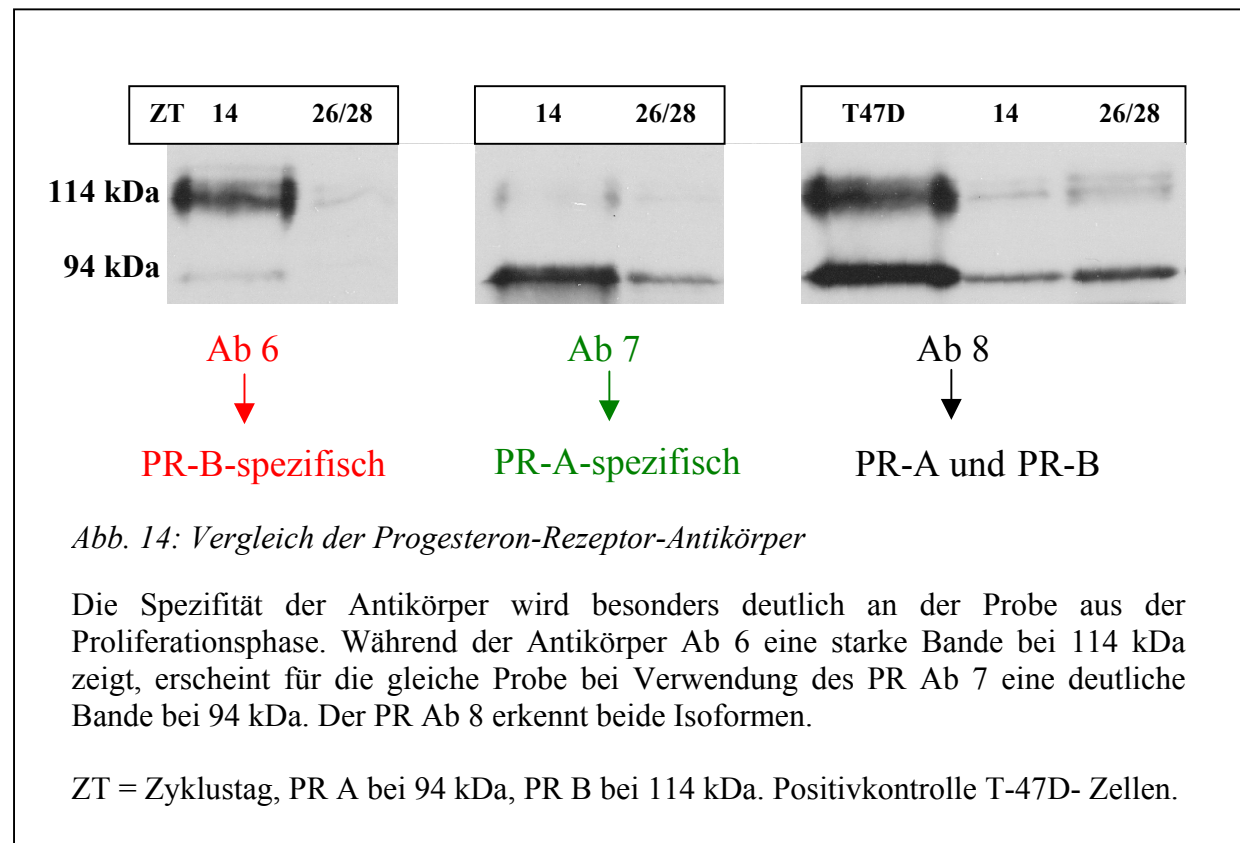
In der späten Sekretionsphase ist die A-Isoform im Stroma stärker vorhanden als die B-Isoform. In a) ist die A-Isoform an FITC (grün) gekoppelt, in c) an Texas Red (rot). b) und d) zeigen die PR-B Isoform, das Stroma ist in beiden Fällen schwächer angefärbt als in a) und b). Damit ist gezeigt, dass das spezifische Anfangsmuster der PR-Isoformen nicht von der Wahl des Fluorochroms abhängt.

3.2.4 Western Blots

Der Progesteron-Rezeptor liegt in zwei Isoformen vor, die kürzere Isoform A ist in ihrer Sequenz identisch mit der längeren Isoform B, die eine zusätzliche Kette von 165 Aminosäuren an ihrem N-terminalen Ende trägt (Horwitz und Alexander, 1983). Dadurch unterscheiden sich die beiden PR-Isoformen in ihrem Molekulargewicht, was im Western Blot durch zwei spezifische Banden deutlich wird. Die spezifische Bande für die PR A-Isoform liegt bei 94 kDa, die spezifische Bande für PR B dagegen bei 114 kDa.

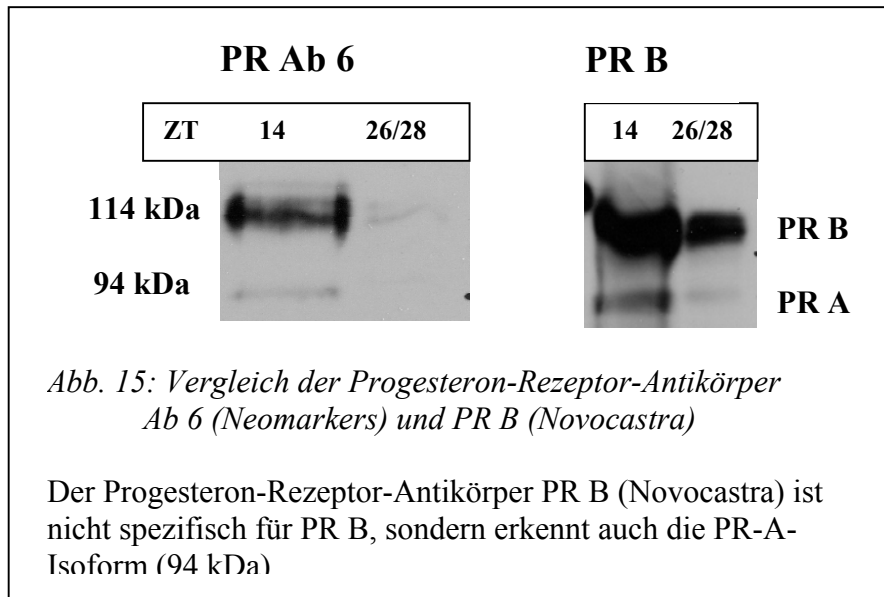
Spezifität der PR-Antikörper

Wie bereits für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz beschrieben, wurden zunächst die verschiedenen PR-Antikörper auf ihre spezifische Reaktion hin untersucht. Je eine proliferative und eine spätsekretorische Endometriumabradatprobe wurde mit den Antikörpern PR Ab 6 (B-Form), PR Ab 7 (A-Form) und PR Ab 8 (beide Formen, alle Neomarkers) inkubiert (s. Abb. 14). Dabei zeigte sich für beide Proben und alle drei Antikörper eine spezifische Reaktion für den Progesteronrezeptor. Als Positivkontrolle dienten T-47 D-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie beide PR-Isoformen exprimieren (Lessey et al., 1983, und Horwitz und Alexander, 1983). Die Spezifität der Antikörper wird besonders in der proliferativen Probe (14. ZT) deutlich, da in dieser Phase beide Isoformen deutlich exprimiert werden. Der Antikörper Ab 6, der gegen die B-Form des Rezeptors gerichtet ist, erkennt spezifisch nur diese. Nach Inkubation mit dem PR-Antikörper Ab 7 zeigt dieselbe Probe eine starke Bande bei 94 kDa, die spezifisch für die A-Isoform ist, und eine schwach angedeutete Bande für PR B. In der Literatur ist beschrieben, dass der Antikörper für die Immunhistochemie spezifisch für die A-Form sei, für Immunoblots jedoch nicht (Clarke et al., 1987). An dritter Stelle abgebildet ist die Reaktion mit dem gegen beide Isoformen gerichteten PR- Ab 8. Besonders deutlich erscheinen die beiden Banden in der T-47-D-Positivkontrolle, die Intensität der Banden ist für beide Isoformen ähnlich.



Vergleich der spezifischen Antikörper gegen PR B

Der PR-B-Antikörper der Firma Novocastra, der nur die B-Isoform detektieren soll, zeigt bei 114 kDa eine sehr breite Bande, aber auch eine Bande bei 94 kDa, die spezifisch für die A-Form des Rezeptors ist (s. Abb. 15). Im Vergleich dazu ist der PR-Antikörper Ab 6 (Neomarkers) spezifischer und ergibt distinktere Banden, obwohl auch mit diesem Antikörper eine sehr schwache Bande bei 94 kDa (PR A) detektiert wird. Da auch die Ergebnisse der vergleichenden immunhistochemischen Versuche nahegelegt hatten, dass der PR-B-Antikörper von Novocastra nicht ausschließlich die PR-B-Isoform erkennt (vergl. 3.2.1), wurde er für weitere Untersuchungen der spezifischen B-Form des Rezeptors nicht mehr verwendet.

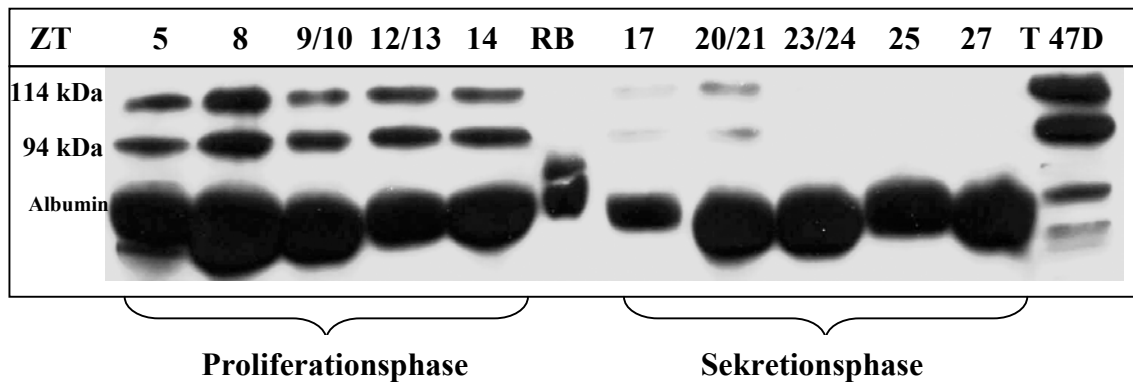


Western Blots an Abradatmaterial

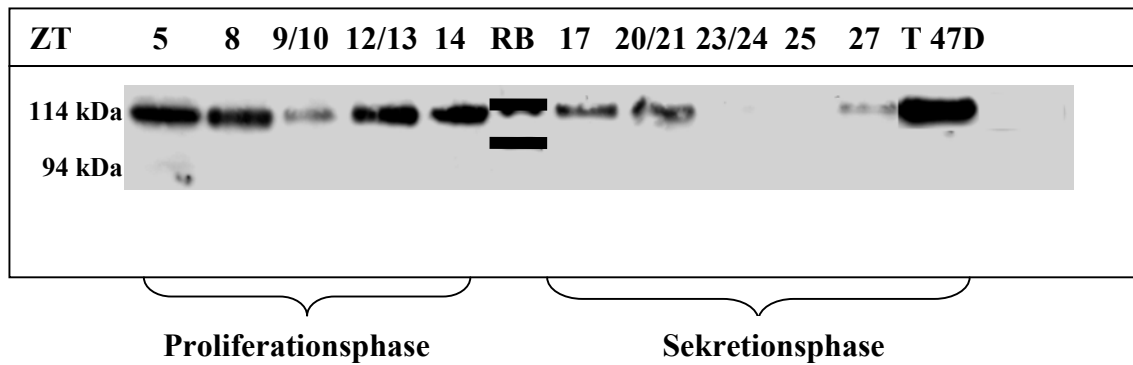
Um den Verlauf der Expression der Progesteronrezeptor-Isoformen in bezug auf den Zyklus zu untersuchen, wurden Homogenate von Endometriumproben der verschiedenen Zyklustage analysiert. Für diese Untersuchungen wurden die oben aufgeführten Antikörper Ab 6, Ab 7 und Ab 8 verwendet. Die eindeutigsten Ergebnisse lieferte dabei der PR Ab 8, der beide Isoformen gleichermaßen und mit gleicher Intensität erkennt (s. Abb. 16). Die Verläufe der PR-Expression über den Zyklus nach Inkubation mit PR Ab 6 bzw. PR Ab 7 entsprechen dem durch PR Ab 8 detektierten Verlauf. Wie oben bereits beschrieben, detektiert der PR Ab 6 weitestgehend nur die B-Form bei 114 kDa, der PR Ab 7 dagegen beide Isoformen.

Es wurden fünf Proben aus der Proliferations- und fünf Proben aus der Sekretionsphase verwendet. Für alle Endometriumabradate zeigen sich beide spezifischen PR-Banden, bei 94 und 114 kDa. Die Albuminbanden bei ca. 60 kDa sind für alle Proben (mit Ausnahme der Probe vom 17. ZT) ähnlich stark ausgeprägt, was ein Hinweis darauf ist, dass für jede Probe wirklich die gleiche Proteinmenge (je 30 µg) eingesetzt wurde. Der Western Blot zeigt während der gesamten Proliferationsphase starke Banden sowohl für PR A als auch PR B. In der frühen und mittleren Sekretionsphase (Proben vom 17. und 21. Zyklustag) nimmt die Intensität im Vergleich zur Proliferationsphase ab, ist jedoch am 20./21. Zyklustag, stärker ausgeprägt als am 17. ZT. Im weiteren Verlauf der Sekretionsphase nimmt die PR-Expression weiter ab bzw. lässt sich nicht mehr nachweisen. Die T47D-Positivkontrolle zeigt breite Banden für beide Rezeptorisoformen, die in ihrer Intensität vergleichbar sind.

a) PR Ab 8



b) PR Ab 6



c) PR Ab 7

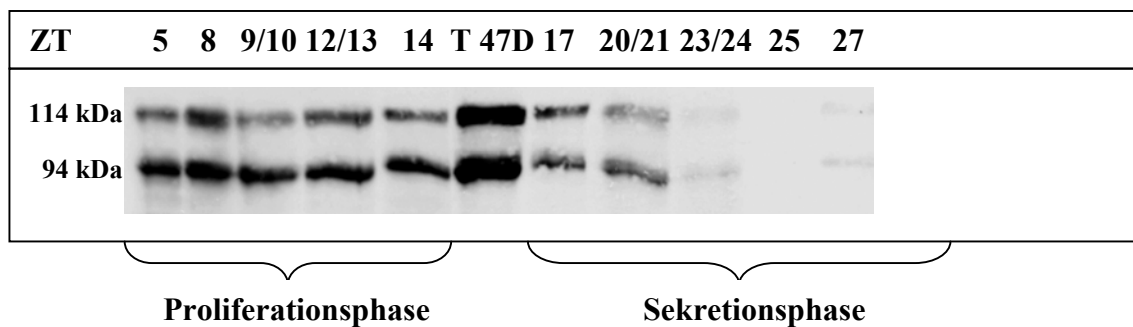


Abb. 16: Western Blots an Endometriumabradaten über den Zyklus

- a) PR Ab 8 (beide Isoformen)
- b) PR Ab 6 (B-Isoform)
- c) PR Ab 7 (beide Isoformen im Western Blot)

ZT = Zyklustag, RB = Rainbow-Bandenmarker, PR A bei 94 kDa, PR B bei 114 kDa. Positivkontrolle T-47D-Zellen.

Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung des Western Blots mit PR Ab 8 mittels Dichtebestimmung der Banden bestätigt diese Verläufe (s. Abb. 17). Auffällig ist das Überwiegen von PR B in der Probe des 21. Zyklustages. Die größten Dichtewerte zeigen sich für die Probe vom 8. ZT, sowohl für PR A als auch für PR B. Der Verlauf und die Stärke beider Isoformen ist auch in dieser Auswertung sehr ähnlich, die größte Differenz besteht am 21. ZT mit dem Überwiegen von PR B. Der hier verwendete Antikörper PR Ab 8 erkennt PR A und B in gleicher Stärke, was an den übereinstimmenden Werten für PR A und PR B für die T-47D-Zellen sehr gut bestätigt wird, die über gleiche Mengen PR A und PR B verfügen.

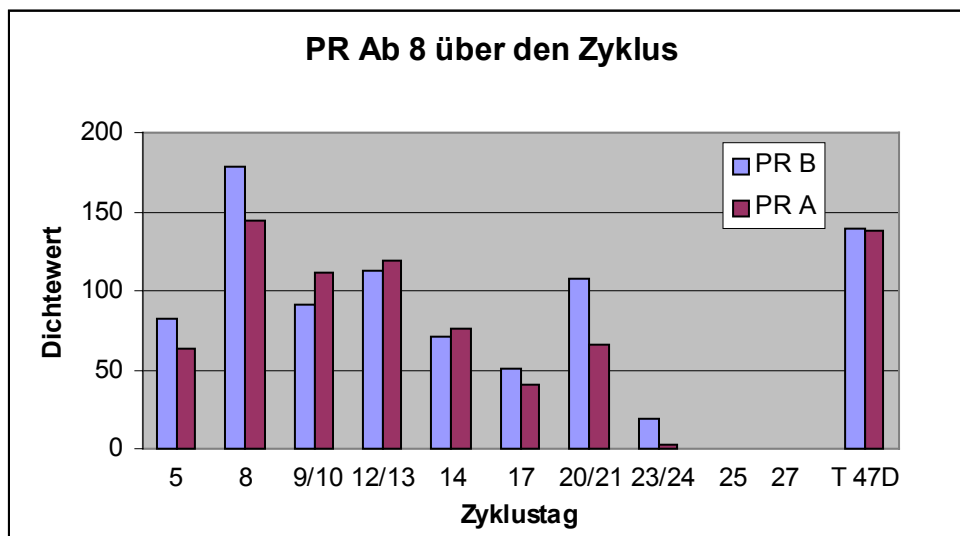


Abb. 17: Darstellung der Dichtewerte des Western Blots mit PR Ab 8

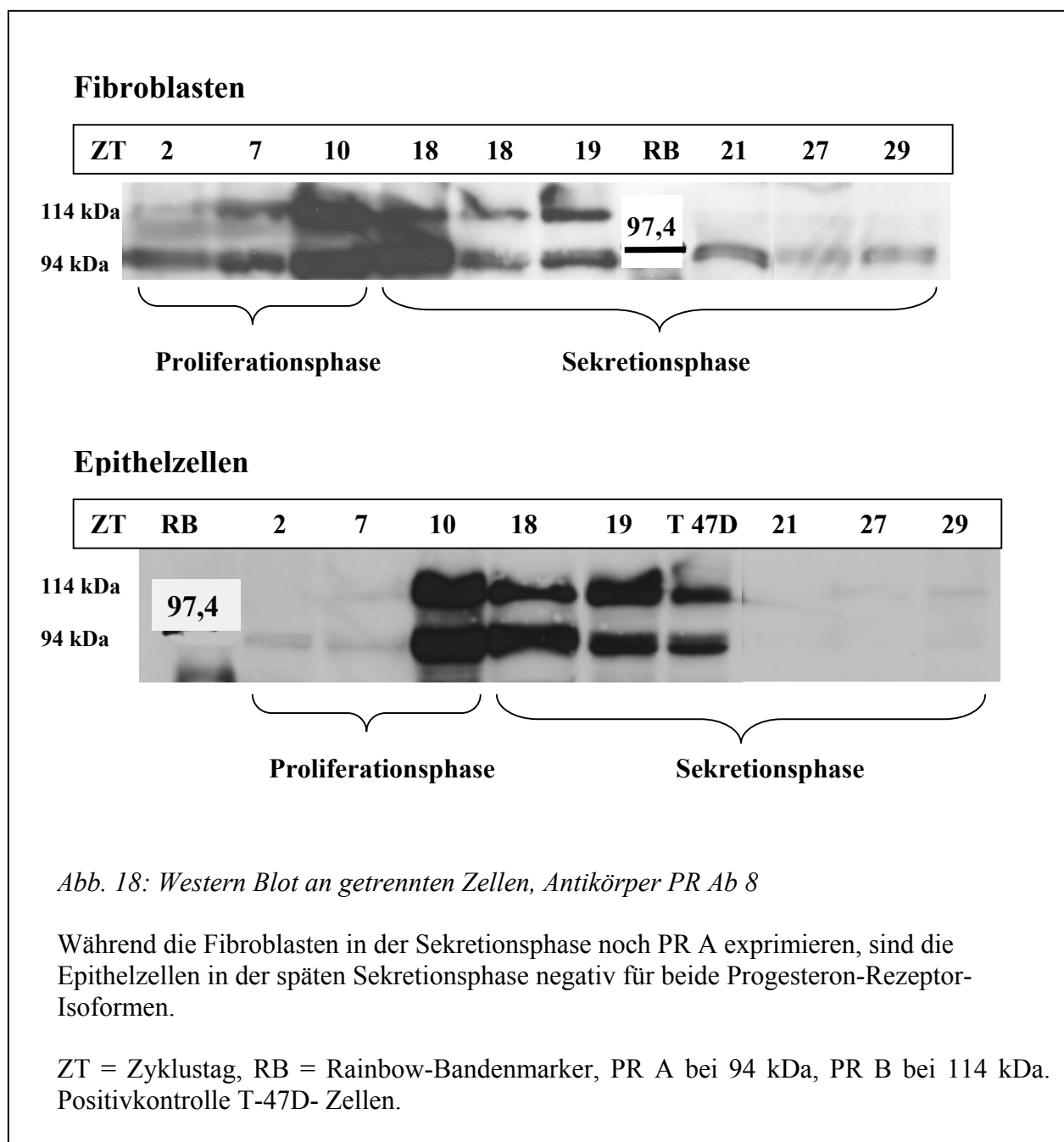
PR A und PR B zeigen relativ ähnliche Dichtewerte. In der späten Sekretionsphase können keine Dichtewerte mehr ermittelt werden. Die T47D-Zellen haben die gleichen Dichtewerte für PR A und für PR B.

Auf den hier gezeigten Western Blots wird der Unterschied in der Expression beider PR-Isoformen zwischen Proliferations- und Sekretionsphase deutlich, und die Abnahme beider Isoformen im Verlauf der Sekretionsphase ist erkennbar. Es sind hier jedoch keine quantitativen Unterschiede in der Expression von PR A und PR B für die einzelnen Proben auszumachen.

Alle bisher beschriebenen Versuche wurden an Endometriumabradaten durchgeführt, die durch Abschaben von endometrialem Material mit Hilfe eines Skalpells gewonnen wurden. Diese Abradate enthalten sowohl Drüsenepithel- als auch Stromazellen. Die mit Hilfe der Immunfluoreszenzuntersuchungen beschriebenen Unterschiede in der Expression der beiden Progesteron-Rezeptor-Isoformen betreffen jedoch Unterschiede in der Expression zwischen Stromazellen und Drüsenepithelzellen. Um diese Unterschiede mittels proteinbiochemischer Methoden sichtbar zu machen, bedarf es der getrennten Untersuchung von Stromazellen und Epithelzellen.

Western Blots an getrennten Zellen

Um Drüsen- und Stromakompartiment einzeln untersuchen zu können, wurde das Probenmaterial direkt nach der Gewinnung mit Hilfe feinmaschiger Siebe in die Stroma- und Epithelzellfraktion getrennt (Zelltrennung s. 2.3.2). Neun dieser getrennten Endometriumproben verschiedener Zyklustage wurden mit dem PR Ab 8-Antikörper, der beide PR-Isoformen erkennt, inkubiert (*Abb. 18*). Für die Epithelzellfraktion sind in der frühen Proliferationsphase (Proben vom 2. und 7. Zyklustag) nur sehr schwache Banden für PR A und PR B auszumachen. Ab der mittleren Proliferationsphase (10. ZT) zeigen sich sehr starke Signale für beide Isoformen, die im Verlauf der Sekretionsphase abnehmen und in der späten Sekretionsphase kaum noch nachweisbar sind. Die quantitative Auswertung zeigt ein Überwiegen von PR A in den Drüsenzellen des 18. ZT, aber ein Überwiegen von PR B am 19. ZT, mit insgesamt höheren Dichtewerten.



Im Stromakompartiment zeigt sich in der Proliferations- und frühen Sekretionsphase ein der PR-Expression der Epithelzellen entsprechender Verlauf, wobei die Dichtewerte am 19. ZT im Stroma niedriger sind als in den Epithelzellen. In der mittleren und späten Sekretionsphase jedoch bleibt die PR-A-Isoform deutlich nachweisbar, während die PR-B-Isoform wie auch in den Epithelzellen negativ (bzw. nur sehr schwach am 27. ZT) ist. Die Epithelzellen zeigen für die spätsekretorische Probe (s. 29. ZT) keinerlei PR-Expression mehr. Dieser unterschiedliche Befund stimmt mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzuntersuchungen für diese späte Zyklusphase überein: Die Drüsenepithelzellen waren in der späten Sekretionsphase für beide Isoformen weitgehend negativ, das Stroma jedoch stark positiv für die PR-A-Isoform. Auch hier stellen sich in der T47D-Positivkontrolle beide Isoformen deutlich und in gleicher Intensität dar.

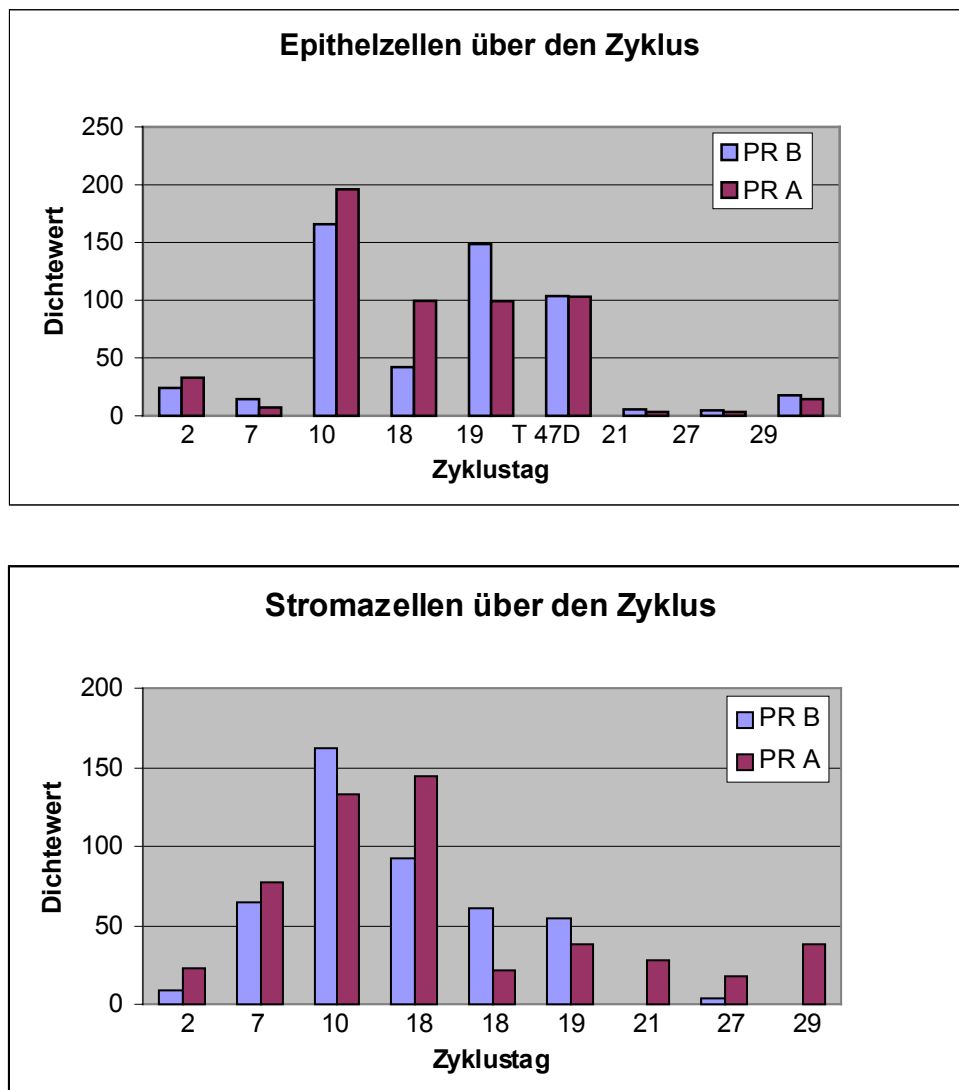


Abb. 19: Darstellung der Dichtewerte des Western Blots an getrennten Zellen

In den Stromazellen bleibt in der spätsekretorischen Phase PR A nachweisbar, während für PR B keine Dichtewerte mehr gemessen werden können.

3.3 Untersuchung der Amphiregulin-Expression in humanem Endometrium

Das Glykoprotein Amphiregulin gehört zur EGF(epidermal growth factor)-Familie und bindet an den EGF-Rezeptor. Für die Maus wurde postuliert, dass Amphiregulin progesteronabhängig und über die PR-Isoform A reguliert sei (Mulac-Jericevic, 2000). In dieser Arbeit wurde Amphiregulin im humanen Endometrium auf seine Expression und mögliche Regulation durch Progesteron untersucht.

3.3.1 Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis von Amphiregulin erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers (Amphiregulin Ab-1, Neomarkers) an Paraffinschnitten. Es wurden 35 Proben unterschiedlicher Zyklustage in Bezug auf die zyklusabhängige Expression von Amphiregulin untersucht. In allen humanen Endometriumpuben fand sich eine für den Antikörper spezifische Markierung. Amphiregulin-positive Zellen wurden sowohl im Stroma als auch in den Drüsen und im Oberflächenepithel beobachtet, und zwar jeweils in den Zellkernen. Im Stroma zeigte sich ein „buntes“ Bild mit einzelnen positiven Zellen, aber auch einer sehr auffälligen Häufung Amphiregulin-positiver Zellen in und um Lymphozytenansammlungen. Drüsen- und Oberflächenepithel waren nicht durchgehend in allen untersuchten Proben positiv. Insgesamt wurde ein Überwiegen von Amphiregulin in der Proliferationsphase festgestellt. Das Myometrium zeigte für alle Zyklusstadien eine positive Reaktion (s. *Abb. 20* und *21*).

Kontrollen

Paraffinschnitte von humanem Colon und Plazenta-Zotten wurden als Positivkontrolle verwendet. In Syncytiotrophoblastzellen früher Zotten bis zur 18. Woche wird Amphiregulin exprimiert (Lysiak et al., 1995). In oberflächlichen Epithelzellen der Colon-Mukosa wurde ebenfalls Amphiregulin nachgewiesen (Johnson et al., 1992). Die beiden genannten Originalarbeiten verwendeten denselben, von Johnson entwickelten Antikörper, den auch wir benutzten (s. *Abb. 22*).

Als Negativkontrolle dienten vergleichbare Schnitte der einzelnen Proben, die mit IgG nicht-immunisierten Tiere anstelle des Primärantikörpers inkubiert wurden.

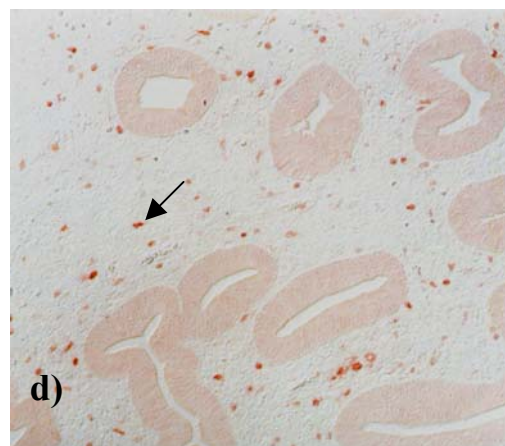
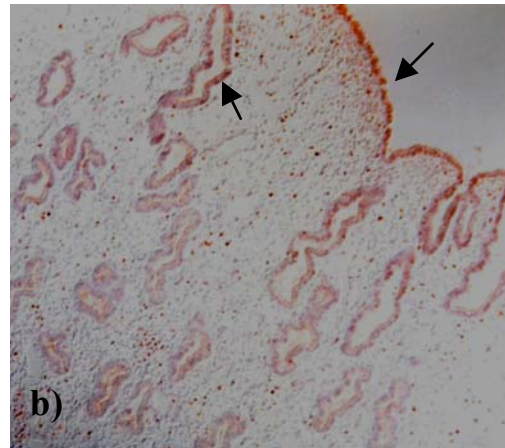
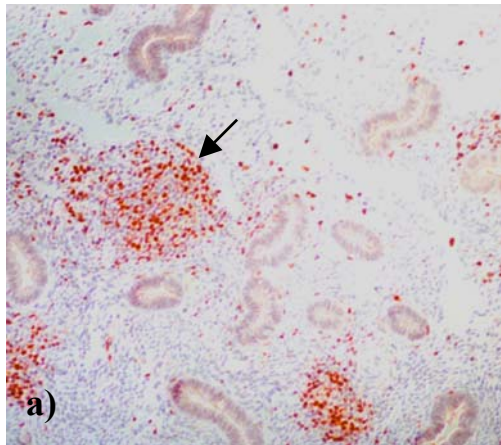


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von Amphiregulin im humanen Endometrium (Amphiregulin in rot – AEC, mit Gegenfärbung)

Frühe Sekretionsphase, 18./19. Zyklustag:

- a) Amphiregulin ist besonders stark in Lymphozytenansammlungen exprimiert, aber auch vereinzelt im Stroma.
- b) Auch das Oberflächenepithel und Teile der Drüsen zeigen amphiregulinspezifische Anfärbungen.
- c) Negativkontrolle – anstelle des Primärantikörpers wurde Non-Immunserum verwendet.

Proliferationsphase, 15. ZT:

- d) In diesem Schnitt sind die Drüsen negativ, vereinzelte Zellen im Stroma sind positiv für Amphiregulin.

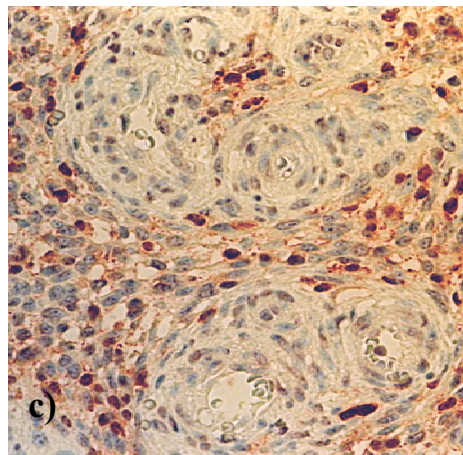
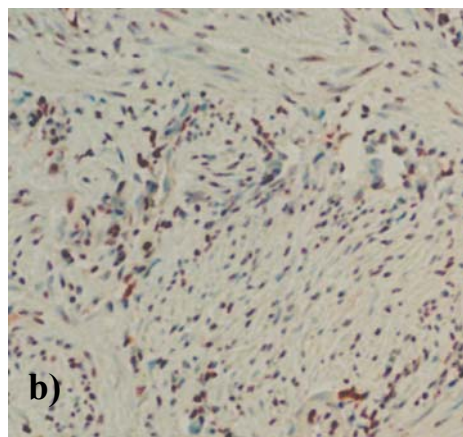
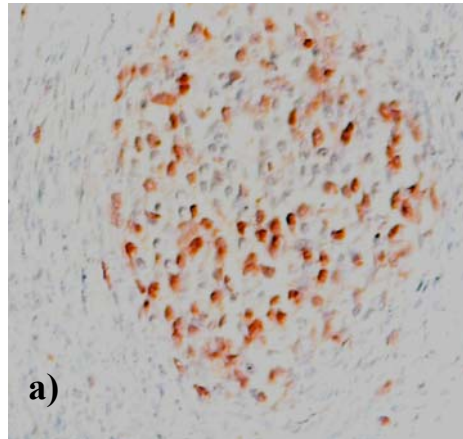


Abb. 21: Lokalisationen von Amphyregulin im humanen Endometrium (Amphyregulin rot – AEC, mit Gegenfärbung)

- a) Amphyregulin in Lymphozytenansammlungen
- b) Amphyregulin im Myometrium
- c) Amphyregulin um Spiralarterien

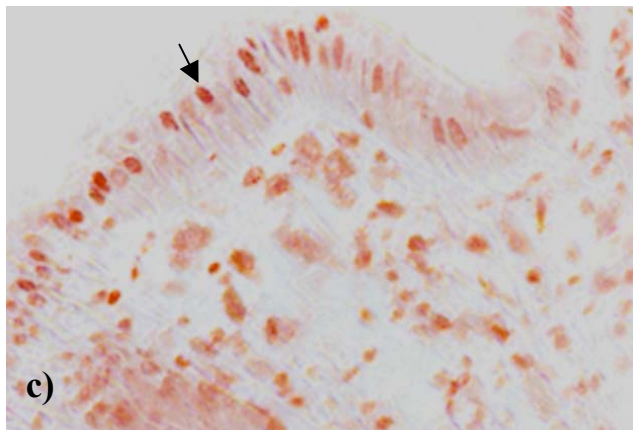
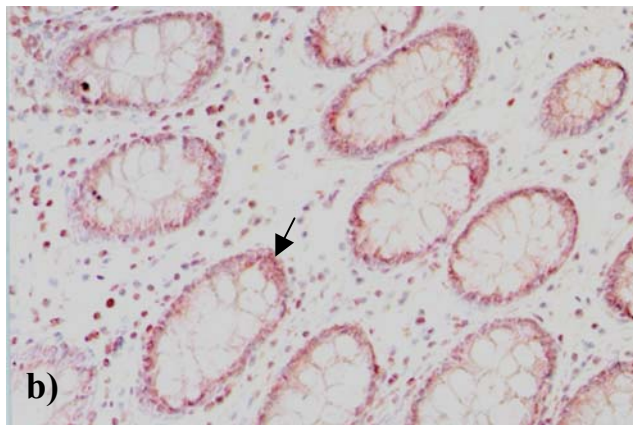
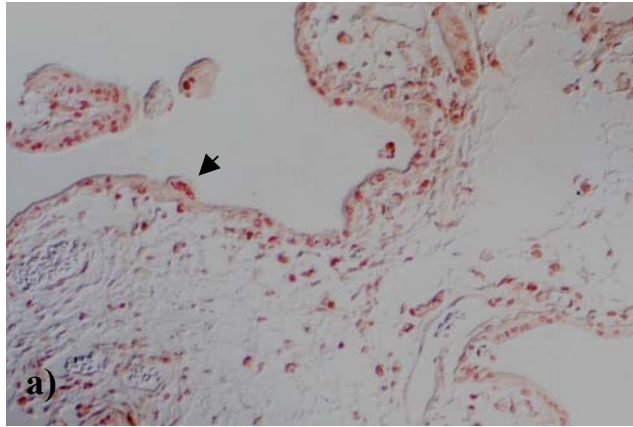


Abb. 22: Positivkontrollen für Amphyregulin

- a) frühe Zotten (14. SSW) : Die Zytotrophoblastzellen früher Zotten sind positiv für Amphyregulin.
- b) Colon: Die Drüsen exprimieren Amphyregulin.
- c) Colon: Auch das Oberflächenepithel zeigt eine amphyregulinspezifische Anfärbung.

Die Pfeile deuten auf einzelne positive Zellen.

3.3.2 Amphiregulin-Doppelmarkierungen

Doppelmarkierung von Amphiregulin mit CD 68

Neben der auffälligen Häufung von Amphiregulin-positiven Zellen um lymphozytäre Ansammlungen stellten sich im Stroma einzelne, auffällig große Zellen positiv dar. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesen Zellen um Makrophagen handelte, wurde eine Doppelmarkierung von Amphiregulin mit CD 68, einem Marker für reife Makrophagen, durchgeführt. In allen untersuchten Proben wurden doppelmarkierte Zellen identifiziert, die vor allem im Stroma aber vereinzelt auch in den Drüsen lokalisiert waren. Daneben fanden sich auch CD-68-positive Zellen, die kein Amphiregulin exprimierten, d.h. Amphiregulin scheint von Makrophagen exprimiert zu werden, aber nicht von allen, was möglicherweise abhängig von ihrem Aktivierungszustand ist (Mograbi et al., 1997). Mit Hilfe dieser Doppelmarkierung konnten die zuvor beobachteten großen Amphiregulin-positiven Zellen als Makrophagen identifiziert werden. Eine Zyklusabhängigkeit für die Expression von Amphiregulin durch Makrophagen ließ sich jedoch nicht finden (s. Abb. 23).

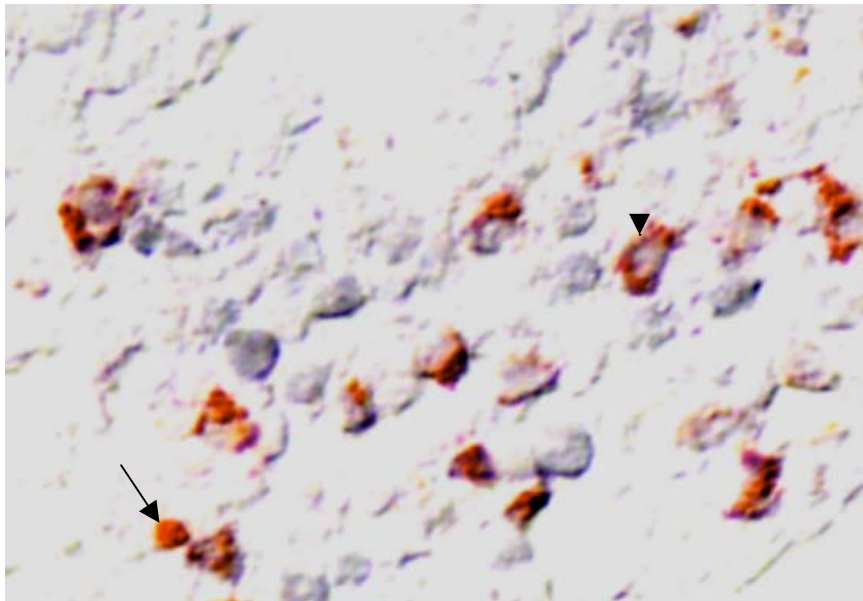


Abb. 23: Doppelmarkierung Amphiregulin und CD68 (Makrophagenmarker)

Amphiregulin-positive Zellen erscheinen blau-grau, CD 68-positive Zellen rot.

Die Pfeilspitze deutet auf eine doppelmarkierte Zelle.

Der Pfeil zeigt eine Zelle, die nur für den Makrophagenmarker CD 68 positiv ist, aber nicht für Amphiregulin.

Nicht alle Makrophagen zeigten eine Anfärbung für Amphiregulin.

Doppelmarkierung von Amphiregulin mit dem Progesteronrezeptor

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Regulation von Amphiregulin über den Progesteronrezeptor in humanem Endometrium wurden Doppelmarkierungen mit dem polyklonalen Amphiregulin-Antikörper und dem Progesteron-Rezeptor-Antikörper Ab 8 (beide Neomarkers) an Paraffinschnitten durchgeführt. Es fanden sich bis auf wenige Ausnahmen keine doppeltmarkierten Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass Amphiregulin und der Progesteronrezeptor mehrheitlich nicht in derselben Zelle kolokalisiert sind. Außerdem fiel auf, dass die amphiregulinpositiven Zellen größer waren als die PR-positiven. Im Zusammenhang mit den vorherigen Ergebnissen der Doppelmarkierung von Amphiregulin und dem Makrophagenmarker CD 68, ist anzunehmen, dass es sich bei den amphiregulinpositiven Zellen um Makrophagen handelt, während der PR in endometrialen Stromazellen exprimiert ist (s. *Abb. 24*).

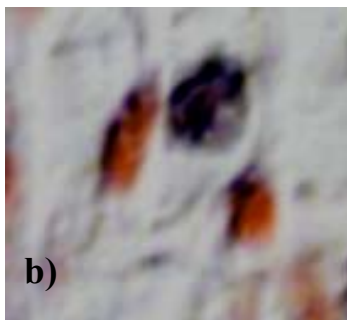
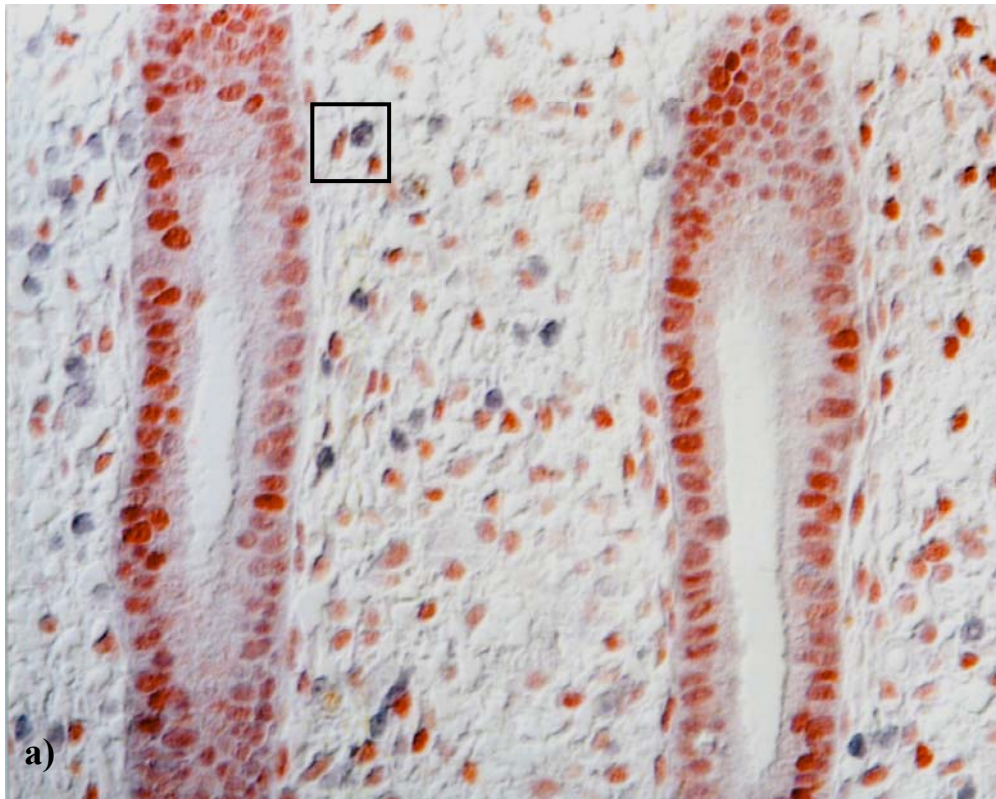


Abb. 24: Doppelmarkierung Amphiregulin und PR Ab 8 (beide Isoformen), frühe Sekretionsphase, 18./19. Zyklustag

Progesteronrezeptor-positive Zellen erscheinen rot, für Amphiregulin positive Zellen blau-grau.

- a) In den Drüsen überwiegt der Progesteronrezeptor, einige Zellen weisen auch Amphiregulin auf. Im Stroma sind sowohl Amphiregulin als auch der PR nachzuweisen, allerdings sind sie nicht in den gleichen Zellen kolokalisiert. Das Rechteck markiert den in b) vergrößerten Ausschnitt.
- b) Die Vergrößerung zeigt, dass Amphiregulin in größeren Zellen lokalisiert ist als der PR. Vermutlich handelt es sich bei der großen Zelle um einen Makrophagen.

3.3.3 Western Blot-Gradientengel mit Endometriumabradaten

Der bereits in der Immunhistochemie eingesetzte polyklonale Antikörper gegen Amphiregulin wurde für Western Blots mit Endometriumabradaten eingesetzt. Das Molekulargewicht von Amphiregulin liegt zwischen 18,5 und 22,5 kDa. Auf dem hier gezeigten Gradientengel liegen die für Amphiregulin spezifischen Banden bei ca. 20 kDa (s. *Abb. 25*). Es wurden Endometriumproben proliferativer und sekretorischer Zyklusstadien untersucht. Alle zeigten eine für Amphiregulin spezifische Bande. Die Abradatproben der mittleren bis späten Proliferationsphase (12./13. bzw. 15. Zyklustag) zeigen eine besonders ausgeprägte Bande. Neben der Bande für Amphiregulin existieren weitere Banden. Eine Progesteronregulation von Amphiregulin ist anhand dieser Untersuchungsergebnisse nicht festzustellen.

Auch T 47 D-Zellen exprimieren Amphiregulin, deshalb wurden sie hier als Positivkontrolle eingesetzt. Es zeigt sich auch für die T-47 D-Zellen eine für Amphiregulin spezifische Bande bei etwa 20 kDa.

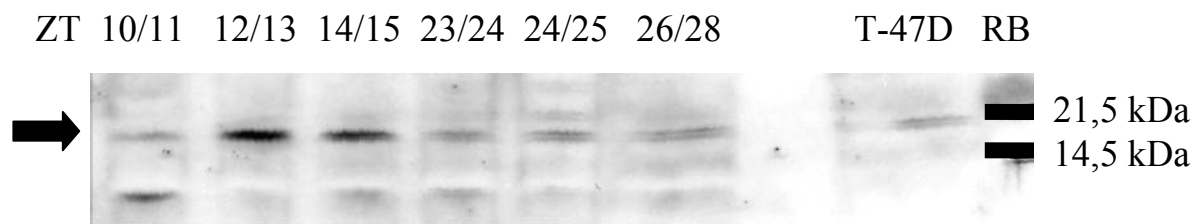


Abb. 25: Amphiregulin-Gradientengel über den Zyklus

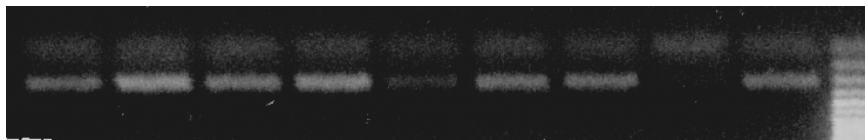
Der Pfeil deutet auf die für Amphiregulin spezifischen Banden (Molekulargewicht von Amphiregulin zwischen 18,5 und 22,5 kDa), T-47D-Zellen als Positivkontrolle.

(ZT = Zyklustag, RB = Rainbow-Bandenmarker)

3.3.4 RT-PCR

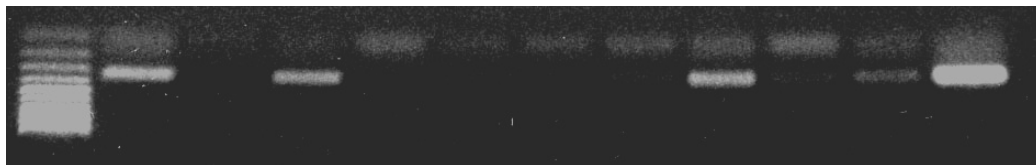
Mit 19 Endometriumproben proliferativer und sekretorischer Zyklusstadien wurde eine RT-PCR mit einem spezifischen Primer für Amphiregulin (Ambion-Kit) durchgeführt (s. Abb. 26). Generell ist festzustellen, dass die endometrialen Proben aus der Proliferationsphase stärkere Banden aufweisen als die sekretorischen Proben, von denen einige ganz negativ sind. Die stärksten Banden weisen Proben des 13/14. bis einschließlich 15. Zyklustag auf, was mit den Ergebnissen des Western Blots übereinstimmt. Bei den Proben aus der Sekretionsphase zeigt sich ein uneinheitliches Muster: eine Probe vom 19. Zyklustag weist eine starke Bande auf, eine weitere Probe desselben Zyklustages dagegen keine, das gleiche gilt für die beiden Proben, die auf den 18/19. Zyklustag datiert wurden. Zyklustag 20 bis 23 weisen keine Bande auf, dagegen ist die Probe des 23./24. Tages wieder stark positiv. Eine spätsekretorische Probe vom 27. Zyklustag ist negativ, eine weitere vom 27. Zyklustag schwach positiv. Für die Sekretionsphase lässt sich aus diesem Ergebnis ableiten, dass die Amphiregulinexpression schwankt, diese Schwankung aber nicht mit bestimmten Zyklustagen oder -stadien korreliert. Eine Regulation durch Progesteron ist daher unwahrscheinlich. Als Positivkontrolle wurde hier Zottenmaterial verwendet, die zugehörige Bande stellt sich stark positiv für Amphiregulin dar.

Proliferations- und frühe Sekretionsphase



ZT 9 13/14 13/14 13/14 14 (7) 15 17 18 BPL

Mittlere und späte Sekretionsphase



BPL 19 19 18/19 19 23 20/21 23 23/24 27 27 Zotten

Abb. 26: Amphiregulin-PCR über den Zyklus.

Starke Signale für Amphiregulin zeigen sich vor allem in der Proliferationsphase, sowie unregelmäßig in der Sekretionsphase.

ZT = Zyklustag, BPL = base pair ladder, Zottenmaterial als Positivkontrolle.

3.4 Untersuchung der Calcitonin-Expression in humanem Endometrium

Calcitonin ist ein Peptidhormon, das vor allem für den Calciumhaushalt in Knochen- und Nierenzellen verantwortlich ist. Außerdem wird Calcitonin in der Schilddrüse von parafollikulären C-Zellen gebildet und in überschießenden Mengen vom medullären Schilddrüsenkarzinom exprimiert. Calcitonin wurde jedoch auch im humanen Endometrium nachgewiesen (Kumar et al., 1998) und wird in der Literatur als progesteronabhängiger potentieller Implantationsmarker gehandelt, der im Mausmodell vornehmlich durch die PR-A-Isoform reguliert wird (Mulac-Jericevic et al., 2000). In dieser Arbeit wurden endometriale Gewebeproben mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden auf ihre Calcitonin-Expression untersucht.

3.4.1 Immunhistochemie

Drei verschiedene kommerziell erhältliche Calcitonin-Antikörper, von denen zwei polyklonal (Peninsula Laboratories und Zymed, USA) und einer monoklonal (Dako, D) waren, wurden sowohl für Paraffin- als auch für Kryostatschnitte verwendet. Die Antikörper wurden in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen und es wurden unterschiedliche Vorbehandlungen der Gewebeschnitte getestet. Als Positivkontrollen dienten normales Schilddrüsengewebe sowie eine Probe aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom. Als Negativkontrolle diente IgG von nicht-immunisierten Tieren.

Trotz Verwendung des in der Publikation zur Calcitonin-Expression im humanen Endometrium beschriebenen Antikörpers (polyklonal, Peninsula) und Verwendung des angegebenen Protokolls sowie der Testung weiterer Antikörper und Variationen in Vorbehandlung und Verdünnung, gelang es nicht, eine spezifische Anfärbung für Calcitonin an humanen endometrialen Gewebeproben nachzuweisen. Die Gewebeschnitte wiesen lediglich unspezifische Anfärbungen auf, die auch in der Negativkontrolle nachweisbar waren. Auch die als Positivkontrolle mitgeführten Gewebeschnitte normalen Schilddrüsengewebes zeigten keine spezifische Anfärbung für Calcitonin. Lediglich die Proben des medullären Schilddrüsenkarzinoms, bei dem Calcitonin vermehrt gebildet wird, zeigten eine spezifische und deutliche Reaktion (*s. Abb. 27*).

3.4.2 ELISA

Da das ELISA-Verfahren eine höhere Sensitivität aufweist als die konventionellen immunhistochemischen Methoden, führten wir einen für Calcitonin spezifischen ELISA (IBL, Hamburg) an Endometriumabradatmaterial durch. Dieser ELISA weist eine Sensitivität von 0,5 pg/ml auf. Der Messbereich (Eichkurve) lag zwischen 9 und 1261 pg/ml. Die meisten endometrialen Proben wiesen einen Calcitoniningehalt unterhalb oder an der Nachweisgrenze (4 pg/ml) des ELISAs auf und lagen alle unterhalb des Bereichs der Eichkurve. Zu den verwendeten Antikörpern und dem ELISA muss angemerkt werden, dass sie für die Diagnostik von Schilddrüsenkarzinomen entwickelt wurden, die einen sehr viel höheren Calcitoniningehalt aufweisen, als im humanen Endometrium vorhanden zu sein scheint.

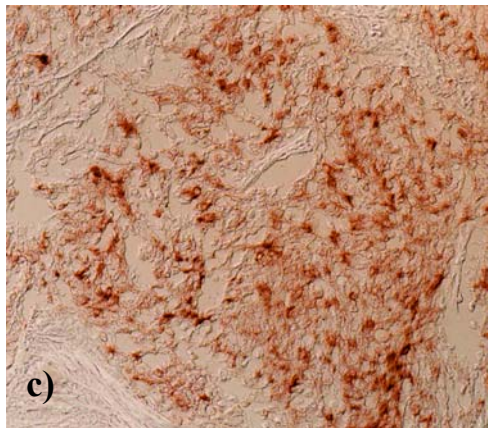
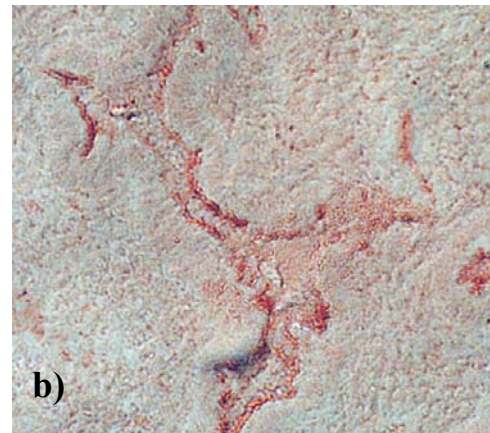
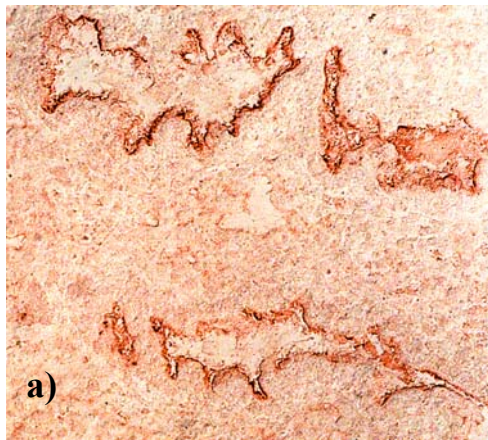
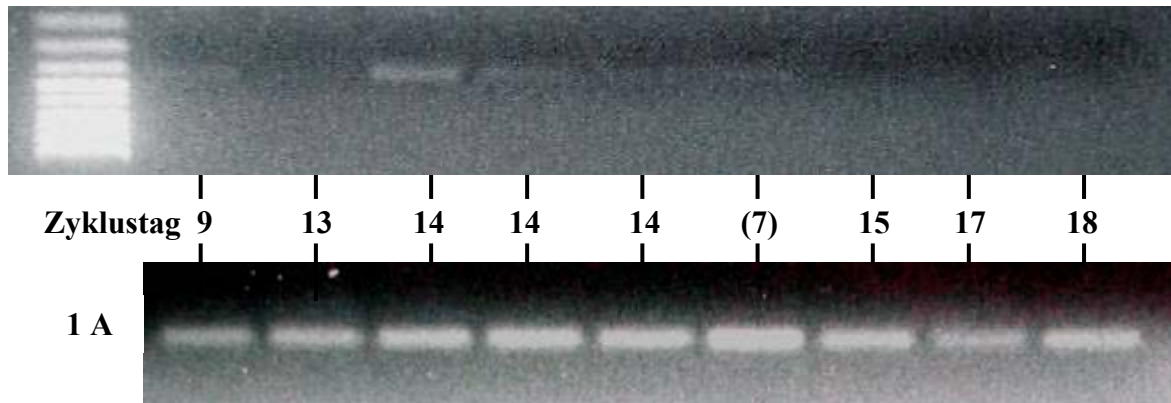


Abb. 27: Immunhistochemische Detektion von Calcitonin

- a) humanes Endometrium – Immunreaktion mit Calcitonin als Primärantikörper
- b) humanes Endometrium – Negativkontrolle – anstelle des Primärantikörpers Inkubation mit Non-Immun-Serum
- c) medulläres Schilddrüsen - Karzinom – Positivkontrolle – Immunreaktion mit Calcitonin als Primärantikörper

Die Negativkontrolle zeigt ein ähnliches Anfärbungsmuster in den Drüsen wie der mit dem Calcitonin-Antikörper inkubierte Gewebsschnitt in a). Damit muss die in a) sichtbare Anfärbung als unspezifisch angesehen werden. Der verwendete Antikörper ist aber durchaus in der Lage, Calcitonin spezifisch nachzuweisen, wie die Positivkontrolle, das medulläre Schilddrüsen-Karzinom, (c) zeigt.

Proliferations- und frühe Sekretionsphase



Mittlere und späte Sekretionsphase

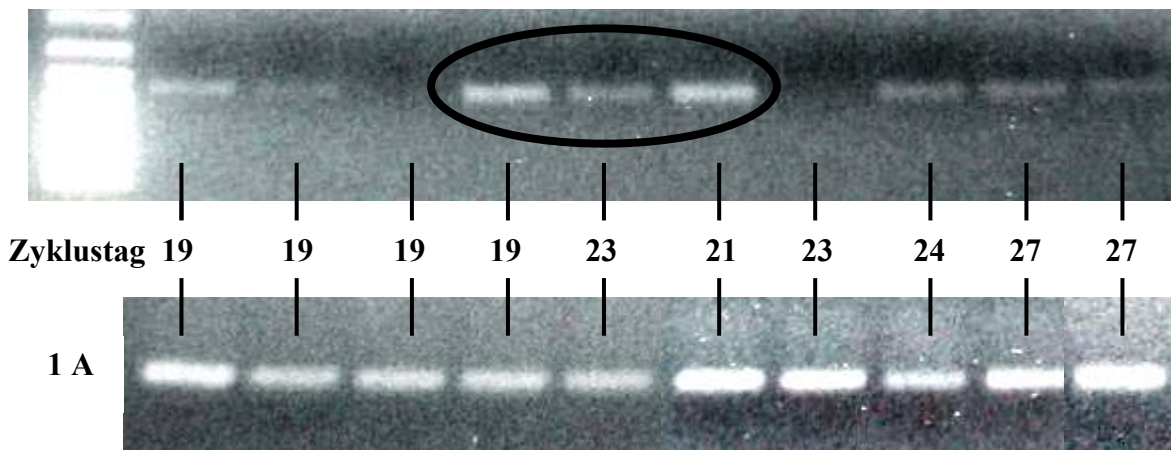


Abb. 28: Calcitonin-RT-PCR über den Zyklus

Housekeeping-Gen 1A als Kontrolle. Markierung: deutliche Banden für Calcitonin in der mittelsekretorischen Phase um den 20. Zyklustag.

3.4.3 RT-PCR

Die PCR mit spezifischen Calcitonin-Primern (Sigma, Darmstadt, D) an Proben der verschiedenen Zyklustage wies für die sekretorischen Proben (Zyklustag 19 bis 23) ein deutliches, für Calcitonin spezifisches Signal auf. Eine Progesteronregulation ist hier also möglich. Um die spezifischen Banden in der PCR darstellen zu können, wurden 38 Zyklen und die doppelte Primermenge benötigt, was ebenfalls ein Hinweis auf die geringe Menge an Calcitonin im humanen Endometrium ist.

4. Diskussion

4.1 Progesteron-Rezeptor Isoformen A und B

4.1.1 Molekulare Grundlagen

Der Progesteron-Rezeptor (PR) gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, die als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren wirken. Der humane PR liegt in zwei Isoformen A und B vor (Horwitz und Alexander, 1983), die von nur einem Gen durch unterschiedliche Promotoren transkribiert werden (Kastner et al., 1990). Die Sequenz beider Isoformen ist identisch, jedoch verfügt die längere Isoform PR B über eine zusätzliche Kette von 164 Aminosäuren an ihrem N-terminalen Ende. Dadurch unterscheiden sich die Isoformen in ihrem Molekulargewicht: Die kürzere Isoform PR A hat ein Molekulargewicht von 94 kDa, die längere B-Isoform dagegen von 114 kDa. Die längere PR-B-Isoform enthält eine dritte Transaktivierungsfunktion, AF-3 (Sartorius et al., 1994).

Die PR-A-Isoform wird als transkriptionell inaktiv und mit inhibierender Wirkung auf PR B beschrieben (Konzept der „transdominant repression“) (Vegeto et al., 1993). PR B dagegen aktiviert die Transkription von Zielgenen. Es wurde eine inhibierende Domäne (ID = inhibiting domain) in der Sequenz des Progesteronrezeptors gefunden, die für beide Isoformen identisch ist. Diese Domäne befindet sich innerhalb der ersten 140 Aminosäuren der PR-A-Isoform (Giangrande et al., 1997). Die zusätzliche Aktivierungsfunktion AF-3 der PR-B-Isoform scheint in der Lage zu sein, die inhibierende Wirkung der ID aufzuheben (Hovland et al., 1998).

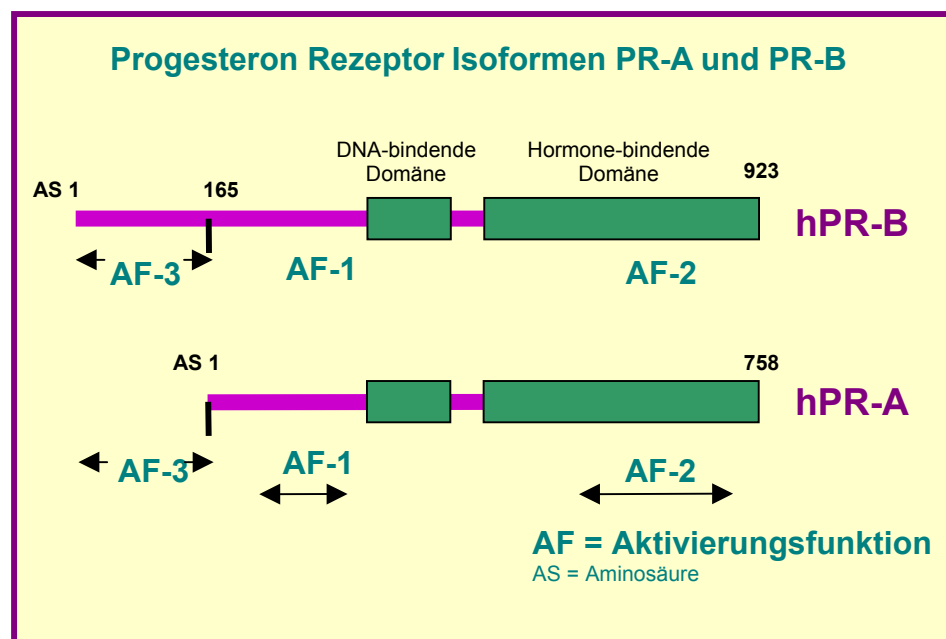


Abb. 29: Progesteronrezeptor- Isoformen A und B (nach Classen-Linke, 2003 bzw. Orla Conneely)

Nach Bindung des Liganden Progesteron an seinen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung (Allan et al., 1992), die eine Dimerisierung von Ligand-Rezeptor-Komplexen bedingt (Tsai et al., 1988; Guiochon-Mantel et al., 1989). Die entstandenen Rezeptor-Dimere binden dann an Hormon-responsive DNA-Elemente in der Promotorregion der Zielgene (Gronemeyer, 1991; Tsai und O'Malley, 1994), deren Transkription so initiiert wird. Die Ausbildung von Homodimeren sowohl der A-Form als auch der B-Form des Progesteronrezeptors und auch die Bildung von Heterodimeren aus beiden Rezeptortypen sind möglich (AA, BB, AB)(Conneely et al., 2001)

Koaktivatoren und Korepressoren

Die Interaktion des ligandenaktivierten PR-Dimers mit dem Transkriptionsapparat des Zielgens kann direkt erfolgen oder zusätzlich durch die Bindung des Hormonrezeptorkomplexes an Koaktivatoren oder Korepressoren vermittelt werden. Diese regulieren dann ihrerseits die Transkription der Zielgene. Zu den bekannten Koaktivatoren zählen SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) und CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), zu den Korepressoren SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors) und NCoR (Nuclear receptor CoRepressor). Bain et al. (2001), die die N-terminalen Regionen beider Isoformen untersucht haben, gehen davon aus, dass die isoform-spezifischen Funktionen nicht nur durch strukturelle Unterschiede bedingt sind, sondern dass die zusätzliche Region des PR-B zur Stabilisierung einer transkriptionell aktiveren Konformation des Rezeptors führt. Desweiteren gibt es Anhaltspunkte dafür, dass nur die PR-B-Isoform bei der Bindung an einen Liganden eine Konformationsänderung vollzieht, die die Dissoziation des Rezeptors von Korepressoren begünstigt und die Interaktion mit einem Koaktivatorkomplex erleichtert, der dann die Transkription aktiviert (Giangrande et al., 2000).

Die Bindung der PR-Isoformen an unterschiedliche Koaktivatoren und Korepressoren trägt zu funktionellen Unterschieden zwischen beiden Isoformen bei. So zeigt beispielsweise PR A eine höhere Affinität zum Korepressor SMRT und ist unfähig, effizient die Kofaktoren SRC-1 und GRIP-1 zu rekrutieren (Giangrande et al., 2000). Dies wird als mögliche Erklärung für die inhibierende Wirkung von PR A angesehen.

Mehrere Studien untersuchten die Expression von Koaktivatoren und Korepressoren im humanen Endometrium hinsichtlich ihrer Zyklusabhängigkeit. Die Ergebnisse widersprechen sich zum Teil. Wieser et al. (2002) untersuchten den Koaktivator SRC-1 sowie die Korepressoren SMRT und N-CoR mittels real-time RT-PCR. Die drei Faktoren waren in allen Zyklusphasen exprimiert, wobei SRC-1 und NCoR während der Menstruation anstiegen. Immunhistochemische Studien derselben Arbeitsgruppe bestätigten die Expression von SRC-1 und NCoR während des gesamten Zyklus.

Andere immunhistochemische Untersuchungen der Koaktivatoren SRC-1 und p300/CREB sowie der Korepressoren SMRT und NCoR ergaben eine nur sporadische und fokale Expression der Korepressoren, eine konstante Expression des Koaktivators p300/CREB und eine dem PR ähnliche Verteilung für SRC-1 (Shiozawa et al., 2003). Die funktionelle Relevanz der bis jetzt nur sporadisch nachgewiesenen Korepressoren ist Gegenstand weiterer Forschung. Eine weitere immunhistochemische Studie (Gregory et al., 2002) wies die Koaktivatoren der p160-Familie SRC-1, AIB-1 und TIF2 in humanen Endometrium nach. AIB-1 zeigte einen Anstieg der glandulären Expression in der späten Sekretionsphase, während SRC-1 und AIB-1 keine signifikanten zyklusabhängigen Veränderungen aufwiesen. Uchikawa et al. (2003) untersuchten die Expression von SRC-1, p300/CBP, NcoR und SMRT in Endometriumkarzinomen und fanden eine verminderte Expression von SRC-1 und p300/CBP in den Proben des Karzinoms. Die topologische Koexpression der Koaktivatoren und ER/PR war dabei verlorengegangen. Die klinisch oft beobachtete verminderte Antwort auf eine Steroidhormonthera-

pie beim Endometrium-Karzinom könnte an der Dissoziation der Kofaktoren und ER/PR liegen.

Weitere Studien sind notwendig, um die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zu validieren und die funktionelle Relevanz und eventuelle Zyklusabhängigkeit der Koaktivatoren und Korepressoren zu verstehen.

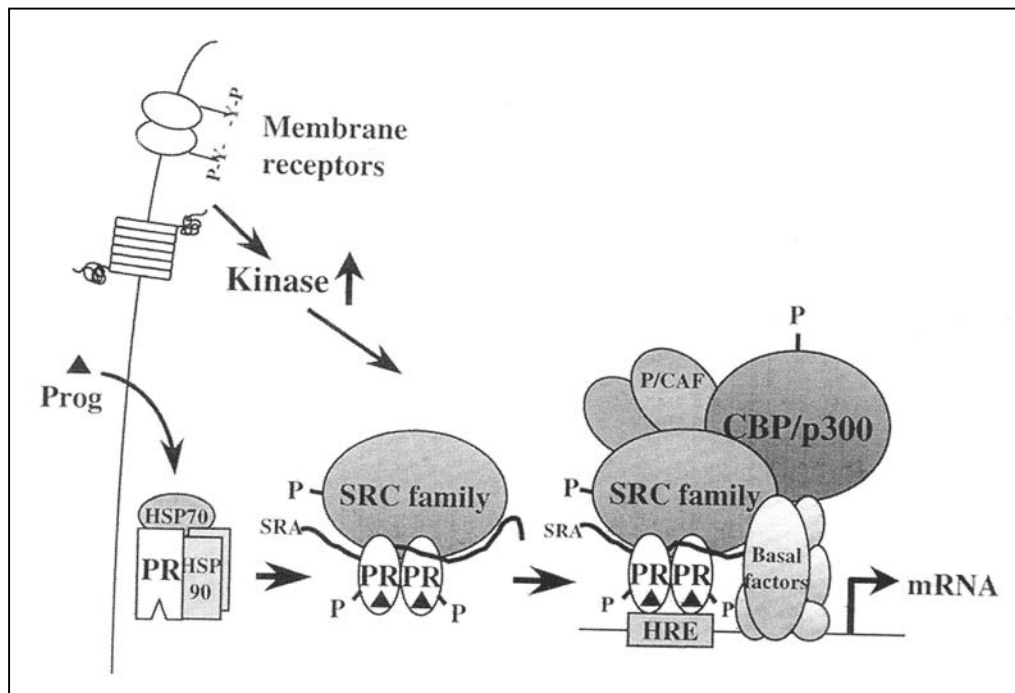


Abb. 30: Mehrstufige Aktivierung des PR durch Kofaktoren

Der PR liegt zunächst als inaktiver Komplex mit Hitzeschockproteinen (HSP) vor. Nach der Bindung von Progesteron (Prog) dissoziieren die HSPs und der PR nimmt eine Konformation an, die zunächst die SRC-Koaktivatorfamilie rekrutiert. Der PR-SRC-Komplex kann dann weitere Kofaktoren zum Promotor rekrutieren die 1.) lokale Chromatinstrukturen durch Histonacetyltransferase(HAT)-Aktivität aufbrechen und 2.) zur Stabilisierung des Präinitiationskomplexes beitragen. Signalwege, die die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen in der Zelle regulieren, tragen zu diesem Prozess durch Änderungen der Phosphorylierung (P) des PR und seiner Kofaktoren bei.

Bedingt durch die zusätzliche Transaktivierungsfunktion der B-Isoform und die starke inhibitorische Komponente der A-Form ergeben sich für die verschiedenen zusammengesetzten Dimere unterschiedliche Progesteron-Antworten. Dieser Argumentation folgend kann also die relative Verteilung der beiden Isoformen zueinander die Art der Progesteronwirkung beeinflussen.

Beide Isoformen stammen von demselben Gen ab, werden aber von verschiedenen Promotoren transkribiert und regulieren z. T. unterschiedliche Zielgene (Kastner et al., 1990). Die unterschiedliche Verteilung der Isoformen in den einzelnen Geweben könnte somit ein System

der gewebspezifischen Regulation der Progestinwirkung bilden und ein hohes Maß an Flexibilität der Progesteronantwort bieten.

4.1.2 Verteilung der PR-Isoformen im humanen Endometrium

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der PR-Isoformen und ihre Zyklusabhängigkeit im humanen Endometrium mit proteinbiochemischen und immunhistochemischen Methoden untersucht.

Untersuchung der PR-Isoformen mit spezifischen Antikörpern

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper Ab 6, Ab 7 und Ab 8 (Gemisch aus hPR a2 und hPR a3) wurden von der Arbeitsgruppe um Clarke (1987) hergestellt und auf ihre Spezifität untersucht. Die Immunoblot-Analyse ergab, dass Ab 6 nur die Bande bei 114 kDa für PR B erkennt, alle anderen Antikörper, Ab 7 eingeschlossen, erkennen auf dem Immunoblot beide Banden, also die B-Form und die für A-spezifische Bande bei 94 kDa. Die Spezifität der Antikörper wurde mit Hilfe von Zelllinien untersucht, die entweder nur PR A oder nur PR B exprimierten (Mote et al, 1999). Diese Versuche zeigten, dass der Antikörper Ab 7 mit immunhistochemischen Methoden nicht in der Lage ist, die B-Isoform zu erkennen. Die Tatsache, dass Ab 7 im Immunoblot beide Isoformen erkennt, mit immunhistochemischen Methoden jedoch nur die A-Isoform, wird damit erklärt, dass die Region, an die der Antikörper bindet, durch die zusätzliche N-terminale Aminosäurenkette der B-Form eine andere Konformation aufweist. Das mit immunhistochemischen Methoden mit dem Ab 7 nicht zu erreichende Epitop ist nach der denaturierenden Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot jedoch zugänglich. Unsere Western-Blot Ergebnisse zeigen ebenfalls zwei spezifische Banden für Ab 7, während das Anfärbungsmuster in der Immunfluoreszenz auf Spezifität für die A-Form schließen lässt.

Immunhistochemie und Immunfluoreszenz zur Untersuchung von PR A und B

Wang et al. (1998) konnten mit immunhistochemischen Methoden eine sich von PR A unterscheidende Regulation der PR-B-Isoform nachweisen. An Endometriumbiopsien, die denselben Frauen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus entnommen wurden, führte man Immunreaktionen mit einem Antikörper, der beide Isoformen erkennt, und an vergleichbaren Schnitten mit einem polyklonalen Antikörper, der nur die B-Form des Rezeptors erkennt, durch und verglich die unterschiedlichen Anfärbungsmuster. Der gegen beide Isoformen gerichtete Antikörper färbte in der Proliferationsphase sowohl Drüsen als auch Stroma stark an, in der Lutealphase und frühen Schwangerschaft aber nur das Stroma. Der für die B-Isoform spezifische Antikörper zeigte in der Proliferationsphase ein vergleichbares Anfärbemuster, in der Lutealphase waren aber weder Drüsen noch das Stroma deutlich markiert. Wang et al. zogen den Schluss, dass die PR-A-Isoform in der Sekretionsphase und frühen Schwangerschaft die vorherrschende Isoform im Stromakompartiment ist, die primär für die komplexen Progesteroneffekte im Endometrium während dieser Phase verantwortlich ist.

Mote et al. gelang 1999 der Nachweis, dass die beiden PR-Isoformen in endometrialen Zellen kolokalisiert sind. Dazu nutzte die Arbeitsgruppe eine Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit zwei Primärantikörpern, die jeweils eine PR-Isoform erkannten (PR Ab 7 für PR A und PR Ab 6 für PR B). Sie fanden für die Drüsen eine Koexpression beider Rezeptortypen während der Proliferationsphase, in der frühen Sekretionsphase ein Überwiegen der A-Isoform, dann allerdings in der mitt-sekretorischen Phase eine stärkere Ausprägung von PR B und in der spätsekretorischen Phase einen sehr starken Rückgang beider Isoformen. Das Stroma zeigte über den Zyklus hinweg eine Dominanz der PR-A-Isoform, während der Proliferationsphase nahm die Expression von PR A im Stroma noch zu. Mote et al. schlussfolgerten, dass die unterschiedliche Verteilung in den Drüsen auf unterschiedliche Sensitivität der bei-

den Isoformen für die downregulierende Progesteronwirkung zurückzuführen ist. Da beide Isoformen in den Drüsen während der subnukleären Vakuolenbildung und Glykogenolyse vorhanden sind, werden beide mit diesem Prozess in Verbindung gebracht. Mote et al. interpretieren die von ihnen festgestellte stärkere Expression von PR B in der Sekretionsphase so, dass diese Isoform größere Bedeutung für Sekretionsvorgänge in der mittsekreterischen Phase haben könnte. Das Vorherrschen von PR A im Stroma bringt diese Isoform ihrer Meinung nach in Zusammenhang mit progesteron-vermittelten Vorgängen wie Prädezipualisierung, Stromaödem und Mitose im Stroma. Die Ergebnisse unterstützen die These, dass beide Isoformen unterschiedlich reguliert sind, wobei PR A als weniger hormonsensitiv gilt, und dass beide verschiedene Wege der Progesteronwirkung beeinflussen.

Die hier zitierte Studie verwendete Endometriumproben aus Hysterektomiematerial, was es unmöglich macht, individuelle Verläufe zu untersuchen. Ein großer Vorteil der Studie von Mote et al. ist die hier angewandte Doppelmarkierung, die eine Untersuchung individueller Zellen auf die Expression beider Isoformen möglich macht. Die immunhistochemischen Untersuchungen von Wang et al. (1998) ziehen jedoch unterschiedliche (wenn auch beieinander liegende) Gewebeschnitte für den Vergleich des Anfärbungsmusters heran.

Für unsere eigenen Studien haben wir beide Untersuchungsmethoden verwendet. An Serienschnitten der Endometriumproben führten wir vergleichende Immunfluoreszenz-Untersuchungen der PR-Antikörper Ab 6, Ab 7 und Ab 8 durch. Dabei wurde für alle Antikörper das Fluorochrom FITC verwendet und so eine unterschiedliche Markierung der Proben durch evt. Unterschiede der Fluorochromintensitäten ausgeschlossen. Um die Koloalisation von PR A und B in individuellen Zellen nachzuweisen, wendeten wir eine Immunfluoreszenzdoppelmarkierung analog zu Mote et al. (1999) an. Um hier auszuschließen, dass nachgewiesene Unterschiede in der Intensität der Isoformen aufgrund der Verwendung unterschiedlich intensiver Fluorochrome entstanden, führten wir Kontrollversuche durch, in denen die Primärantikörper mit dem jeweils anderen Fluorochrom gekoppelt wurden (s. Abb. 13).

Unsere Ergebnisse stimmen in den Hauptaussagen mit den Ergebnissen von Wang und Mote überein. Während der Proliferationsphase sind sowohl Drüsen als auch Stroma deutlich positiv für beide Isoformen, wobei die Drüsen meist etwas stärker angefärbt sind. Etwa um den 19. Zyklustag werden die Drüsen negativ für beide Isoformen und es bleibt lediglich eine unspezifische Eigenfluoreszenz in den Drüsen nachweisbar. In der Sekretionsphase findet sich im Stroma eine intensive Anfärbung für PR A (sogar stärker als in der Proliferationsphase), während PR B nur noch sehr schwach ist. Im Gegensatz zu Mote et al. (1999) fand sich in den von uns immunhistochemisch untersuchten Endometriumproben kein Überwiegen von PR B in den Drüsen der mittsekreterischen Phase (aber im Western Blot, s. dort). Die Drüsen der Basalis bleiben länger positiv und weisen weniger zyklische Schwankungen auf als die Drüsen der Functionalis, die hier vorrangig untersucht wurden.

Western Blots zur Untersuchung von PR A und B

Mangal et al. (1997) wiesen eine zyklusabhängige Expression von PR A und PR B in humanem Endometrium mit proteinbiochemischen Methoden nach. Immunoblots mit einem gegen beide Isoformen gerichteten PR-Antikörper (AB 52, Santa Cruz) an Endometriumbiopsiematerial zeigten zyklusabhängige Schwankungen vor allem für PR B. Beide Isoformen waren während der periovulatorischen Phase am stärksten ausgeprägt, dabei war die A-Isoform immer stärker als die B-Isoform nachzuweisen. PR B ließ sich zu Beginn des Zyklus (Tag 2-8) fast nicht nachweisen und nahm ab Tag 18 bis zur spätsekreterischen Phase, in der die Isoform nicht mehr vorhanden war, stark ab. Eine spezifische Bande für PR A war während des gesamten Zyklus vorhanden. Mangal et al. führten eine quantitative Analyse der Immunoblots durch und geben das Verhältnis von A zu B für die einzelnen Zyklusphasen an. Für

Tag 9-13 wird das Verhältnis von A zu B mit 5:1 und von Tag 14-16 mit 2:1 angegeben. Zu allen anderen Zeitpunkten des Zyklus war das Verhältnis A: B > 10:1. Um die Rezeptorkonzentration der Proben zu erhöhen, wurde dem Immunoblot ein Immunopräzipitationsschritt vorgeschaltet.

Die in meiner Arbeit gezeigten Western Blot-Untersuchungen wurden an vergleichbarem Material (Endometriumabradate) durchgeführt, allerdings wurden unterschiedliche Antikörper benutzt, die jedoch beide in der Lage waren, beide PR-Isoformen zu erkennen.

Im Gegensatz zu Mangal, der PR B erst ab dem 9. Zyklustag nachweisen konnte, ließen sich bei uns bereits am fünften Zyklustag beide PR-Isoformen detektieren, wenn auch schwächer ausgeprägt als in der übrigen Proliferationsphase, in der wir in Übereinstimmung mit Mangal die stärkste Immunoreaktivität für beide Isoformen beobachteten. In der frühen Sekretionsphase (Proben vom 17. und 21. Zyklustag) nimmt die Intensität im Vergleich zur Proliferationsphase ab, ist jedoch am 21. Zyklustag, stärker ausgeprägt als am 17. ZT. Im Verlauf der Sekretionsphase nehmen die Signale für PR A und PR B weiter ab, bleiben jedoch nachweisbar. Für die Endometriumabradate ließ sich kein Unterschied in der Bandendicke zwischen der A- und B-Isoform ausmachen, mit Ausnahme der Probe vom 20./21.ZT, bei der die PR-B-Isoform überwiegt. Nach der quantitativen Auswertung der Bandendichte war das Verhältnis von PR A zu PR B nie größer als Faktor 4,5. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper zu erklären sein. Es konnte für diese Proben auch kein unterschiedlicher Verlauf der beiden Isoformen, wie von Mangal beschrieben, nachgewiesen werden.

Attia et al. (2000) untersuchten Endometriumbiopsien unterschiedlicher Zyklustage (gezeigt ZT 3-26) mit demselben PR-Antikörper wie Mangal et al. (AB 52, Santa Cruz) und ebenfalls nach Immunopräzipitation. Sie wiesen PR A in allen Proben und PR B in 17 von 18 Proben nach. Die höchsten PR-Level wurden in der periovulatorischen Phase (Tag 10-14) beobachtet. Am dritten Zyklustag sind bereits beide Isoformen (schwach) nachweisbar. In der frühen sekretorischen Phase nehmen beide Isoformen etwas ab, in der mittleren bis späten Sekretionsphase nimmt die PR-B-Form jedoch deutlich stärker ab als die A-Form. Die Autoren beschreiben ein ähnliches Verteilungsmuster für beide Isoformen, die Schwankungen seien jedoch für PR B ausgeprägter.

Der semiquantitative Vergleich von Proben mittels Western Blot ist schwierig. Für die quantitative Auswertung der Western Blots normierten wie die Bande auf eine Bande bei 46 kDa, die in allen Proben anteilmäßig gleich stark ist.

Western Blots an getrennten Zellen

Allen oben beschriebenen Immunoblots ist gemeinsam, dass sie an Endometriumproben durchgeführt wurden, die ein Homogenat aus Drüsen- und Stromazellen darstellen. Da aber die Verläufe der PR-Isoformen in Stroma und Drüsenepithel nicht in jeder Zyklusphase gleichartig verlaufen, wie aus den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen hervorgeht, ist es für die Untersuchung der Isoformen und ihrer Verläufe viel sinnvoller, Stroma- und Epithelzellkompartiment getrennt zu betrachten. Dazu trennten wir mit einem speziellen Zelltrennungsvorgang (s. 2.3.2) die Endometriumproben direkt nach ihrer Gewinnung in Epithel- und Stromazellen auf. Der Verlauf der beiden Isoformen in Stroma- und Epithelzellen stimmt mit dem oben beschriebenen zyklischen Verlauf der Homogenate überein. Während der Proliferationsphase (10. ZT) sind PR A und B sowohl in den Drüsen als auch im Stroma am stärksten ausgeprägt. Am 18. ZT überwiegt PR A in den Drüsenzellen, am 19. ZT dagegen PR B. Auch in dem Western Blot mit Abradatmaterial zeigte sich ein Überwiegen der PR-B-Isoform in den Drüsen am 20./21. Zyklustag. Dies würde mit den im-

munhistochemischen Ergebnissen von Mote übereinstimmen, die einen Anstieg von PR B in den Drüsen der mittleren Sekretionsphase zeigten. Unsere immunhistochemischen Studien haben jedoch keinen Anhalt für eine verstärkte PR-B-Expression in den Drüsen in dieser Phase geliefert. Interessant ist der Unterschied der PR-Expression in der spätsekretorischen Phase: Während in der Stromazellfraktion noch (schwache) Banden für beide Isoformen nachweisbar sind, ist das Epithelzellkompartiment in dieser Zyklusphase komplett negativ (bzw. nur sehr schwach positiv am 27. ZT). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit immunhistochemischen und Immunfluoreszenzuntersuchungen von uns und anderen Arbeitsgruppen (*s.o.*).

4.1.3 Unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen des Progesteronrezeptors

Aus Versuchen mit Progesteronrezeptor-Knock-out Mäusen konnten wichtige Erkenntnisse über die Funktionen des Rezeptors gewonnen werden. Zunächst wurde von Lydon et al. (1996) eine PRKO (Progesteron-Rezeptor-Knock-Out)-Maus generiert, die weder PR A noch PR B aufwies. Die Mäuse waren lebensfähig, die weiblichen Tiere wiesen aber schwere Defekte im reproduktiven System auf. Sie waren unfähig zu ovulieren, es zeigte sich eine uterine Hyperplasie mit Entzündungszeichen und eine eingeschränkte Entwicklung der Brustdrüsen sowie eine Beeinträchtigung des Sexualverhaltens.

Später wurden von derselben Arbeitsgruppe auch PRAKO- und PRBKO-Mäuse (Mulac-Jericevic et al., 2000 und 2003) entwickelt, die ein Modellsystem zur Untersuchung der Rolle der beiden PR-Isoformen darstellen. Die PRAKO-Maus, die nur über die B-Isoform des Rezeptors verfügt, zeigt wie die PRKO-Maus keine Ovulation, durch Gonadotropinstimulation ist allerdings eine Superovulation auslösbar. Weiterhin weisen die PRAKO-Mäuse einen Implantationsdefekt auf. In die PRAKO homozygote Maus eingebrachte Wildtyp-Embryonen implantieren nicht und es kommt zu keiner Dezidualisierung des Endometriums. Die hier noch vorhandene PR-Isoform B scheint hingegen einen proliferativen Effekt auf das Endometrium zu haben. Östrogenstimulation bewirkt eine Proliferation der Zellen, die sich unter Zugabe von Progesteron noch merklich verstärkt. Dies ist ein interessanter Befund, da eigentlich Progesteron als Gegenspieler von Östrogen die Proliferation hemmen sollte. Dieser antiproliferative Effekt scheint im Endometrium über die PR-A-Isoform vermittelt zu werden und nicht über PR B. Hinzu kommt, dass das antiproliferative Verhalten der PR-A-Isoform gewebsspezifisch für den Uterus ist, d.h. für die Mamma trifft es nicht zu.

Die PRAKO-Mäuse zeigten eine normale Differenzierung und Proliferation des Mammaepithels unter Progesteronbehandlung, dafür scheint das Vorhandensein der PR-B Isoform auszureichen. Mäuse, die nur über die PR-A-Isoform verfügen (PRBKO-Maus) dagegen weisen Defizite in der Mammaentwicklung auf. Die Aufzweigungen des duktales Mammaepithels sind reduziert und die lobuläre Differenzierung ist herabgesetzt. Die Implantation ist jedoch nicht gestört, und es kommt zu einer normalen Differenzierung des Endometriums ohne Hyperplasien. Dies deutet auf einen eher antiproliferativen Effekt der PR-A-Isoform hin.

Die Autoren (Conneely et al., 2002) gehen davon aus, dass die gewebsspezifischen Effekte der beiden Isoformen eher auf deren Spezifität bezüglich der Aktivierung unterschiedlicher Zielgene zurückzuführen sind als auf die unterschiedliche Expression der Isoformen. Ihre Untersuchungen unterstützen die Ansicht, dass es sich dabei um zwei funktionell unterschiedliche Transkriptionsfaktoren handelt.

Die funktionellen Unterschiede der PR-Isoformen wurden auch mit Hilfe von transfizierten Endometriumkarzinom-Zelllinien untersucht (Smid-Koopman et al., 2003). Die PR A bzw. PR B exprimierenden Zelllinien wurden mit verschiedenen Progestinen kultiviert und der Einfluss der Progestine auf die Expression von Proteinen wurde mittels Microarray untersucht.

Für die PR-B-Zelllinie (PR-B-59) fanden sich keine Proteine, die nach der Progestinbehandlung stärker exprimiert waren, drei Proteine zeigten eine Downregulation, darunter IGFBP-3 (Insulin-Growth-Factor-Binding-Protein 3). Der Microarray wies für die PR-A-Zelllinie nach der Progestinexposition fünf Proteine als stärker und zwei als schwächer exprimiert nach. Es gab keine Übereinstimmungen für die von PR A und PR B als reguliert nachgewiesenen Proteine. Nur die PR-B-Zelllinie zeigte einen wachstumshemmenden Effekt nach Behandlung mit Progestinen. Diese Beobachtung widerspricht anderen Studien (z.B. an Knock-Out-Mäusen, aber auch an Endometrium-CAs, s.u.), die PR A eine antiproliferative und PR B eine proliferative Rolle zuschreiben. Eine nähere Untersuchung der hier über PR A bzw. -B regulierten Proteine ist daher notwendig. Außerdem ist fraglich, inwieweit die Ergebnisse an Untersuchungen mit Karzinomzelllinien auf die in-vivo-Situation übertragbar sind und ob ihre Regulation bezüglich Proliferation und Differenzierung der von normalen Endometriumzellen noch entspricht.

Richer et al. (2002) führten Microarrays an mit PR A oder PR B transformierten T47D-Zellen durch. Die Zelllinien exprimierten jeweils nur eine Isoform und wurden mit Progesteronzusatz kultiviert. Insgesamt wurden 5600 Gene untersucht, von denen 94 eine Progesteronregulation aufwiesen. 65 davon wurden nur durch PR B reguliert, 4 nur durch PR A und 25 durch beide. Die hohe Anzahl der nur von je einer Isoform regulierten Gene war ein überraschendes Ergebnis. Etwa die Hälfte der Gene kodiert für Proteine, die membrangebunden sind oder in membran-assoziierte Signalwege einbezogen sind (z.B. Zelladhäsions- und Zytoskelettproteine, Zytokine und ihre Rezeptoren). Weiterhin waren unter den progesteronregulierten Genen mehrere, die bei der Entwicklung der Mamma bzw. des Mammakarzinoms eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse deuten auf die unterschiedlichen Funktionen der beiden Isoformen hin und unterstreichen die Nützlichkeit der Entwicklung selektiver PR-A- und B-Agonisten bzw. Antagonisten. Gao (2000) und seine Arbeitsgruppe zeigten, dass in humanen endometrialen Stromazellen der ligandenaktivierte PR A ein stärkerer Transaktivator für die Expression von IGFBP-1 ist als PR B. Die Primärkultur endometrialer Stromazellen wurde mit PR A oder PR B sowie dem IGFBP-1 Promotorkonstrukt transfiziert und mit Medroxyprogesteronacetat (MPA) kultiviert. Die mit PR A und dem IGFBP-1 Promotor transfizierten Zellen steigerten die Aktivität des IGFBP-1-Promotors sehr viel stärker als PR B. Dies ist ein weiteres Beispiel für die unterschiedlichen regulativen Einflüsse der beiden Isoformen und auch ein Hinweis darauf, dass PR A vor allem eine Rolle bei der Dezydualisierung spielt, da IGFBP-1 als Dezydualisierungsmarker gilt. Die hier aufgezeigten funktionellen Unterschiede der PR-Isoformen haben direkte klinische Bedeutung für das hormonelle Management uteriner endometrialer Dysplasien. Dabei könnte die Entwicklung PR-A-selektiver Progesteronagonisten den antiproliferativen Effekt dieser Isoform im Endometrium therapeutisch ausnutzen.

4.1.4 Mögliche klinische Relevanz der unterschiedlichen Regulation von PR A und PR B

Progesteron spielt eine wichtige Rolle bei gynäkologischen Erkrankungen wie der Endometriose, dem Endometrium-Karzinom und dem Mamma-Karzinom. Die Untersuchung der PR-Isoformen bei diesen Erkrankungen gibt Hinweise auf den Progesteroneinfluss bei der Entstehung der Karzinome und auf mögliche Therapieansätze.

PR A und B und Endometrium-Karzinom

Der Einfluss von verstärkter Östrogenwirkung, wie z.B. bei der postmenopausalen Hormonersatztherapie, auf die Entwicklung von Endometrium-Karzinomen ist seit längerem nachgewiesen. (Antunes et al., 1979; Weiss et al., 1979, The Million Women study, 2003) Progesteron dagegen wirkt dieser durch Östrogen hervorgerufenen Entwicklung von Endometrium-Karzinomen entgegen. Wie die Knock-Out-Studien an Mäusen gezeigt haben, scheint jedoch

PR B im Endometrium eher eine proliferative Rolle, PR A eine inhibitorische Rolle einzunehmen (Mulac-Jericevic et al., 2000). Die anti-neoplastischen Effekte von Progesteron scheinen eng mit dem Verhältnis der beiden Isoformen zueinander verknüpft zu sein (Kumar et al., 1998a).

Zur Verteilung der PR-Isoformen in Endometrium-Karzinomen und ihrer funktionellen oder prognostischen Bedeutung gibt es allerdings sehr widersprüchliche Studien. In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen vermehrter PR-B-Expression und hoch malignen Zervix-, Endometrium- und Ovarialkarzinomen nahegelegt (Farr et al., 1993; Fujimoto et al., 1997). Andere Studien wiesen eine Erniedrigung des PR-B-Anteils in endometrialen Karzinomzellen nach (Kumar et al., 1998a; Sasaki et al., 2001). Kumar et al. verglichen gut und schlecht differenzierte endometriale Karzinomzelllinien hinsichtlich ihres PR A/PR B Verhältnisses. In den schlecht differenzierten Hec50- und KLE-Zellen wurde im Gegensatz zu den gut differenzierten Ishikawa-Zellen kein PR B mehr exprimiert. Die Autoren vermuten, dass die Downregulation von PR B ein Kennzeichen eines undifferenzierten Karzinoms ist. Eine weitere Studie beschreibt, dass im fortgeschrittenen Endometrium-CA beide PR-Isoformen verlorengehen können (Arnett-Mansfield, 2001). Die zuletzt beschriebene Studie aus der Arbeitsgruppe von Mote und Clarke verwendete das gleiche Doppelimmunfluoreszenz-Protokoll wie für das normale Endometrium bereits beschrieben (PR A an FITC und PR B an Texas Red gekoppelt). Die untersuchten Proben wiesen größtenteils ein Vorherrschen nur einer Isoform auf, wohingegen die normalen Endometriumproben beide Isoformen exprimierten. Die Autoren schließen, dass der Verlust einer der beiden Isoformen und die Verschiebung des PR A/PR B-Verhältnisses zu einer gestörten Genregulation der Zielgene führen kann und so zur Pathogenese des Endometrium-Karzinoms beiträgt. Sasaki et al. (2001) zeigten an Proben von Endometrium-Karzinomen eine Inaktivierung der PR-B-Isoform durch Methylierung einer CG-reichen Region des PR-Gens. In diesen Proben konnte mit immunhistochemischen Methoden keine PR-B-Expression nachgewiesen werden. Für PR A fand sich keine Hypermethylierung und der immunhistochemische Nachweis war möglich. De Vivo et al. (2002) wiesen einen Polymorphismus in der Promotorregion des Progesteronrezeptorgens (+331 G/A) nach, der wahrscheinlich den Anteil der proliferativen PR-B-Isoform erhöht und somit zum Karzinomrisiko beitragen könnte. Die entweder mit PR A oder PR B transfizierten endometrialen Karzinomzellen (Ishikawa-Zellen), die mit Progesteron behandelt wurden, zeigten hingegen einen wachstumshemmenden Effekt für die mit PR B transfizierten Zellen, aber nicht für die mit PR A transfizierten Zellen (Smid-Koopman, 2003). Dai et al. (2002) schließlich postulierten aufgrund der Ergebnisse einer In-vitro-Studie, dass Progesteron Wachstum und Invasivität von Endometriumkarzinomen hemmen könnte und zwar über die Hemmung der für die Invasion und Tumorausbreitung notwendigen Zelladhäsionsmoleküle. Diese Progesteronwirkung wird im wesentlichen über den Progesteronrezeptor B vermittelt, dessen Fehlen mit einer geringeren Differenzierung eines Tumors einhergeht und mit einer höheren Malignität in Beziehung gesetzt wird.

Die hier erwähnten Studien liefern widersprüchliche Aussagen hinsichtlich der Rolle von PR A und B und ihrem Verhältnis zueinander in der Pathogenese des Endometrium-Karzinoms. Bei den Studien handelt es sich um In-vitro- und In-vivo-Studien mit sehr unterschiedlichem Design, die nicht direkt vergleichbar sind. Weitere Studien sind notwendig, um den Einfluss der PR-Isoformen auf das Endometrium-Karzinom zu verstehen und eventuelle therapeutische Ansätze zu verfolgen.

PR A und B und Endometriose

Unter Endometriose versteht man die Ansiedlung endometrialen Gewebes außerhalb des Endometriums, z. B. in Myometrium, Tuben, Ovarien und Vagina, aber auch extragenitale Organe wie Dickdarm oder Blase können befallen sein. Eine Studie von Attia et al. (2000) fand in 18 Biopsien aus Endometrioseherden mittels Western Blot und RNase protection assay nur die A-Isoform des Progesteronrezeptors, während in den Patientinnen parallel entnommenen eutopen endometrialen Gewebeproben beide Rezeptortypen nachzuweisen waren. Die Autoren gehen davon aus, dass das unterschiedliche Verhältnis der beiden Isoformen zueinander über die Wirkung von Progesteron oder die Progesteronresistenz entscheidet. Bei einem Überwiegen der antiproliferativen A-Isoform in den Endometrioseherden könnte ein selektiver PR-A-Agonist einen sinnvollen therapeutischen Ansatz darstellen. Die Arbeitsgruppe hatte bereits zuvor festgestellt, dass in Endometrioseherden das Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD), das für die Umwandlung von Estradiol in die weniger aktive Form Östron gebraucht wird, nicht nachzuweisen war, in normalem Endometrium hingegen schon. Dieses Protein ist progesteronreguliert. Es wird spekuliert, dass das Enzym durch die PR-B-Isoform reguliert und durch das Fehlen dieser Isoform in Endometrioseherden dort nicht exprimiert wird, was zu höheren Estradiolspiegeln und somit Stimulation von Gewebewachstum einhergehen könnte.

Andere Publikationen kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Verteilung der Progesteronrezeptor-Isoformen in Endometrioseherden. Misao et al. (1999) fanden höhere PR-B-Expression in ovariellen Endometrioseherden. Dies könnte durch eine mögliche Kontamination mit progesteronrezeptorpositivem ovariellen Gewebe liegen.

Weitere Studien müssen das Verhältnis von PR A zu PR B in endometriotischen Herden untersuchen, bevor an einen therapeutischen Einsatz selektiver PR-Agonisten zu denken ist.

4.2 Progesteron-regulierte Marker der rezeptiven Phase des Endometriums

Das Endometrium ist nur für eine kurze Zeit während des Zyklus in der Lage, den sich entwickelnden Embryo aufzunehmen und seine Einnistung zu gewährleisten. Dieser Zeitraum wird als die „rezeptive Phase“ bezeichnet. Sie ist durch funktionelle und strukturelle Veränderungen des Endometriums charakterisiert, die durch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron induziert werden (Bagchi und Kumar, 1999). Die in dieser Phase durch Progesteron induzierten Moleküle können, sofern sie identifiziert werden, wichtige Marker für die Rezeptivität des Endometriums darstellen (Giudice, 1999; Bagchi et al., 2001). Die am besten geeigneten Markermoleküle der rezeptiven Phase sind die Moleküle, die in die ersten Schritte der Implantation involviert sind. Aus ethischen Gründen verbieten sich jedoch Versuche am Menschen, die geeignet wären, die Funktion der einzelnen Moleküle im Implantationsprozess zu untersuchen. Aus diesem Grund wird auf In-vitro-Modelle (Primärzellen oder Zelllinien) oder Tiermodelle zurückgegriffen, um Kandidaten für progesteronregulierte Marker zu identifizieren und die Funktion der Moleküle zu untersuchen. Allerdings bestehen häufig Unterschiede in der Expression und Regulation der potentiellen Marker zwischen dem Tiermodell und dem humanen Endometrium. Ein Beispiel dafür ist LIF (leukemia inhibitory factor), der essentiell für die Implantation in der Maus ist (Stewart et al., 1992), beim Menschen dagegen kein eindeutig steroidhormonregulierter Implantationsmarker ist (Arici et al., 1995).

Die Microarray-Technik bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl von Genen gleichzeitig auf eine Expressionsänderung durch Progesteron zu untersuchen. Drei Studien wurden bisher publiziert, die diese Technik an humanen Endometriumproben anwendeten, um neue Kandidaten für progesteronregulierte Markermoleküle zu identifizieren (Carson et al., 2002; Kao et al., 2002; Carlos Simon, 2003). Die Studien identifizierten bereits bekannte aber auch viel

versprechende neue Kandidaten für Marker der uterinen Rezeptivität, darunter Mammaglobin und Osteopontin.

In der vorliegenden Arbeit wurden die bei der Maus progesteronregulierten Markerproteine Calcitonin und Amphiregulin auf ihre Expression und Progesteronregulation im humanen Endometrium untersucht.

4.2.1 Expression und Progesteronregulation von Amphiregulin

Amphiregulin gehört zur EGF(Epidermal Growth Factor)-Familie, die auch TGF α , HB-EGF und Betacellulin umfasst und bindet an den EGF-Rezeptor. Im Uterus der Maus ist Amphiregulin ein für die Implantation spezifischer und progesteronregulierter Marker (Das et al., 1995). Amphiregulin wird am stärksten am Tag der Implantation exprimiert und fällt danach stark ab. Die mRNA des Amphiregulins ist dabei im luminalen Epithel des Endometriums lokalisiert und nur dort, wo die Blastozyste sich befindet. Im murinen Uterus wird eine Regulation von Amphiregulin durch die PR-A-Isoform diskutiert (Mulac-Jericevic et al., 2000). Amphiregulin kann sowohl stimulierend als auch hemmend auf das Wachstum von Zellen wirken. Die Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation erfordert zellspezifische Differenzierung und die Proliferation des Stromas. Diese Funktionen könnten über Amphiregulin gesteuert werden.

Immunhistochemische Untersuchungen am Endometrium von Rhesusaffen (Yue et al., 2000) ergaben die stärkste Amphiregulinfärbung in der mitt-lutealen Phase (Zyklustag 16-20). Amphiregulin wurde im luminalen und Drüsenepithel, im Myometrium und im Stroma detektiert. Es ist jedoch nicht geklärt, ob Amphiregulin im Uterus von Rhesusaffen nur durch Progesteron reguliert wird.

Über die Expression und Progesteronregulation von Amphiregulin im humanen Endometrium gibt es keine Publikationen. Niikura et al. (1996) untersuchten die Expression von Proteinen der EGF-Familie, konnten aber Amphiregulin mit immunhistochemischen Methoden nicht nachweisen. In unseren Studien konnten wir dagegen Amphiregulin eindeutig mit immunhistochemischen Methoden an humanen Endometriumproben nachweisen. Es zeigte sich eine für Amphiregulin spezifische nukleäre Anfärbung sowohl im Oberflächenepithel und in den Drüsen als auch im Stroma. Auch im Myometrium ließ sich eine Amphiregulinexpression nachweisen. Das et al. (1995) beschrieben für das Mausendometrium eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation von Amphiregulin besonders in den Epithelzellen. In unseren Versuchen ließ sich Amphiregulin in allen Zyklusphasen nachweisen, am stärksten ist die Expression in der Proliferationsphase, wie auch unsere PCR- und Western-Blot Ergebnisse nahelegen. Anders als bei der Maus ist Amphiregulin im humanen Uterus nicht durch Progesteron reguliert.

Wir wiesen Amphiregulin gehäuft in Lymphozytenansammlungen innerhalb des Stromas sowie in CD68-positiven Makrophagen nach. Von Mograbi et al. (1997) wurde in in-vitro-Versuchen gezeigt, dass nachdem Monozyten durch Behandlung mit Phorboldibutyrate zu Makrophagen aktiviert wurden, diese Makrophagen Amphiregulin sezernierten. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Proliferation, Prozesse, in die der Wachstumsfaktor Amphiregulin involviert ist. Die von uns nachgewiesene stärkste Expression von Amphiregulin in der ersten Zyklushälfte lässt auf Aufgaben von Amphiregulin bei der Proliferation des Endometriums schließen.

4.2.2 Expression und Progesteronregulation von Calcitonin

Calcitonin ist ein Peptidhormon, das die Calcium-Homöostase reguliert. Es wird vor allem von den parafollikulären Zellen der Schilddrüse sezerniert. Calcitonin wurde aber auch als progesteron-regulierter Marker, der die rezptive Phase des Endometriums anzeigt, beschrieben. Calcitonin wird in der Maus ebenfalls primär durch die PR-A-Isoform reguliert (Mulac-Jericevic et al., 2000).

In der Ratte konnte durch in-situ-Hybridisierungsversuche gezeigt werden, dass die mRNA von Calcitonin während des Implanationszeitraums in den Drüsenepithelzellen synthetisiert wird. Durch weitere Versuche konnte die Progesteronregulation der Calcitoninexpression nachgewiesen werden. Mit der RIA (Radio-Immuno-Assay)-Methode wurden signifikante Mengen Calcitonin im Uterussekret der Ratte zum Zeitpunkt der Implantation detektiert. Wurde die Calcitoninsynthese durch Zugabe von Calcitonin-anti-sense-Oligodesoxynukleotiden abgeschwächt, kam es zu schwerwiegenden Implantationsstörungen der Rattenembryos. Neuere Untersuchungen zur funktionellen Rolle von Calcitonin im Endometrium zeigten zunächst in-vitro an Ishikawa-Zellen und im endometrialen Epithel von Ratten (Li et al., 2002), dass durch Calcitonin zunächst ein intrazellulärer Calciumanstieg erfolgt, gefolgt von der Downregulation des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin. Dieses Adhäsionsmolekül hält die luminalen endometrialen Epithelzellen zusammen, eine Abnahme von E-Cadherin deutet auf eine Lockerung des Zusammenhalts des luminalen Epithels hin, was das Eindringen des Trophoblasten erleichtern und somit zur erfolgreichen Implantation beitragen könnte. Die gleiche Arbeitsgruppe fand auch eine Progesteronregulation von Calcitonin im Endometrium von Pavianen (Kumar et al., 2003). Die höchste Expression von Calcitonin wurde am 9. postovulatorischen Tag beobachtet, dem Tag der Implantation bei Pavianen. Lokalisiert war das Calcitonin im Drüsenepithel und im Stroma des Endometriums während des 9.-11. postovulatorischen Tages. Durch Versuche mit dem Antiprogesterin ZK 137.316, das den PR blockiert, wurde die Progesteronabhängigkeit von Calcitonin demonstriert. Unter Zugabe des Antiprogesterins kam es nicht zu dem Anstieg der Calcitoninexpression während der rezptiven Phase des Endometriums.

Kumar et al. (1998b) untersuchten auch das humane Endometrium auf die Expression von Calcitonin. Mit RT-PCR wurde Calcitonin in der mittleren Sekretionsphase (Zyklustag 17-25) und besonders stark vom 19.-21. Zyklustag nachgewiesen. In diesen Zeitraum fällt die rezptive Phase des humanen Endometriums. In-situ-Hybridisierungsversuche und immunhistochemische Methoden zeigten eine für Calcitonin spezifische Anfärbung vor allem in den Drüsenepithelzellen in der mitt-sekretorischen Phase. In der Proliferationsphase ließ sich kein Calcitonin nachweisen. Im Endometrium mit dem Progesteron-Antagonisten RU486 behandelte Frauen fand sich eine stark reduzierte Calcitoninexpression. Somit scheint Calcitonin ein progesteronregulierter Marker der rezptiven Phase des humanen Endometriums zu sein.

Unsere eigenen Untersuchungen von Calcitonin im humanen Endometrium sind jedoch weniger eindeutig. Die RT-PCR unter Verwendung der doppelten Primermenge wies am 20.-21. Zyklustag die stärksten Banden für Calcitonin auf, im Gegensatz zu keinen bzw. sehr schwachen Banden während der Proliferationsphase. Dieses Ergebnis steht also durchaus im Einklang mit den von Kumar berichteten RT-PCR-Ergebnissen. Der immunhistochemische Nachweis einer spezifischen Calcitoninfärbung gelang uns jedoch nicht, obwohl wir drei verschiedene Antikörper (darunter auch den von Kumar beschriebenen) in verschiedenen Konzentrationen und mit verschiedenen Vorbehandlungen sowohl an Kryostat- als auch an Parafinschnitten verwendeten. Als Positivkontrolle dienten Gewebeschnitte eines medullären Schilddrüsen-Karzinoms, bei dem die Calcitoninexpression massiv ist. Hier konnte eine spezifische Anfärbung von Calcitonin nachgewiesen werden. Desweiteren untersuchten wir Endometriumabradatproben per ELISA, um die Calcitoninexpression nachzuweisen und zu

quantifizieren. Die nachgewiesenen Calcitonin-Mengen bewegten sich an der unteren Nachweisgrenze und wiesen keine höheren Werte in der Lutealphase auf. Die kommerziell erhältlichen ELISAs sind für die Detektion des medullären Schilddrüsen-Karzinoms entwickelt worden, bei dem viel größere Mengen an Calcitonin produziert werden, als im Endometrium zu erwarten ist. Der verwendete ELISA wies allerdings eine sehr hohe Sensitivität von 0,5 pg/ml auf. Normale Serumwerte für Calcitonin liegen zwischen 0 – 5 pg/ml. Keine der untersuchten Proben wies einen Wert über 5 pg/ml auf, so dass davon auszugehen ist, dass nur sehr geringe Mengen Calcitonin im humanen Endometrium exprimiert werden bzw. dass es sezerniert und schnell abgebaut wird. Wenn die exprimierten Calcitoninmengen so gering sind, dass der Nachweis kaum möglich ist, ist es fraglich, ob es im menschlichen Endometrium als geeignetes Markermolekül angesehen und genutzt werden kann.

5. Zusammenfassung

Vorrangiges Ziel dieser Studien war die Untersuchung der zyklusabhängigen, isoformspezifischen Expression des PR im humanen Endometrium, da die bisher existierenden Studien z. T. widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Mittels monoklonaler, isoformspezifischer Antikörper wurde die Verteilung beider Isoformen während des Zyklus dargestellt.

- 1.) Zunächst wurden vergleichende Untersuchungen an Endometriumschnitten unter Verwendung von spezifischen PR A- bzw. PR B-Antikörpern und einem Antikörper, der beide Isoformen erkennt, mittels einfacher Immunfluoreszenz durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden die Antikörper jeweils mit FITC gekoppelt und ihr Anfärbungsmuster an vergleichbaren Endometriumschnitten miteinander verglichen. Diese Methode hat den Vorteil, dass evt. Intensitätsunterschiede durch die Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome ausgeschlossen sind, aber den Nachteil, dass die beiden Isoformen nur an vergleichbaren Schnitten, nicht aber an demselben verglichen werden können.
- 2.) Um nun an ein und demselben Endometriumschnitt die Expression beider Isoformen nachzuweisen, führten wir Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen durch, bei denen PR A mit dem Fluorochrom FITC und PR B mit dem Fluorochrom Texas Red spezifisch markiert wurden. Auf diese Weise konnte die Koexpression der beiden Isoformen in einzelnen Zellen sichtbar gemacht werden. Mit einer speziellen Software wurde die Doppelmarkierung als Mischbild (Overlay-Technik) sichtbar gemacht. Dabei erscheinen Zellen, die für beide Isoformen positiv sind, orange. Die Untersuchungen wurden jeweils mit Endometriumproben der unterschiedlichen Zyklustage durchgeführt. Für 15 Gewebsschnitte wurden stichprobenartig die PR-A- bzw. PR-B-positiven Zellen ausgezählt und nach ihrer Intensität bewertet, um die Ergebnisse zu objektivieren.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten einen zyklusabhängigen, isoformspezifischen Verlauf der beiden PR-Isoformen. In der frühen Proliferationsphase waren beide Isoformen nur schwach vorhanden, um den 10. Zyklustag waren sowohl Stroma als auch Drüsen für beide Isoformen deutlich positiv, wobei die Drüsenzellen noch stärker positiv waren als das Stroma. In der späten Sekretionsphase zeigte sich eine Umkehrung dieser Verteilung: während die Drüsen weitestgehend negativ für beide Isoformen waren, zeigte das Stroma eine starke Anfärbung für PR A jedoch fast keine für PR B.

- 3.) Diese Ergebnisse wurden mittels Western Blot-Untersuchungen an Endometriumabradatproben der verschiedenen Zyklustage mit den isoformspezifischen Antikörpern überprüft. Dabei wurde ebenfalls ein zyklischer Verlauf der PR-Expression nachgewiesen, mit starker Expression in der Proliferationsphase und einem starken Rückgang in der späten Sekretionsphase. Da die Endometriumabradate aber sowohl Drüsen- als auch Stromazellen aufweisen, ließen sich die isoformspezifischen Unterschiede in den einzelnen Kompartimenten mit dieser Methode nicht nachweisen.
- 4.) Um Stroma- und Epithelzellkompartiment getrennt untersuchen zu können, trennten wir die Endometriumproben direkt nach ihrer Gewinnung in Stroma- und Epithelzellen. Dieses Verfahren ist besonders aussagekräftig, da es die differenzierte Darstellung der Expression in Stroma und Drüsen ermöglicht. Diese Western Blots weisen eine isoformspezifische Expression des PR nach. In der spätsekretorischen Phase ist in den Stromazellen

fast ausschließlich PR A nachzuweisen, während die Epithelzellen für beide Isoformen negativ sind. Die Western Blots wurden quantitativ ausgewertet durch die Bestimmung der Bandendichte. Bisher publizierte Studien zu den PR-Isoformen verwendeten stets Abradatmaterial, welches sowohl Stroma- als auch Epithelzellen enthält, und lieferten widersprüchliche Ergebnisse.

PR A scheint die für die Dezidualisierung verantwortliche Isoform zu sein, da wir hauptsächlich diese Isoform ab Tag 24 im Stroma finden.

Diese Studie möchte einen Beitrag zur Aufklärung der physiologischen Regulation des Endometriums durch die PR-Isoformen leisten. Erkenntnisse über die Regulation im normalen Endometrium stellen die Grundlage dar für das Verständnis der Rolle der PR-Isoformen bei so wichtigen gynäkologischen Erkrankungen wie Endometriose, dem Endometrium-Karzinom und dem Mamma-Karzinom, bei denen es zu Veränderungen der PR-Isoform-Expression kommt. Ein therapeutischer Ansatz besteht in der Entwicklung selektiver PR-Agonisten bzw. PR-Antagonisten und ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die beiden PR-Isoformen unterscheiden sich nicht nur in ihrer zyklusabhängigen Expression, sondern sie regulieren auch verschiedene Gene. Progesteronabhängige Markermoleküle könnten als Marker für die Implantationsphase des Endometriums genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die in der Maus durch Progesteron regulierten Markermoleküle Amphiregulin und Calcitonin auf eine mögliche Progesteronabhängigkeit untersucht. Beide sollen in der Maus vornehmlich durch PR A reguliert sein (Mulac-Jericevic et al., 2000). Es liegen bisher keine Untersuchungen zu Amphiregulin im humanen Endometrium vor. Amphiregulin wurde von mir in Endometriumzellen mittels Immunhistochemie, Western Blot und PCR in allen Zyklusphasen nachgewiesen. Die Expression von Amphiregulin zeigte keine Progesteronregulation, die stärkste Expression fand sich in der Proliferationsphase. Amphiregulinpositive Zellen fanden sich sowohl im Stroma als auch in Drüsen- und Oberflächenepithelzellen und ganz besonders in Lymphozytenansammlungen und Makrophagen. Eine Doppelmarkierung mit dem Makrophagenmarker CD 68 zeigte eine Kolo-kalisation mit Amphiregulin. Amphiregulin wird in einigen Makrophagen exprimiert aber nicht in allen und zeigt dabei keine zyklusabhängigen Veränderungen.

Calcitonin, das auch im humanen Endometrium über Progesteron reguliert sein soll (Kumar et al., 1998b), ließ sich trotz der Verwendung von drei verschiedenen Calcitonin-Antikörpern weder an Paraffin- noch an Kryostatschnitten spezifisch immunhistochemisch nachweisen. Der durchgeführte ELISA an Endometriumabradaten wies nur äußerst geringe Mengen Calcitonin nach, die unterhalb der Eichkurve des ELISAs lagen. Die PCR mit der doppelten Primermenge und einer hohen Zykluszahl wies jedoch eine Calcitoninexpression in der Sekretionsphase nach. Wahrscheinlich ist Calcitonin im Endometrium nur in sehr geringen Mengen vorhanden; die großen Schwierigkeiten, es überhaupt nachzuweisen, lassen es für eine mögliche Verwendung als progesteronreguliertes Markermolekül als ungeeignet erscheinen.

6. Liste der Endometriumpuben

Endometriumpuben Immunhistochemie Amphiregulin

Probe	Alter	LH mIU/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nachdatiert
01.10.97E	49	4,2	10	750	24.	24.
16.06.98L	32	4,51	99,71	443	10.	10.
30.06.98E	38	1,75	<<	1814	29.	28.
21.07.98E	38	5,73	52,32	13098	19.	19.
02.02.99M	?	1,55	11,91	295	Zweite Hälfte	13./14.
10.03.99L	47	2,59	12,67	1655	24..	19./20.
29.07.99E	40	0,92	2,67	399	33.	
24.08.99M	37	3,92	100,92	12729	20.	18./19. (Glykogenvak.)
21.09.99M	48	3,96	80,79	5505	11.	
11.10.99M	46	3,65	47,20	1618	15.	
07.12.99M	48	6,46	94,11	448	11.	11.
07.01.00E	49	0,72	46,05	9420	19.	18./19.
21.03.00M	34	4,22	58,01	4310	24.	23./24. (Protrusionen)
30.03.00E	44	11,91	11,94	812	11.	10./11.
05.04.00E	39	7,14	141,44	522	9.	9.
18.04.00E	38	2,22	4,11	794	3.	3./5.
24.05.00E	30	1,67	112,19	17938	14.	23.
04.07.00E	47	1,30	112,87	12247	21.	21./23.
12.07.00M	41	3,58	46,53	750	7.	7.
13.07.00E	42	5,79	123,84	12011	17.	17.
26.09.00M	43	4,67	83	2010	8.	13./14.
05.10.00E2	42	22,46	109	1460	12.	13./14.
16.11.00E	43	3,89	49	17170	24.	24./25.
21.11.00K	33	2,43	81	2670	25.	25.
23.11.00L	47	1,94	115	4450	28.	26./28.
04.01.01M	42	10,08	243	460	15.	14./15.
30.03.01L	41	1,06	85	7210	23.	23./24.
05.04.01E	41	5,69	170	1080	13.	12./13.
24.04.01M	40	3,80	17	1090	6.	6.
24.07.01M	43	3,2	95	10125	19.	18.
21.09.01L	50	3,6	107	13230	24.	23./24.
31.10.01L	45	0,79	53	8740	19.	20./21. (Protrusionen)
05.12.01M1	46	6,72	10,35	352	Mens	Mens
13.12.01	41	5,59	106,28	9125	16./17.	17.
09.01.02E	41	2,98	42,80	542	8.	8./9.
15.01.02E	36	61,56	227,63	1835	15.	15.

Endometriumproben Immunhistochemie Calcitonin

Probe	Alter	LH mIU/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nachdatiert
07.05.02E	40	5,63	78,29	4702	11.	17. (Glykogenvak.)
22.05.02L	48	2,65	41,08	4277	21.	23./24.
04.06.02M	43	36,65	332,0	1633	13.	13. (LH-Peak)
07.06.02E	48	6,67	63,21	7588	22.	18./19. (Glykogenvak.)
26.06.02E	47	1,22	105,86	10382	17.	19.
09.07.02M	37	2,82	18,60	1089	vor 4 Wo.	25./26.
10.09.02E	47	1,7	106,0	5490	21.	25.
27.09.02M	45	1,2	49,0	795	8.	7./8.
11.10.02E	45	7,5	85,0	4900	9.	9.-11.

Endometriumproben Immunfluoreszenz Ab 6, 7 und 8 mit FITC

Probe	Alter	LH mIU/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nachdatiert
15.11.95					Spätsekr.	25.-27.
07.05.02E	40	5,63	78,29	4702	11.	17. (Glykogenvak.)
22.05.02L	48	2,65	41,08	4277	21.	23./24.
04.06.02M	43	36,65	332,0	1633	13.	13. (LH-Peak)
07.06.02E	48	6,67	63,21	7588	22.	18./19. (Glykogenvak.)
26.06.02E	47	1,22	105,86	10382	17.	19.
02.07.02E	40	7,10	193,83	750	11.	10./11.
09.07.02K	50	49,92	235,81	1952	8.	13./14. (LH-Peak)
09.07.02M	37	2,82	18,60	1089	vor 4 Wo.	25./26.
30.07.02E	49	8,9	42,0	1558	5.	5. (Ende Mens)
10.09.02E	47	1,7	106,0	5490	21.	25.
27.09.02M	45	1,2	49,0	795	8.	7./8.
11.10.02E	45	7,5	85,0	4900	9.	9.-11.
03.12.02L1	48	2,2	35,0	4139	30.	26.-28.

Endometriumproben Doppelimmunfluoreszenz

Probe	Alter	LH mIU/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nach- datiert
15.11.95					spätsekr.	25.-27.
23.11.00L	47	1,94	115	4450	28.	23.-24.
07.05.02E	40	5,63	78,29	4702	11.	17. (Glykogenvak.)
22.05.02L	48	2,65	41,08	4277	vor 3 Wo.	23./24.
04.06.02M	43	36,65	332,0	1633	13.	13. (LH-Peak)
07.06.02E	48	6,67	63,21	7588	22.	18./19. (Glykogenvak.)
26.06.02E	47	1,22	105,86	10382	17.	19.
02.07.02E	40	7,10	193,83	750	11.	10./11.
09.07.02M	37	2,82	18,60	1089	vor 4 Wo.	25./26.
11.07.02E	41	4,1	181,0	8181	24.	22./23.
18.07.02	42	3,2	48,0	224	9.	9.
19.07.02K	32	6,7	93,0	7706	25.	25.
30.07.02E	49	8,9	42,0	1558	5.	5. (Ende Mens)
27.09.02M	45	1,2	49,0	795	8.	7./8.
11.10.02E	45	7,5	85,0	4900	9.	9.-11.
19.11.02	36	4,0	16,0	2569	vor 3 Wo.	26-28.ZT
03.12.02L1	48	2,2	35,0	4139	30.	26.-28.
05.02.03	40	18,9	181,0	1508	30.	ca.16. Zt.
07.02.03		???	...		Vor 3-4 Wo	19. (Glykogen- vak.)
12.02.03E	38	3,5	102,0	1804	10.	10.
14.02.03	47	4,9	18,0	954	2.	2. (Mens)
18.02.03	42	2,9	117,0	19 289	29.	25.-27.
19.02.03	42	3,7	106,0	661	18.	13./14.
21.02.03	43	9,8	34,0	876	vor 1 Wo	7./8.
25.02.03	50	7,2	21,0	1004	ca. 18.	Eher spätprolif., keine Glykogen- vak., gering auf- gebaut

Endometriumabrade Western Blot Ab 6, Ab 7, Ab 8

Probe	Alter	LH mIU/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nach- datiert
23.01.01L2	43	34,29	133	1500	12.	14.
28.02.01E	37	1,9	48	2270	27.	27.
01.03.01E	42	1,45	67	4450	16.	17. (Glykogenvak.)
05.04.01E	41	5,69	170	1080	13.	12./13.
06.06.01M	41	1,14	71	7760	25.	25.
31.10.01L	45	0,79	53	8740	19.	20./21. (Protrusionen)

22.05.02L	48	2,65	41,08	4277	vor 3 Wo.	23./24.
07.06.02M	49	3,55	61,77	396	9.	9.-11.
30.07.02 E	49	8,9	42,0	1558	5.	5. (Ende Mens)
14.11.02L	41	2,4	256,0	1281	8.	8.
19.11.02E	36	4,0	16,0	2569	vor 3 Wo.	26.-28.

Zelltrennungen Western Blots

Probe	Alter	LH mIu/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nachdatiert
05.02.03	40	18,9	181,0	1508	30.	ca. 16. Zt.
07.02.03					Vor 3-4 Wo	19. (Glykogen- vak.)
12.02.03	38	3,5	102,0	1804	10.	10.
14.02.03	47	4,9	18,0	954	2.	2. (Mens)
18.02.03	42	2,9	117,0	19 289	29.	25.-27.
19.02.03	42	3,7	106,0	661	18.	13./14.
21.02.03	43	9,8	34,0	876	vor 1 Wo	7./8.
25.02.03	50	7,2	21,0	1004	ca. 18.	eher spätprolif., keine Glykogen- vak., gering auf- gebaut
25.03.03	49	1,4	7,0	15263	ca. 21.	21. (Protrusionen)
26.03.03	48	2,0	21,0	9564	27.	25.-27.

Proben Gradientengel Amphiregulin

Probe	Alter	LH mIu/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nachdatiert
27.06.00L	48	3,07	40,97	1152	14.	10./11.
05.04.01E	41	5,69	170	1080	13.	12./13.
04.01.01M	42	10,08	243	460	15.	14./15.
30.03.01L	41	1,06	85	7210	23.	23./24.
16.11.00K	43	3,89	49	17170	24.	24./25.
03.12.02L1	48	2,2	35,0	4139	30.	26.-28.

PCR Proben Amphiregulin – Calcitonin

Probe	Alter	LH mIu/ml	Estradiol pg/ml	Progesteron pg/ml	Zyklustag anamnestisch	Zyklustag nachdatiert
21.07.98E	38	5,73	52,32	13098	19.	19.
02.02.99 M	?	1,55	11,91	295	2. Hälfte	13./14.
30.04.99M	41	3,51	55,50	4913	vor 3 Wo.	27.
05.05.99E	50	3,74	108,47	11516	19.	kein Schnitt
24.08.99M	37	3,92	100,92	12729	20.	18./19. (Glykogenvak.)
21.03.00M	34	4,22	58,01	4310	24.	23./24. (Protr.)

05.04.00E	39	7,14	141,44	522	9.	9.
(23.05.00M	51	9,90	198,32	598	7.	7., 51 Jahre)
24.05.00E	30	1,67	112,19	17938	14.	23.
28.06.00E	36	2,56	99,18	10186	7.	18.
26.09.00M	43	4,67	83	2010	8.	13./14.
05.10.00E2	42	22,46	109	1460	12.	13./14.
07.02.01K	44	1,08	110	7530	14.	23.
28.02.01E	37	1,9	48	2270	27.	27.
08.05.01L2	49	48,07	145	1920	14.	14.
21.08.01E	41	1,93	62	11275	27.	19.
31.10.01L	45	0,79	53	8740	19.	20./21. (Protrusionen)
13.12.01M	41	5,59	106,28	9125	16./17.	17.
15.01.02E	36	61,56	227,63	1835	15.	15.

Progesteron-Normwerte ACS: 180® (Bayer, Leverkusen, D):

Follikularphase: 150-1400 pg/ml
Lutealphase: 3340-25560 pg/ml
Mittlere Lutealphase: 4440-28030 pg/ml

7. Anhang

SDS-Gelektrophorese

10% homogene SDS-Gele		Sammelgel		Stopgel	
40% Acrylamid	3000 µl	40% Acrylamid	800 µl	40% Acrylamid	100 µl
H ₂ O	6243 µl	H ₂ O	5570 µl		
Trenngel-puffer	2620 µl	Sammelgel-puffer	524 µl	Trenngel-puffer	400 µl
10% SDS	108 µl	10% SDS	57 µl		
Temed	9 µl	Temed	7 µl	Temed	2,5 µl
10 % Per**	10 µl	10% Per	35 µl	10% Per	15 µl

* Sodiumdodecylsulfat

**Ammoniumperoxodisulfat

Gradientengel

Gradient	16,6%	8,3%
40% Acrylamid	2490 µl	1240 µl
H ₂ O	--	3230 µl
Glycerin	2000 µl	--
Trenngelpuffer	1450 µl	1450 µl
10% SDS	60 µl	60 µl
Temed	5 µl	5 µl
10% Per	11 µl	11 µl
	= 6ml	= 6 ml

Trenngelpuffer	Probenpuffer	Laufpuffer
20 g Tris	0,378 g Tris (0,0625 M)	12,12 g Tris (0,025 M)
50 ml H ₂ O	5,0 ml Glycerin (10%)	56,60 g Glycin (0,192 M)
mit 6 NHCL pH 8,8	2,5 ml Mercaptoethanol	4,00 g SDS (0,1%)
ad 100 ml H ₂ O	1,5 g SDS (3%)	4000 ml H ₂ O
	pH 6,8	
	ad 50 ml H ₂ O	
	etwas Bromphenolblau	

Western Blot

Transferpuffer 1	Transferpuffer 2	Transferpuffer 3
3,03 g Tris	3,03 g Tris	36,34 g Tris
5,20 g Carbonsäure		
200 ml Methanol	200 ml Methanol	200 ml Methanol
ad 1000 ml H ₂ O	ad 800 ml H ₂ O	ad 800 ml H ₂ O

TBS – Stammlösung (10fach konzentriert):

6,1 g Tris
76,5 g NaCl
1800 ml H₂O
ph 7,6
ad 1000 ml H₂O

TBS + 0,1% Tween

200 ml Stammlösung
2 ml Tween

Blockierungs-Puffer

TBS + 0,1% + 5% Milcheiweiß oder
5% PVA oder
5% Serum
2,5 g Milchpulver
50 ml H₂O

Coomassie für Membranen

2,5 g Coomassie G (Serva Blue G)
454 ml Methanol
454 ml Essigsäure
92 ml H₂O

Entfärber für Membranen

490 ml Methanol
490 ml H₂O
20 ml Essigsäure

PCR

Mastermix

83,5 µl H₂O
10 µl 10x Puffer
2 µl NTP
0,5 µl Taq-Polymerase
= 96 µl
+ 1 µl Primer forward (für Calcitonin doppelte Primermenge)
+ 1 µl Primer reverse (für Calcitonin doppelte Primermenge)
+ 2 µl cDNA (bzw. nach 1A-Abgleich)
= 100 µl

8. Literaturverzeichnis

- Allan, G.F.,** Leng, X., Tsai, S.Y., Weigel, N.L., Edwards, D.P., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1992) Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J. Biol. Chem.* 267, 19513-19520
- Allan, G.F.,** Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1992) Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11750-11754
- Alfer, J.** (2000) Markermoleküle endometrialer Funktionen: Vergleichende immunhistochemische Lokalisierung bei fertilen und subfertilen Patientinnen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen, D
- Antunes, C.M.,** Stollez, P.D., Rosenshein, N.B., Davies, J.L., Tonascia, J.A., Brown, C., Burnett, L., Rutledge, A., Pokempner, M., and Garcia, R. (1979) Endometrial cancer and Estrogen use. Report of a large case-control study. *N. Engl. J. Med.*, 300: 9-13
- Arici, A.,** Engin, O., Attar, E. and Olive, D.L. (1995) Modulation of Leukemia Inhibitory Factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80: 1908-1915
- Arnett-Mansfield, R.L.,** de Fazio, A., Wain, G.V., Jaworski R.C., Byth, K., Mote, P.A., Clarke, C.L. (2001) Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrial cancers of the endometrium. *Cancer Res.* 2001 Jun 1; 61(11): 4576-82
- Attia, G.R.,** Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B.R., Bulun, S.E. (2000) Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 2897-2902
- Bagchi, I.C.,** Li Q., Cheon, Y.P. (2001) Role of steroid hormone-regulated genes in implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Sep; 943: 68-76
- Bagchi I.C.,** Kumar, S. (1999) Steroid-regulated molecular markers of implantation. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999; 17(3): 235-40
- Bain, D.L.,** Franden, M.A., McManaman J.L., Takimoto, G.S., Horwitz, K.B. (2001) The N-terminal region of human progesterone receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J Biol Chem* 2001 Jun 29; 276(26): 23825-31
- Beck, C.A.,** Weigel, N.L., Edwards, D.P. (1992) Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol.* 1992 Apr; 6(4): 607-20
- Beier, H.M.,** Beier-Hellwig, K. (1998) Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 5: 448-458

Beier, H.M. (1997) Cell biological aspects of the implantation window. In: The Endometrium as a Target for Contraception, Ernst Schering Research Foundation Workshop 18, 51-90, Springer Verlag

Beier-Hellwig, K., Sterzik, K., Beier, H.M. (1998) Molekulare und zellbiologische Aspekte der endometrialen Rezeptivität und ihre Diagnostik. Der Gynäkologe, 31: 325-338

Beral, V.; Million Women Study Collaborators (2003) Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. Lancet, 2003 Aug 9; 362(9382):419-27

Bergeron, C., Ferenczy, A., Toft, D.O., Schneider, W., Shyamala, G. (1988) Immunocytochemical study of progesterone receptors in the human endometrium during the menstrual cycle. Lab Invest. 59: 862-869

Carson, D.D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M.C., Vernon, M., Yuan, L., Fritz, M.A. and Lessey, B. (2002) Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. Molecular Human Reproduction Vol. 8, No. 9 pp. 871-879

Clarke, C.L., Zaino, R.J., Feil, P.D., Miller, J.V., Steck, M.E., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Satyaswaroop, P.G. (1987) Monoclonal antibodies to human progesterone receptor: characterization by biochemical and immunohistochemical techniques. Endocrinology, 1987 Sep; 121(3): 1123-32

Classen-Linke, I. (2000) Hormonelle Regulation endometrialer Zellen: vergleichende Untersuchungen in vivo und in vitro, Habilitationsschrift an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen, D

Classen-Linke, I., Alfer, J., Krusche, C.A., Chwalisz, K., Rath, W., Beier, H.M. (2000) Progestins, progesterone receptor modulators and antagonists change VEGF-release of endometrial cells in culture. Steroids 65(10-11):763-71

Classen-Linke, I., Alfer, J., Hey, S., Krusche, C.A., Kusche, M., Beier, H.M. (1998) Marker molecules of a human endometrial differentiation can be hormonally regulated under in-vitro conditions as in-vivo. Hum Reprod Update, 4: 539-549

Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., De Mayo, F.J. (2001) Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. Mol Cell Endocrinol 2001 Jun 20;179(1-2): 97-103

Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., DeMayo, F., Lydon, J.P., O'Malley, B.W. (2002) Reproductive functions of progesterone receptors. Recent Prog Horm Res. 57: 339-55

Dai, D., Wolf, D.M., Litman, E.S., White, M.J., Leslie, K.K (2002) Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. Cancer Res. 2002 Feb 1; 62(3): 881-6

Das, S.K., Chakraborty, I., Paria, B.C., Wang, X.-N., Plowman, G., Dey, S.K. (1995) Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. Mol Endocrinol 9: 691-705

De Vivo, I., Huggins, G.S., Hankinson, S.E., Lescault, P.J., Boezen, M., Colditz, G.A., Hunter, D.J. (2002) A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 Sep. 17; 99(19): 12263-8

Ding, Y.Q., Zhu, L.J., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C. (1994) Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology* 135: 2265-2274

Farr, C., Easty, D., Ragoussis, J., Collignon, J., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. (1993) Overexpression PR B in endometrial cancer
Mamm. Genome 4, 577-584

Fujimoto, J., Ichigo, S., Hirose, R., Sakaguchi, H. and Tamaya, T. (1997) Overexpression PR B in endometrial cancer
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 62, 449-454

Gao J., Mazella, J., Tang, M., Tseng, L. (2000) Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2000 Dec.; 14(12): 1954-61

Giangrande, P.H., Kimbrel, E.A., Edwards, D.P., McDonnell, D.P. (2000) The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol.* 2000 May; 20(9): 3102-15

Giangrande, P.H., Pollio, G., McDonnell, D.P. (1997) Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 32889-32900

Giudice, L.C. (1999) Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J Reprod Med* 1999 Feb; 44(2 Suppl): 165-71

Gregory, C.W., Wilson, E.M., Apparao, K.B.C., Lininger, R.A., Meyer, W.R., Kowalik, A., Fritz, M.A., Lessey, B.A. (2002) Steroid Receptor Coactivator Expression throughout the Menstrual Cycle in Normal and Abnormal Endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(6): 2960-2966

Gronemeyer, H. (1991) Transcription activation by Estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.* 25, 89-125

Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., Milgrom, E. (1989) Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57, 1147-1154

Hendrickson, M. R., Kempson, R.L. (1997) Normal histology of the uterus and fallopian tubes. In: *Histology for Pathologists*, second edition, Sternberg, S.S. (ed.), Lippincott-Raven, Philadelphia, USA

Horwitz, K.B.; Alexander, P.S. (1983) In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology* 113: 2195-2201

- Hovland, A.R.**, Powel, R.L., Takimoto, G.S., Tung, L., Horwitz, K.B. (1998) An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform, but not the B-isoform, of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 273: 5455-5460
- Johnson, G.R.**, Saeki T., Gordon A.W., Shoyab M., Salomon D.S., Stromberg, K. (1992) Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol* 1992 Aug; 118(3): 741-51
- Kao, L.C.**, Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J.P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R.N., Lessey, B.A., and Giudice, L.C. (2002) Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation. *Endocrinology* 143(6): 2119-2138
- Kastner, P.**, Krust A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora L. et al. (1990) Two distinct Estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.*, 5: 1603-1614
- Keck, C.**, Neulen, J., Breckwoldt, M. (2002), *Praxis der Frauenheilkunde, Band I: Endokrinologie - Reproduktionsmedizin - Andrologie*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, S. 116-125
- Kumar, N.S.**, Richer J., Owen G., Litman, E., Horwitz K.B., Leslie K.K. (1998a) Selective down-regulation of progesterone isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed Estrogen action. *Cancer Res.* May 1; 58(9): 1860-5
- Kumar, S.**, Brudney, A., Cheon, Y.P., Fazleabas, A.T., Bagchi, I.C. (2003) Progesterone induces calcitonin expression in the baboon endometrium within the window of uterine receptivity. *Biol Reprod.* 2003 Apr; 68(4): 1318-23
- Kumar, S.**, Zhu, L.J., Polihronis, M., Cameron, S.T., Baird, D.T., Schatz, F., Dua, A., Ying, Y.K., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C. (1998b) Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Dec; 83(12): 4443-50
- Lessey, B.A.**, Alexander, P.S., and Horwitz, K.B. (1983) The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 112: 1267-1274
- Lessey, B.A.**, Killam A.P., Metzger, D.A., Haney, A.F., Greene, G.L., McCarthy Jr K.S. (1988) Immunohistochemical analysis of human uterine Estrogen, and progesterone receptors in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 67: 334-340
- Li, Q.**, Wang, J., Armant, D.R., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C. (2002) Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J Biol Chem* 277: 46447-46455
- Lydon, J.P.**, DeMayo, F.J., Conneely, O.M., O'Malley, B.W. (1996) Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996 Jan; 56(1-6 Spec NO): 67-77

Lysiak, J.J., Johnson G.R., Lala, P.K. (1995) Localization of amphiregulin in the human placenta and decidua throughout gestation: role in trophoblast growth. *Placenta* 1995 Jun; 16(4): 359-66

Mangal, R.K., Wiehle, R.D., Poindexter, A.N. 3rd, Weigel, N.L. (1997) Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997 Nov-Dec; 63(4-6): 195-202

Misao, R., Iwagaki, S., Fujimoto, J., Sun, W., Tamaya, T. (1999) Dominant expression of progesterone receptor form B mRNA in ovarian endometriosis. *Horm. Res.* 52: 30-34

Mograbi, B., Rochet, N., Imbert, V., Bourget, I., Bocciardi, R., Emiliozzi, C., Rossi, B. (1997) Human monocytes express amphiregulin and heregulin growth factors upon activation. *Eur. Cytokine Netw.*, Vol. 8 n°1, March 1997, 73-81

Mote, P.A., Balleine, R.L., McGowan, E.M., Clarke, C.L. (1999) Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent immunohistochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Aug; 84(8): 2963-71

Mote, P.A., Bartow, S., Tran, N., Clarke, C.L. (2002) Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Mar; 72(2):163-72

Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Conneely, O.M. (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(17):9744-9

Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., De Mayo, F.J., Lydon, J.P., Conneely, O.M. (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289: 1751-1754

Niikura, H., Sasano H., Kaga, K., Sato, S., Yajima, A. (1996) Expression of epidermal growth factor family and epidermal growth factor receptor in human endometrium. *Hum Pathol.* 1996 Mar; 27(3): 282-9

Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.*, 1: 3-25

Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., Horwitz, K.B. (2002) Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 7, Feb 15 : 5209-5218

Rowan, B.G. and O'Malley, B.W. (2000) Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65; 545-549

Sartorius, C.A., Melville, M.Y., Hovland, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S., Horwitz, K.B. (1994) A third transactivation function (AF 3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol.* 8, 1347-1360

Sasaki, M., Dharia, A., Oh B.R., Tanaka, Y., Fujimoto, S., Dahiya, R. (2001) Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res.* 2001 Jan. 1; 61 (1): 97-102

Shiozawa, T., Li, Shuan-fung, Nakajama, Kuniaki, Nikaido, Toshio, Shingo (1996) Relationship the expression of cyclins/cyclin-dependent kinases and sex-steroid receptors/Ki-67 in normal human endometrium glands and stroma during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.*, 2: 745-752

Shiozawa, T., Shih, H.C., Miyamoto, T., Feng, Y.Z., Uchikawa J., Itoh, K., Konishi, I. (2003) Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb; 88(2): 871-8

Smid-Koopman, E., Blok, L.C., Burger, C.W., Helmerhorst, T.J., Brinkmann, A.O., Huikeshoven, F.J. (2003) Distinct functional differences of human progesterone receptors A and B on gene expression and growth regulation in two endometrial carcinoma cell lines. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2003, Jan; 10(1): 49-57

Snijders, M.P.M.L., de Goeij, A.F.P.M., Debets-Te Baerts, M.J.C., Rousch, M.J.M, Koudstaal, J., Bosman, F.T. (1992) Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J. Reprod. Fert.*, 94: 363-371

Stewart, C.L., Kaspar P., Brunet, L.J. et al. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359:76-79

Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 451-486

Tsai, S.Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N.L., Dahlman, K., Gustafsson, J.A., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1988) Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 55, 361-369

Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., and McDonnell, D.P. (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7: 1244-1255

Wang, H., Critchley, H.O., Kelly, R.W., Shen, D., Baird, D.T. (1998) Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 1998 Apr; 4(4): 407-12

Weiss, N.S., Szekelz, D.R., English, D.R., and Schweid, A.I. (1979) Endometrial cancer in relation to patterns of menopausal Estrogen use. *J. AM. Med. Assoc.*, 242: 261-264

Wieser, F., Schneeberger, C., Hudelist, G., Singer, C., Kurz, C., Nagele, F., Gruber, C. Huber, J.C. and Tschugguel (2002) Endometrial nuclear receptor co-factors SRC-1 and N-CoR are increased in human endometrium during menstruation. *Mol Hum Reprod Vol* 8, No.7: 644-650

Yue, Z.P., Yang, Z.M., Li, S.J., Wang, H.B., Harper, M.J. (2000) Epidermal growth factor family in rhesus monkey uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2000 Feb; 55(2): 164-74

Zhu, L.J., Cullinan-Bove, K., Polihronis, M., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C. (1998) Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology* 1998 Sep; 139(9): 3923-34

9. Danksagung

Für die Betreuung dieser Doktorarbeit und die Unterstützung in allen Phasen ihrer Entstehung gilt mein besonderer Dank **Frau PD Dr. Irmgard Classen-Linke**. Sie hat es verstanden, ihre Begeisterung für die Reproduktionsbiologie auf mich zu übertragen. Von ihr stammt die Idee zu diesen Studien. Durch ihre ruhige und sorgfältige Art habe ich in vielen fachlichen Diskussionen die wissenschaftliche Arbeitsweise in der Forschung kennengelernt.

Herrn Prof. Beier danke ich für die Möglichkeit, die guten Bedingungen in seinem Labor zu nutzen und in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten sowie für die Unterstützung, die ich von ihm erfahren habe.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich **Herrn Prof. Neulen**, Direktor der Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, der durch seine interessanten Lehrveranstaltungen und die Möglichkeit zur Famulatur in seiner Klinik dazu beigetragen hat, mein Interesse für die klinische Gynäkologie und Reproduktionsmedizin zu wecken. Die Hormonbestimmungen der Endometriumproben wurden in seinem Hormonlabor durchgeführt.

Den Wissenschaftlern des Instituts für Reproduktionsbiologie, **Frau Dr. med. Beier-Hellwig**, **Herrn PD Dr. Andreas Herrler**, **Frau PD Dr. Claudia Krusche**, **Frau PD Dr. Ulrike von Rango** und **Sahera Seeman** danke ich für ihre Unterstützung, für allerlei gute Tips und Tricks bei der Laborarbeit und manches aufmunternde Gespräch, auch über Fachliches hinaus.

Ohne die optimale Betreuung durch die technischen Angestellten wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Ich danke **Tina Breuer**, **Bärbel Bonn**, **Sabine Eisner**, **Rick Kamps**, **Christoph Schlösser** und **Kerstin Ziob** für ihre Hilfe und Geduld beim Erklären und Anleiten von Labortechniken. Mein besonderer Dank gilt **Diana Seelis-Schmidt** und **Sabina Hennes-Mades**, die mich mit den Techniken der Immunhistochemie bzw. des Western Blots vertraut machten und mir auch andere Hand-Arbeiten nähergebracht haben.

Herrn Prof. Schmalzing danke ich für die Möglichkeit, für die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen das Mikroskop im Institut für Pharmakologie zu nutzen. Seinem Doktorand **Stephan Schmitz** danke ich für die geduldige Erklärung und seine Hilfsbereitschaft.

Die **OP-Teams der Frauenkliniken in Aachen** (St. Antonius-Hospital, Eschweiler, Leitung: Prof. Dr. C. Karl; Universitätsklinikum Aachen, Leitung: Prof. Dr. W. Rath; Marienhospital, Leitung: Prof. Dr. M. Kusche; Luisenhospital, Leitung: Dr. D. Crommelinck) tragen wesentlich dazu bei, dass die notwendigen Endometriumproben zur Verfügung stehen – vielen Dank.

Frau Peters von der Bibliothek des anatomischen Instituts danke ich für die zügige und zuverlässige Beschaffung wissenschaftlicher Publikationen.

Die **Firma Schering**, Berlin, hat dieses Projekt finanziell unterstützt.

Lebenslauf

Vor- und Zuname:	Stephanie Rebhan
Geburtsdatum:	12.10.1977
Geburtsort:	Hannover
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
<i>08/84 – 07/90</i>	Grundschule in Hannover und Bad Gandersheim und Orientierungsstufe Bad Gandersheim
<i>08/90 – 06/97</i>	Roswitha-Gymnasium, Bad Gandersheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
<i>07/94 – 07/95</i>	Mukwonago High School, Waukesha, Wisconsin, USA Stipendium des Parlamentarischen Patenschaftsprogramms des Deutschen Bundestages
<i>09/1997 – 08/1998</i>	Europäischer Freiwilligendienst der EU (EVS): Freiwilliges Soziales Jahr in Biella, Italien
<i>10/1998 – 05/2005</i>	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
<i>01/1999 – 12/2004</i>	Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
<i>08/2000</i>	Ärztliche Vorprüfung
<i>08/2001</i>	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
<i>09/2002 – 02/2002</i>	Auslandssemester an der Université Claude Bernard Lyon, Frankreich, Erasmus-Programm der Medizinischen Fakultät
<i>02/2002 – 03/2002</i>	Praktikum im Büro des Europaabgeordneten Dr. med. Peter Liese, Brüssel, Belgien
<i>Seit 04/2002</i>	Doktorarbeit im Institut für Anatomie und Reproduktionsbiologie, Prof. Dr. Dr. H. M. Beier, Aachen
<i>07/2003 – 09/2003</i>	Praktikum bei der Weltgesundheitsorganisation (WHO), Department of Reproductive Health and Research (RHR), Genf, Schweiz
<i>03/2004</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>04/2004 – 03/2005</i>	Praktisches Jahr, La Pitié-Salpêtrière, Paris, Frankreich und St-Antonius-Hospital, Eschweiler
<i>05/2005</i>	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>06/2005</i>	Approbation als Ärztin