

Die Wirkung von selektiven Östrogenrezeptor α und β Agonisten auf Ovar und Uterus am Nagetier

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

vorgelegt von
Philip Siebel
aus
Berlin

Berichter: Frau Professorin
Dr.med. Christa Hegele-Hartung

Herr Universitätsprofessor
Dr.rer.nat. Dr.med. Henning Beier

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar

Philip Siebel

**Die Wirkung von selektiven Östrogenrezeptor
 α und β Agonisten auf Ovar und Uterus
am Nagetier**

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar**

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Östrogenrezeptoren	1
2	Entwicklung ovarieller Follikel	4
3	Regulatoren ovarieller Prozesse	6
4	Hormonelle Regulationen im Uterus	10
5	Ziel der Arbeit	12
B	Material und Methoden	13
1	Tierversuche	13
1.1	Tiere und Behandlung	13
1.2	Testsubstanzen	13
1.3	Versuchsansätze	15
1.3.1	Untersuchung der frühen Follikulogenese bei hypophysektomierten Ratten	15
1.3.2	Untersuchung der frühen Follikulogenese bei GnRH Antagonist behandelten Mäusen	15
1.3.3	Uteruswachstumstest an der ovariectomierten Ratte	16
2	Probenaufarbeitung	17
2.1	Histologie	17
2.2	Immunhistochemie	18
2.2.1	Prinzip der LSAB- Methode	18
2.2.2	Halbautomatisiertes Färben mit dem TechMate™ 500	19
2.2.3	Im TechMate™ 500 eingesetzte Primärantikörper	20
2.2.4	Manuell durchgeführte immunhistochemische Färbemethoden zum Nachweis des ERβ	22
2.2.5	Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL Färbung	23
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1	RNA Isolierung	25
2.3.2	Erststrangsynthese mit Oligo dT	26
2.3.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	26
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.3.5	cDNA Gel Extraktion	27
2.3.6	DNA Klonierung der PCR-Produkte	27
2.3.7	Maxi Präparation	28
2.3.8	Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte	28
2.3.9	Linearisierung der Plasmide	28
2.3.10	In Vitro Transkription	30
2.3.11	Formaldehyd-Gel für denaturierende RNA-Trennung	30
2.3.12	Konzentrationsbestimmung der Probe	31
2.3.13	In situ Hybridisierung	31
3	Histologische und immunhistochemische Auswertung	32
3.1	Quantitative Auswertung	32
3.1.1	Epithelhöhen	32
3.1.2	Proliferation	33
3.1.3	Follikelstaging	33
3.2	Semiquantitative Auswertung	34
3.3	Fotografische Dokumentation	34
3.4	Statistische Auswertung	34
3.5	Spezifität der Färbungen	35
3.5.1	Spezifität immunhistochemischer Färbungen	35
3.5.2	Spezifität der TUNEL Färbung	38
3.5.3	Spezifität der in-situ Hybridisierung	39
C	Ergebnisse	40
1	Einfluss von ERα und ERβ Agonisten auf das Ovar von Ratte und Maus	40
1.1	Einfluss auf das Ovargewicht	40
1.2	Histologische Befunde	42

1.3	Einfluss auf Proliferation und Apoptose	45
1.3.1	Untersuchung der Proliferation mit der PCNA Färbung	45
1.3.2	Untersuchung der Apoptose mit der TUNEL Färbung	47
1.4	Einfluss auf Östrogenrezeptoren (ER)	49
1.4.1	Einfluss auf die Expression des Östrogenrezeptor α (ER α)	49
1.4.2	Einfluss auf die Expression des Östrogenrezeptor β (ER β)	51
1.5	Einfluss auf Granulosazellmarker	54
1.5.1	Einfluss auf die Expression von Inhibin α Untereinheit	54
1.5.2	Einfluss auf die Expression von Anti-Müllerian Hormon (AMH)	56
1.6	In situ Hybridisierung	58
1.6.1	Expression von zytoplasmatischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II)	58
1.6.2	Expression von Prostazyklin Synthase (PGIS)	60
2	Einfluss von ERα und ERβ Agonisten auf den Uterus von ovariectomierten Ratten	61
2.1	Einfluss auf das Uterusgewicht	61
2.2	Histologische Befunde	62
2.2.1	Einfluss auf die Histologie	62
2.2.2	Einfluss auf die endometriale Epithelhöhe	63
2.3	Einfluss auf die Proliferation	64
2.4	Einfluss auf Steroidrezeptoren	66
2.4.1	Einfluss auf die Expression des Östrogenrezeptor α (ER α)	66
2.4.2	Einfluss auf die Expression des Progesteronrezeptors (PR)	69
D	Diskussion	73
1	Diskussion der verwendeten Methoden	73
1.1	Hypophysektomie	73
1.2	Ovariectomie	74
1.3	Klassifikation des Follikelwachstums	75
1.4	Semiquantitative Auswertungen	76
2	Diskussion der Ergebnisse - Ovar	77
2.1	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf Morphologie, Follikelentwicklung, Proliferation, und Apoptose	77
2.2	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von ER α und ER β	79
2.3	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von Inhibin α Untereinheit	83
2.4	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von Anti-Müllerian Hormon (AMH)	85
2.5	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von zytosolischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II)	88
2.6	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von Prostazyklin Synthase (PGIS)	89
3	Diskussion der Ergebnisse - Uterus	91
3.1	Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf Morphologie und Proliferation des Uterus	91
3.2	Einfluss der ER α und ER β Agonisten auf die Regulation von ER α und PR im Uterus	93
4	Abschließende Überlegungen	98
E	Zusammenfassung	99
F	Literaturverzeichnis	102

A Einleitung

Östrogene sind Bestandteil einer Vielzahl von Prozessen, die den Metabolismus, die Reproduktion und das Verhalten eines Organismus beeinflussen. Sie werden hauptsächlich in Ovar und Testes durch Aromatisieren von Androgenen am A-Ring und Abspalten eines Methylrestes gebildet. Dieser Vorgang wird durch Follikel stimulierendes Hormon (FSH) angeregt, während luteinisierendes Hormon (LH) der Hauptstimulus der Androgenproduktion ist. Zielorgan östrogenen Wirkungen ist neben dem Reproduktionstrakt auch das Skelett, kardiovaskuläres System, Immunsystem und ZNS. Die Brustdrüse, Thymus, Hypophyse, Haut und Leber werden ebenfalls von Östrogenen in ihrer Beschaffenheit oder Sekretionsfunktion beeinflusst. Östrogene sind essentiell für die weibliche Fertilität, die embryonale und fetale Entwicklung, die Erhaltung der Schwangerschaft, die Reifung und Funktion der weiblichen Reproduktionsorgane und für die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale. Darüberhinaus beeinflussen sie die Stimmungslage im Menschen und das Fortpflanzungsverhalten von Labortieren. Zum Einsatz kommen Östrogene derzeit bei der Behandlung von postmenopausalen Symptomen sowie als Kontrazeptiva der Frau. Neben einer hemmenden Wirkung auf die Knochenzellen, wodurch eine Verringerung des Knochenumsatzes erreicht wird, verbessert sich die Kalziumabsorption und verringert sich die Kalziumausscheidung.

Die weitreichenden Wirkungen der Östrogene bürgen großes Potential vieler medizinischer Indikationen in sich. Das setzt allerdings eine selektive Beeinflussung von Zielorganen voraus, um das Risiko unerwünschter Wirkungen minimieren zu können.

1 Östrogenrezeptoren

Östrogene Effekte werden hauptsächlich über zwei Rezeptoren, den Östrogenrezeptor α (ER α) und β (ER β) vermittelt, von denen der ER β erst 1996 entdeckt wurde [1]. Sie sind klassifiziert als Klasse 1 Mitglieder der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und als Liganden abhängige Transkriptionsfaktoren definiert [2]. Sobald ein östrogenen Ligand an einen Östrogenrezeptor gebunden hat, vollzieht dieser einen Strukturwandel und es bilden sich Dimere. Diese binden mit hoher Affinität an die spezifische DNA Sequenz, bestehend aus einem 15bp invertierten Palindrom, in den Regulationsregionen der Zielgene, um die Transkription von diesen zu modulieren [3, 4]. Die DNA bindende Domäne (C-Domäne) der ER α und ER β Proteine weisen eine 97%ige Übereinstimmung auf, während die Liganden-

Bindungs-Domäne (E-Domäne) eine 58%ige Gleichartigkeit aufweist [5]. 17 β -Östradiol bindet an beide Rezeptoren mit nahezu gleicher Affinität [6]. Die Östrogenrezeptoren befinden sich auf unterschiedlichen Genen, weshalb es sich nicht um „Splicing“ Varianten, sondern um voneinander unabhängige Rezeptoren handelt. Neben dem Liganden abhängigen, klassischen Signaltransduktionsweg, über den fast alle bisher beschriebenen Effekte des 17 β -Östradiols vermittelt werden, wurde allerdings auch schon von schnellen, direkten Wirkungen des 17 β -Östradiols berichtet. So kann es zu einer Genaktivierung ohne direkte Bindung des Liganden gebundenen Steroid Rezeptors an die DNA kommen. Grund hierfür ist eine Interaktion des Liganden mit DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. dem AP-1 Komplex [7, 8]. Weiterhin wurde eine Liganden unabhängige Aktivierung der Östrogenrezeptoren über Veränderungen von zellulären Kinasen und Phosphatasen *in vitro* und *in vivo* beschrieben [9].

Der Östrogenrezeptor α (ER α) wird überwiegend in Uterus, Cervix und Vagina, Ovar, Mamma, Hypophyse, Testes, Leber, Milz, Herz und Skelettmuskulatur exprimiert [1, 10]. Im Ovar wird der Rezeptor vor allem in Thekazellen und im Stroma nachgewiesen [11]. In Granulosazellen ist der ER α nur in geringen Konzentrationen nachweisbar. 17 β -Östradiol führt hier zu einer Herunterregulierung des ER α Transkripts [12]. Die Expression des Rezeptors im Ovar ist während des Zyklus stabil und unterliegt keiner Beeinflussung durch LH oder hCG [13]. Im Uterus wird der ER α in endometrialen Epithelzellen, endometrialem Stroma und Myometrium exprimiert. Er beeinflusst verschiedene sekretorische Produkte über autokrine oder parakrine Mechanismen, wofür die Expression des ER α in allen Gewebekompartimenten nötig ist. So hängt die PR Expression im Endometriumepithel und die Proliferation des Endometriumepithels vom ER α im Stroma ab [14], während andere Produkte, wie z.B. Laktoferrin oder Komplementfaktor C3, für eine normale Expression, den Rezeptor im Endometriumepithel und im Stroma benötigen [15].

Der Östrogenrezeptor β wird in ZNS, Ovar, Prostata, Urogenitaltrakt, kardiovaskulärem System, Lunge, Hoden und Nebenhoden exprimiert [1, 10]. Im Rattenovar kommt der ER β in den Granulosazellen von allen wachsenden und nicht atretischen Follikeln vor, sowie in geringer Konzentration in Thekazellen [16-18]. Die ER β mRNA Konzentration bleibt während des Zyklus auf konstant hohem Niveau, fällt aber rapide ab, sobald die LH induzierte Luteinisierung beginnt [19]. Im Uterus ist ER β mRNA weder in adulten Wildtyp Ratten, noch in α ERKO Mäusen nachweisbar [20]. Allerdings ist die Datenlage uneinheitlich und es gibt Untersuchungen, die ER β im Uterus nachweisen können [21-24]. Die Entdeckung des ER β

führte dazu, dass bisherige Kenntnisse über die Wirkung von Östrogenen über den klassischen Östrogenrezeptor (ER α) teilweise in Frage gestellt und ein großer Klärungsbedarf über die Verteilung und Funktion der Rezeptoren entfacht wurde. Das Tiermodell der knockout Mäuse ermöglichte es, einen der Östrogenrezeptoren genetisch auszuschalten und die physiologische Rolle des jeweils anderen für den Organismus getrennt zu explorieren. Damit war das Problem der selektiven Liganden, die bis dato nicht zu Verfügung standen, umgangen.

Die weibliche α ERKO Maus, besitzt nur den ER β und ist infertil. Das Ovar hat eine normale Anzahl Primordialfollikel, was auf eine ungestörte fetale Entwicklung schließen lässt. Bei ansonsten normaler Follikelreifung werden weit entwickelte Follikel zystisch hämorrhagisch und enden in Atresie oder anovulatorisch. Es gibt keine Corpora Lutea und die Oozyten sind bei Superovulation in großen Follikeln „gefangen“. Eine spontane Ovulation findet nicht statt, was mit veränderter Gonadotropin Synthese zu tun haben könnte. Östrogene Effekte, wie z.B. die Reduzierung von Apoptose oder die Amplifikation von LH Rezeptoren in Granulosazellen antraler Follikel bleibt bestehen, da diese offensichtlich über den ER β vermittelt werden [12]. Der hypoplastische Uterus dieser α ERKO Tiere, hat nur ca. ein halb so großes Gewicht wie die Uteri von Wildtyp Tieren und weist weniger Drüsen auf [25]. Luminale und glanduläre Endometriumepithelzellen haben eine kubische Form, ohne die typische, Östrogen geprägte Morphologie des Epithels mit hohem Zylinderepithel und basal lokalisiertem Nukleus. α ERKO Mäuse haben stark erhöhte Östradiolkonzentrationen im Serum und reagieren auf eine kurzfristige Behandlung mit 17 β -Östradiol nicht mit den zu erwartenden östradiolen Effekten, wie Wassereinlagerung und Hyperämie. Auch eine Östradiolsubstitution über 3-4 Tage führt in diesen Tieren nicht zu einer Steigerung des Uterusgewichts. Hierdurch wird die irrelevante Funktion des ER β und die dominierende Rolle des ER α im Uterus deutlich [10, 25]. Auf die stark erhöhten 17 β -Östradiol Spiegel könnten auch andere extragenitale Atypien der Tiere zurückzuführen sein [26], denn das Sexualverhalten dieser Tiere [27], sowie die Brustentwicklung [28] sind anormal. Bei Fehlen des ER α können entscheidende Effekte ausbleiben. Unverändert geblieben sind die protektiven Effekte des Östrogens auf das kardiovaskuläre System [29] sowie in geringerer Ausprägung die bekannten Effekte auf das Knochengewebe [30].

β ERKO Mäuse besitzen nur den ER α . Sie sind subfertil, was auf eine Blockade der letzten Schritte der Eizellreifung vor der Ovulation zurückzuführen ist. Die Wurfgröße ist klein und zusätzlich sind die Nachkommen kleiner als normal. Das Ovar fällt durch viele atretische Follikel auf und keine bis wenige Corpora Lutea [12, 31]. Der Uterus der Weibchen ist fähig

zyklische Veränderungen zu vollziehen und weist außer einem hyperproliferierten Endometriumepithel keine Pathologien auf [31]. Hierdurch wird dem fehlenden ER β eine protektive Rolle gegen Hyperproliferation und Karzinogenese nachgesagt [32]. Aufgrund der vergleichsmäßig hohen Konzentration des ER β im Ovar, niedrigen Konzentrationen des Rezeptors im Uterus, sowie den geringen Abnormitäten im Uterus von β ERKO Mäusen, liegt der Verdacht nahe, dass der ER β im Ovar und der ER α im Uterus dominiert.

Die Frage, welche Auswirkungen das Fehlen von beiden Östrogenrezeptoren auf den Organismus hat, wurde in Mäusen untersucht, bei denen sowohl der ER α wie auch der ER β ausgeschaltet wurde ($\alpha\beta$ ERKO Mäuse). Sie entwickeln einen normalen Reproduktionstrakt, sind aber infertil. In den Ovarien sind Strukturen erkennbar, die histologisch den Tubuli Seminiferi der Testes ähneln sowie Sertoli ähnliche Zellen, die Anti-Müllerian Hormon (AMH) exprimieren. In einigen Follikeln sind degenerierte Oozyten erkennbar und die Serumkonzentration des LH ist stark erhöht. Beide Rezeptoren scheinen an einer normalen Ausbildung des Reproduktionstraktes und der Regulation der LH Sekretion beteiligt zu sein [33].

Mäusen, in denen das Cyp 19 Gen ausgeschaltet wurde, können das Enzym Aromatase nicht bilden, wodurch eine 17 β -Östradiolsynthese unmöglich wird. Die Aromatase knockout Mäuse (ArKO) werden phänotypisch normal geboren, entwickeln dann aber einen männlichen Habitus und unterentwickelte Uteri. Als Konsequenz einer unterbrochenen Follikulogenese und dem Unvermögen zur Ovulation, sind sie infertil [12, 34, 35].

2 Entwicklung ovarieller Follikel

Die Bedeutung von Östrogenen für den weiblichen Reproduktionstrakt und speziell das Ovar und die Follikulogenese wurde vielseitig am Modell der hypophysektomierten Ratte untersucht. Hier führt die Hypophysektomie, ohne entsprechende Substitution von Hormonen, zu einem verminderten Ovargewicht [36] und einer verminderten Initiation von Follikelwachstum. Durch die Substitution von 17 β -Östradiol (E₂) kommt es zu direkten Effekten wie Gewichtszunahme des Ovars und Interaktionen mit der Follikulogenese [37-39]. Die DNA Synthese und Zellproliferation werden durch 17 β -Östradiol induziert [38, 40] und der programmierte Zelltod (Apoptose) und Follikelatresie verhindert [41, 42].

Die Zunahme des Organgewichts lässt sich zu einem großen Teil auf die gesteigerte Follikelreifung zurückführen, welche durch eine histologische Begutachtung des Ovars und

die Einteilung der Follikel in Reifegrade weiter quantifiziert werden kann. Alle Follikel entstehen aus Primordialfollikeln, von denen nur einige das präovulatorische Stadium erreichen. So lange es keinen Wachstumsimpuls z.B. durch 17β -Östradiol gibt, verharren die Follikel in einer Ruheposition. Der Prozess, in dem Primordialfollikelwachstum initiiert wird, heißt „initial Recruitment“ [43]. Erste Zeichen dieses frühen Follikelwachstums sind die Proliferation der Granulosazellen [44]. Haben sich ca. zwei bis drei Schichten Granulosazellen um die Eizelle gebildet, entsteht ein äußerer Ring Thekazellen, der das Follikel umschließt [45]. Mit fortschreitender Entwicklung vermehren sich, getrennt durch die Basalmembran, Theka- und Granulosazellen, wodurch das Follikel immer größer wird. Es kommt zur Flüssigkeitsansammlung zwischen den Granulosazellen, bis sich ein Antrum formt. Ab diesem Moment wird das Follikel „antrales Follikel“ genannt. Charakteristisch für das präovulatorische Stadium ist die von Granulosazellen umschlossene Oozyte, welche stielartig in das große Antrum hineinragt.

Im Zuge der heranwachsenden Follikel steigen das Volumen und die Proliferationsgeschwindigkeit stetig an. Zur Bestimmung der Proliferation können Antikörper gegen Zellzyklus assoziierte Antigene wie Ki-67 oder PCNA (proliferating cell nuclear antigen) eingesetzt werden. Mit beiden Antikörpern werden aktive Verlaufsformen des Zellzyklus erfasst. Ki-67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus außer der G0 und der frühen G1- Phase exprimiert. PCNA ist ein Hilfsprotein der DNA Polymerase delta, das überwiegend in der späten G1 und S- Phase akkumuliert. Das zeitabhängige Auftreten von Ki-67 und PCNA im Zellzyklus macht sie zu geeigneten Markern für die Zellproliferation [23, 46-50] [51-54].

Östrogene führen aber im Ovar nicht nur zu einem gesteigerten Organgewicht durch die Initiierung von Follikelwachstum und erhöhten Proliferationsraten, sondern auch durch eine verringerte Apoptose und Follikelatresie. Mikroskopisch fallen atretische Follikel zum einen durch pyknotische Zellkerne und/ oder Degeneration des Nukleus der Oozyte [55, 56] auf, zum anderen aber auch durch apoptotische Abschnürungen („apoptotic bodies“) und einen sich auflösenden Zellverband der Granulosazellen [41]. Apoptotische Abschnürungen sind von der Zelle losgelöste, membranumschlossene Vesikel, die kondensiertes Chromatin und Zellorganellen enthalten und mikroskopisch gut zu erkennen sind. Sie werden von einwandernden Leukozyten und Makrophagen phagozytiert, bevor die Membran ihre Integrität verliert, Zellkomponenten austreten und eine entzündliche Reaktion hervorrufen können [57, 58]. Bei antralen Follikeln fallen diese atretischen Veränderungen zuerst bei Granulosa Zellen auf, die nahe dem Antrum liegen. Vor fast 20 Jahren wurde bereits

vermutet, dass Atresie die Apoptose einschlieÙe [42, 58]. Im Laufe der Zeit scheint diese Vermutung bestätigt und die Apoptose der biochemische Mechanismus der Follikelatresie zu sein [42, 58-60]. Während die Zeichen der Atresie morphologisch beurteilt werden, kann man Apoptose u.a. immunhistochemisch nachweisen. Dies ist möglich, da Nukleasen DNA-Strangbrüche verursachen, welche eine Identifizierung apoptotischer Zellen durch die TUNEL Färbung ermöglichen. Follikelatresie und Faktoren, die eine Rolle im Prozess der Apoptose spielen, wurden ausführlich untersucht und die Daten in verschiedenen Artikeln zusammengefasst [43, 57, 58, 61].

3 Regulatoren ovarieller Prozesse

Die Liste der potentiellen endokrinen Faktoren, die einen Einfluss auf das Ovar und die Follikelreifung haben, sowie die Steroidsynthese beeinflussen, bzw. von ihr beeinflusst werden, ist lang und beinhaltet verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine, Peptidhormone, Steroide und Enzyme. Im Regulationsprozess innerhalb des Ovars sind zur Steuerung des Wachstums einzelner Follikel z.B. Inhibin und das Anti-Müllerian Hormon von Bedeutung. Darüberhinaus werden dem Vitamin A, wie auch den Prostaglandinen eine potentielle Rolle im Ovar zugeschrieben.

Inhibin ist ein wichtiger Modulator der Reproduktionsfunktion in verschiedenen Bereichen. Erstens durch seinen Einfluss auf die hypophysäre FSH Biosynthese und zweitens durch seine para- und autokrine Wirkung in den Gonaden [62]. Inhibin ist ein multifunktionales Hormon der TGF- β Superfamilie und setzt sich zusammen aus zwei Untereinheiten, der Inhibin α Untereinheit und einer von zwei Inhibin β Untereinheiten (β_A und β_B) [63, 64]. Je nachdem welche der beiden β Untereinheiten in das heterodimere Hormon eingebaut wird, entsteht Inhibin A oder B. Eine Verbindung beider β Untereinheiten bildet das Hormon Activin [62], welches Mitglied der gleichen Proteingruppe ist und funktional dem Inhibin entgegengesetzt wirken kann. Inhibin und seine Untereinheiten werden hauptsächlich im Ovar in den Granulosazellen exprimiert und von diesen sezerniert. Nach einer Ovariectomie fällt daher die Serumkonzentration dieses Hormons innerhalb kürzester Zeit ab [65]. Die Inhibin α Untereinheit kann hauptsächlich in wachsenden Follikeln nachgewiesen werden [66, 67], weshalb sie als Marker für Follikelwachstum gilt. Auch in Sertoli Zellen der Testes [68], Zellen der Nebennierenrinde und der Hypophyse [69] wird das Protein ebenfalls exprimiert.

Durch *in vitro* und *in vivo* Versuche wurde nachgewiesen, dass die Sekretion von Inhibin A und B, bzw. von Inhibin α Untereinheit durch FSH, Östrogene und Wachstumsfaktoren bestimmt wird [70-72]. Sowohl FSH als auch 17β -Östradiol führen zu einer gesteigerten Inhibin A und zu einer leicht erhöhten Inhibin B Produktion in Ratten Granulosazellen [70, 71, 73]. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wirkt Inhibin regulierend auf die hypophysäre FSH Sekretion [72, 74-79], wobei die α Untereinheit selbst keine supprimierende Wirkung auf die FSH Sekretion hat [73]. Angemessene Inhibin Konzentrationen sind nötig für einen funktionierenden Zyklus und normale Follikelreifung [62]. Das in den Granulosazellen gebildete und sezernierte Inhibin A wirkt parakrin auf Thekazellen und sensibilisiert diese für LH, was zu einer gesteigerten Androgenproduktion führt [79, 80]. Die Inhibin α Untereinheit ist selbst auch als aktives Protein durch autokrine und parakrine Mechanismen an der korrekten Follikelreifung im Ovar und der Ovulation beteiligt [80]. Dies kommt dadurch zustande, dass bei der Synthese von Inhibin Untereinheiten immer mehr α als β Monomere produziert werden und so freie α Untereinheiten bestimmte Effekte bewirken können [81]. Bei Versuchen mit transgenen Mäusen wurden die Effekte eines Mangels bzw. einer Überproduktion näher untersucht. Mangel an Inhibin α Untereinheit führt zu Infertilität und der Ausbildung von ovariellen Stromatumoren [82]. Die Tiere sterben nach 3-4 Monaten, weshalb eine reproduktionsbiologische Beurteilung der Tiere nicht möglich ist [62]. Die Überproduktion von Inhibin α Untereinheit macht sich in einer reduzierten Fruchtbarkeit bemerkbar. Diese ist zurückzuführen auf eine verminderte Ovulationsrate pro Zyklus, verminderte FSH und Östradiol Serumkonzentrationen bei erhöhten LH Werten, sowie weniger antrale Follikel und Corpora Lutea [62, 80]. Abweichungen nach beiden Seiten führen demnach zu Pathologien des Reproduktionstraktes sowie zu reproduktionsbiologischen Funktionsstörungen bis hin zur Infertilität und machen deutlich, dass ein ausgewogener Inhibin/ Activin Quotient von gewichtiger Bedeutung ist [62, 80].

Das Anti-Müllerian Hormon (AMH) oder auch „Müllerian Inhibiting Substance (MIS)“ führt während der fetalen Entwicklung zur Rückbildung des Müllerschen Ganges, welcher die Anlagen für den weiblichen Reproduktionstrakt darstellt [83]. Daher wird bei weiblichen Tieren das Hormon in dieser Zeit nicht gebildet. AMH ist ein dimeres Glykoprotein mit einem Gewicht von 140 kDa, das zur TGF β Superfamilie gerechnet wird [84, 85]. Es unterscheidet sich von anderen Mitgliedern dieser Familie, weil die C-terminale Domäne des Peptids die Aktivität der N-terminalen Domäne verstärkt [86]. Postnatal kann AMH in Granulosazellen des Ovars ab dem 3.-4. Lebenstag (LT) nachgewiesen werden [87-89]. Die AMH Expression

beginnt in kleinen Follikeln mit einer Schicht Granulosazellen, steigt mit fortschreitender Entwicklung bis zum Stadium der präantralen und kleinen antralen Follikel an, bevor die Expression bei der weiteren Entwicklung wieder absinkt [88]. Dementsprechend sind Primordialfollikel und große antrale Follikel AMH negativ. Auch Corpora lutea exprimieren wenig oder kein AMH [87, 88, 90-92]. Präovulatorisch und bei Eintritt in die Atresie von Follikeln jeden Entwicklungsstadiums kommt es zu einem starken Abfall der AMH Expression [87, 88, 91, 92]. Eine Mitbeteiligung von Östrogenen bei der AMH Regulation wird vermutet, da eine dem „Estrogen Response Element“ (ERE) fast identische Sequenz im AMH Promoter Gen identifiziert wurde [93]. AMH nimmt im Ovar Einfluss auf die Regulation der Follikelselektion und -reifung [88], was durch die inhibitorischen Effekte des AMH auf die Proliferation von Granulosazellen unterstützt wird [94, 95]. Die Anwesenheit des Hormons führt dazu, dass Primordialfollikel nicht oder langsamer in den Pool der wachsenden Follikel eintreten und vermindert die FSH Sensitivität der Follikel [88, 96]. Hierdurch wird das FSH stimulierte Follikelwachstum und die FSH stimulierten LH Rezeptoren herunterreguliert [96]. Die Anwesenheit von AMH reduziert die Expression der Inhibin α Untereinheit [88, 89], was die Hypothese unterstützt, dass AMH das Follikelwachstum inhibiert. Transgene Mäuse, die AMH überexprimieren, sind infertil und entwickeln einen pathologischen Reproduktionstrakt mit blinder Vagina, Fehlen des Uterus und funktionslosen Ovarien, welche im Verlauf der ersten Lebensmonate degenerieren [97]. AMH defiziente Mäuse (AMHKO) sind fertil und die Ovargewichte erhöht, was zurückzuführen ist auf eine erhöhte Rekrutierung der Primordialfollikel, einhergehend mit vermehrtem präantralen Follikelwachstum [98-100]. AMH ist demnach ein weiterer Faktor, der an der Regulation der Follikulogenese beteiligt ist.

Östrogene haben einen positiven Einfluss auf das Vitamin A. Dieses ist essentiell für eine normale Reproduktionsfunktion sowohl in männlichen, als auch in weiblichen Ratten, [101] in denen es eine Rolle bei der Funktionstüchtigkeit des Ovars spielt [102, 103]. Retinsäure ist der aktive Metabolit dieses Vitamins und vermittelt biologische Effekte über nukleäre Rezeptoren. Durch eine Interaktion der Retinsäure Rezeptoren (RAR) mit sogenannten „response elements“ werden Zielgene aktiviert [104]. Der Nachweis von Retinsäure Response Elements im Ovar unterstützt die These, dass Retinsäure in diesem Zielorgan wirksam ist und bestimmte Effekte vermittelt [105]. Die Produktion von Retinsäure in bestimmten Zellen, lässt sich durch den Nachweis von zwei zytosolischen Retinsäure bindenden Proteinen, dem CRABP und CRABP (II) beschreiben. Die Funktion dieser Proteine liegt in der Bindung und dem Transport ihrer hydrophoben Liganden, sowie in der Steuerung des Metabolismus durch

beschränkten Kontakt zu bestimmten Enzymen [106, 107]. Dem CRABP II wird auch die Funktion zugesprochen, als parakriner Faktor unterstützend auf Produktion und Sekretion der Retinsäure zu wirken. Die Expression des CRABP II korreliert mit der Produktion von Retinsäure aus Retinol und erhöht die Fähigkeit verschiedener Zelltypen Retinsäure zu synthetisieren [108, 109]. CRABP II kommt vor allem im Zytoplasma von Granulosa- und Lutealzellen vor. Im Uterus wird das Protein von Deziduazellen gebildet und spielt bei der erfolgreichen Implantation eine Rolle [109].

Prostaglandine haben Einfluss auf fast alle bekannten physiologischen Funktionen durch Stimulation der Sekretion anderer Regulatoren, durch Beeinflussung des Blutstroms oder durch direkte Effekte. Sie sind wichtige Regulatoren in einer zunehmenden Anzahl endokriner Reproduktionsprozesse, wobei die genauen Effekte auf das Ovar, der Einfluss auf die Follikelreifung und Regulationsmechanismen mit 17 β -Östradiol weitgehend unbekannt sind.

Prostazyklin (Prostaglandin I₂, PGI₂) gehört in die Gruppe der Eikosanoide und wird auch zu der Gruppe der Prostaglandine gezählt. Es entsteht, indem aus Arachidonsäure mit Hilfe der Cyclooxygenase das Prostaglandin H₂ gebildet und dieses in einem weiteren Schritt durch die Prostazyklin Synthase (PGIS) zu Prostazyklin umgewandelt wird. Hohe Konzentrationen der Prostazyklin Synthase, welche zur Familie der Cytochrom P450 Superfamilie gehört [110], konnten in Herz, Lunge, Leber, Magen, Skelettmuskulatur, Ovar, Testes und Prostata gefunden werden [111, 112]. Prostazyklin relaxiert glatte Muskelzellen und ist ein potenter Vasodilatator [113], der auch auf Bronchiolen und das Myometrium des Uterus wirkt. Es inhibiert die Plättchenaggregation und als Gegenspieler des Thromboxan A₂ wirkt es der Bildung von Thromben entgegen. Prostazyklin wirkt sowohl über Membranrezeptoren an der Zelloberfläche (Prostazyklinrezeptor, IP) als auch über nukleäre Rezeptoren (PPAR) [114]. Bei Überexpression kommt es zu einer Hemmung des Wachstums glatter Muskelzellen über parakrine und autokrine Mechanismen [115]. LH stimuliert die Synthese des Prostazyklins, welches wiederum regulierend auf die Mikrovaskularisierung des heranreifenden Follikels wirken könnte [116]. Während der Schwangerschaft und Phasen physiologisch erhöhter Uterusdurchblutung wird die Prostazyklin Synthase verstärkt von Endothel und glatter vaskulärer Muskulatur gebildet [113]. Eine gesteigerte PGIS Expression in Arterien von Uterus und Niere kann auch durch die Behandlung mit E₂ oder Progesteron erreicht werden. [117]. Die Bedeutung der Prostazyklin Synthase und damit auch des Prostazyklins für das Ovar ist noch überwiegend unbekannt. Auch wurden Regulationsmechanismen durch die Östrogenrezeptoren bis dato nicht beschrieben.

4 Hormonelle Regulationen im Uterus

Durch die Interaktion der beiden ovariellen Steroidhormone 17β -Östradiol (E_2) und Progesteron (P_4) werden im Uterus zyklische Veränderungen des Endometriums reguliert, bzw. dieser auf eine mögliche Einnistung einer befruchteten Eizelle vorbereitet. 17β -Östradiol stimuliert die Proliferation, Zelldifferenzierung und sekretorische Aktivität des Endometriums [47, 118, 119]. Progesteron fördert das uterine Wachstum, die endometriale Umformung sowie die Sekretion zur Optimierung des Nidationsmilieus. Außerdem hemmt Progesteron während der Schwangerschaft die uterine Kontraktilität und gewährt Immuntoleranz durch Suppression der Lymphozytenaktivität. Progesteron wird im Ovar von Granulosazellen, Luteinzellen des Corpus luteum und während der Schwangerschaft in großen Mengen von der Plazenta gebildet. Unter LH Einfluss kommt es zu einem Anstieg der Progesteronproduktion, und über eine hypothalamische Rückkopplung durch Progesteron selbst zu einer Hemmung der Sekretion von LH durch die Hypophyse. Wirkungen des Hormons werden über den Progesteronrezeptor (PR) vermittelt, der zu der Familie der Liganden abhängigen Steroidrezeptoren gehört und nukleär anzufinden ist. Der Progesteronrezeptor ist ein Östrogen reguliertes Gen und weitgehend akzeptiert als Marker für östrogene Aktivität [10, 120, 121]. In der Promoterregion des PR Gens finden sich Teile der „Estrogen Response Elements“, welche für die Transaktivierung des PR Gens durch den aktivierten Östrogenrezeptor essentiell sind [122]. Progesteron inhibiert die Expression von 17β -Östradiol regulierten Genen [53] und reduziert die Konzentration des eigenen Rezeptors. 17β -Östradiol führt hingegen direkt zu einer gesteigerten Expression des Progesteronrezeptors und induziert somit Progesteron vermittelte Effekte. Bei Abwesenheit von Progesteron oder des Progesteronrezeptors kommt es zu gestörter Ovulation und im Uterus zu nachweisbaren Entzündungszeichen, gestörtem Sexualverhalten und epithelialer Hyperplasie, da östrogene Effekte nicht antagonisiert werden [123]. Östrogene Effekte auf den Uterus lassen sich leicht morphologisch eruieren und geben Aufschluss über die dosisabhängige Wirkung östrogenen Substanzen [124]. Schon früh wurde die Morphologie herangezogen, um die Wirkung von Östrogenen zu untersuchen. Das Uterusgewicht und die Stimulation des Endometriums stellen dabei die klassischen Größen dar [23, 124]. Darüberhinaus kann man immunhistochemisch die Induktion von Zellproliferation z.B. mit Antikörpern gegen PCNA [23, 50] [51-53] oder Ki-67 Protein nachweisen. Auch die Expression von Steroidrezeptoren ist dafür geeignet die Wirkung von Östrogenen auf den Uterus zu untersuchen. Wird die Expression von Steroidrezeptoren im Uterus immunhistochemisch untersucht, müssen allerdings die bestehenden Gewebekompartimente getrennt voneinander betrachtet werden. Die

unterschiedliche Regulation von Rezeptoren in verschiedenen Geweben des Uterus durch 17β -Östradiol macht eine Einteilung nach morphologischen und funktionellen Kriterien erforderlich [121, 125, 126]. Eine Beurteilung des gesamten Organs verfälscht die Ergebnisse und ist nicht sinnvoll [22]. Das endometriale Epithel (luminale und glanduläres) ist anerkanntes Zielgewebe östrogenen Effekte. Das endometriale Stroma, morphologisch als ein Gewebetyp zu werten, kann funktionell in subepitheliales Stroma, welches für parakrine Interaktionen mit dem Epithel verantwortlich ist, und peripheres Stroma gegliedert werden. Innerhalb dieses Gewebes kann es zu Unterschieden in der Expression und Regulation der Steroidrezeptoren kommen [127]. Das Myometrium bildet den größten Anteil am Organ und darf bei einer differenzierten Auseinandersetzung mit der gewebespezifischen Regulation von Rezeptoren im Uterus nicht fehlen. Überzeugend ist daher eine Einteilung in die uterinen Gewebekompartimente luminale und glanduläres endometriales Epithel, subepitheliales und peripheres endometriales Stroma und Myometrium.

5 Ziel der Arbeit

Eine intakte Fertilität der Frau erfordert das erfolgreiche Zusammenspiel von vielen Regulatoren. 17 β -Östradiol übernimmt hier eine zentrale Rolle, da es zum einen über direkte Effekte wirkt, zum anderen indirekt verschiedene Regulatoren beeinflusst. Die junge Erkenntnis, dass es zwei verschiedene Östrogenrezeptoren gibt, eröffnet neue Möglichkeiten der selektiven Beeinflussung der Rezeptoren und damit großes Potential für mögliche medizinische Indikationen.

Mit Hilfe von neuen selektiven ER α und ER β Agonisten sollten die durch den jeweiligen Rezeptor vermittelten Effekte an genetisch unveränderten Nagern erforscht werden. Es war ein Ziel der Arbeit die Wirkung von selektiven ER α und ER β Agonisten auf die Zielorgane Ovar und Uterus pharmakologisch herauszuarbeiten und die beobachteten Effekte im Vergleich zu publizierten Daten zu diskutieren.

Die unterschiedliche Gewebeverteilung der beiden Rezeptoren in Ovar und Uterus eröffnete die Möglichkeit zur organspezifischen Beeinflussung. Es war deshalb ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Frage zu beantworten, welche Auswirkungen der ER α , bzw. ER β Agonist auf die ovarielle Follikulogenese und uterine Stimulation am Nagetier haben und ob sich hieraus neue Aspekte für therapeutische Ansätze ergeben könnten.

Darüberhinaus sollten einige für die Ovarfunktion wichtigen endokrine Faktoren, wie Inhibin α Untereinheit, das Anti-Müllerian Hormon, CRABP II und Prostazyklin Synthase, durch eine selektive Behandlung von Nagetieren mit ER α oder ER β Agonisten weiter aufgeklärt werden.

Um diese Ziele zu erreichen wurde die Morphologie der beiden Organe untersucht und verschiedene Rezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen. Im Ovar wurden außerdem die Apoptose mit Hilfe der TUNEL Färbung und die oben erwähnten Regulatoren ovarieller Prozesse immunhistochemisch und mit Hilfe der in situ Hybridisierung untersucht.

B Material und Methoden

1 Tierversuche

1.1 Tiere und Behandlung

Die Untersuchungen wurden an weiblichen Shoe Wistar Ratten durchgeführt, welche in Makrolonkäfigen (je nach Gewicht drei bis fünf Tiere pro Käfig) in einem klimatisierten Raum bei konstanter Umgebungstemperatur (20°C) und standardisierten Hell-/Dunkelrhythmus (14 Stunden hell, 10 Stunden dunkel) gehalten wurden. Die Tiere erhielten Fertigfutter der Firma Ssniff® (Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser, bzw. 5% Glucoselösung bei hypophysektomierten Tieren ad Libitum. Alle Tierversuche wurden im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben gemäß § 7-9 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Haltung, Behandlung und operative Eingriffe entsprachen tierschutzgerechten Bedingungen.

1.2 Testsubstanzen

In den verschiedenen Tierexperimenten wurden 17 β -Östradiol, der Östrogenrezeptor α (ER α) Agonist 3, 17 β -Dihydroxy-19-nor-17 α -pregna-1, 3, 5 (10)-triene-21, 16 α -lactone (16 α LE₂), sowie der Östrogenrezeptor β (ER β) Agonist 8-Vinyl-estra-1, 3, 5 (10)-triene-3, 17 β -diol (8 β -VE₂) eingesetzt. Diese wurden freundlicher Weise von der Medizinischen Chemie der Schering AG zur Verfügung gestellt. 17 β -Östradiol (E₂) hat eine hohe Bindungsaffinität zum ER α und ER β und wurde als Referenzsubstanz betrachtet.

Die Substanzen wurden in Äthanol/ Arachisöl im Verhältnis 1+9 (v/v) gelöst und den Tieren subkutan appliziert. Als Negativkontrolle wurde den Tieren der Kontrollgruppe Äthanol/ Arachisöl 1+9 (v/v) verabreicht.

Der GnRH Antagonist Cetrorelix ist eine in der Literatur vielseitig beschriebene und verwendete Substanz, um die gonadalen Hormone zu inhibieren und dadurch eine chemische Kastration zu erreichen [128, 129]. Cetrorelix wurde freundlicher Weise von der Medizinischen Chemie der Schering AG hergestellt und zur Verfügung gestellt.

ER α Agonist (16 α -LE $_2$)

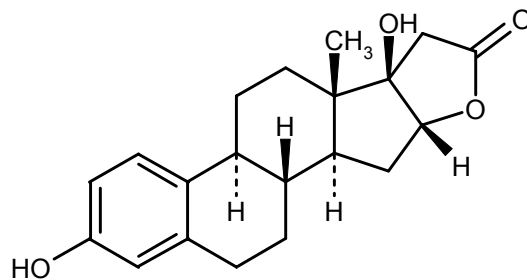
In Vitro ist der ER α Agonist charakterisiert durch eine 265fach höhere relative Potenz in ER α /ER β abhängigen Transaktivierungstests. Im Vergleich mit der Bindungsaffinität des 17 β -Östradiols (relative Bindungsaffinität, RBA) bindet diese Testsubstanz mit geringerer Affinität an den ER α und praktisch nicht an den ER β (Tab.1), wodurch sich eine 70fach höhere Rezeptorbindung für den ER α ergibt (Ratten- und Humangewebe) [130].

Molekulargewicht: 328.4056

Chemische Bezeichnung (IUPAC):

3, 17 β -Dihydroxy-19-nor-17 α -pregna-

1, 3, 5 (10)-triene-21, 16 α -lactone

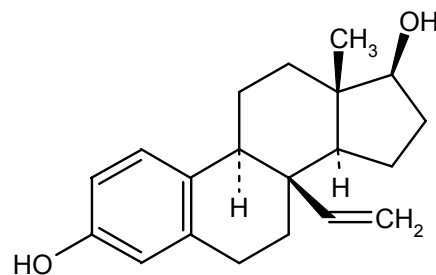
**ER β Agonist (8 β -VE $_2$)**

Der ER β Agonist [131] ist charakterisiert durch eine 190fach höhere relative Potenz in ER β /ER α abhängigen Transaktivierungstests. Im Vergleich mit der Bindungsaffinität des 17 β -Östradiol (relative Bindungsaffinität, RBA) bindet diese Testsubstanz etwas schwächer an den ER β und nur marginal an den ER α (Tab.2). Die Rezeptorbindungstests zeigen daher eine 93fache (Rattengewebe), bzw. 180fache (Humangewebe) Präferenz des ER β Agonisten für den ER β [130].

Molekulargewicht: 298.4234

Chemische Bezeichnung (IUPAC):

8-Vinyl-estra-1, 3, 5 (10)-triene-3, 17 β -diol



1.3 Versuchsansätze

1.3.1 Untersuchung der frühen Follikulogenese bei hypophysektomierten Ratten

Die Untersuchungen wurden an weiblichen immaturren Ratten (24 Tage alt) mit einem Körpergewicht von ca. 50g durchgeführt. Die Hypophysektomie fand an Tag 0 statt. An den darauffolgenden 4 Tagen (Tag 1-4) wurden die Ratten, nach Randomisierung, mit den zu testenden Substanzen täglich subkutan (s.c.) behandelt. Pro Gruppe wurden 6-7 Tiere eingesetzt. 24h nach der letzten Substanzapplikation erfolgte die Tötung in CO₂ Narkose (Abb.1). Den Ratten wurden die Ovarien entnommen und sorgfältig vom umgebenden Bindegewebe befreit.

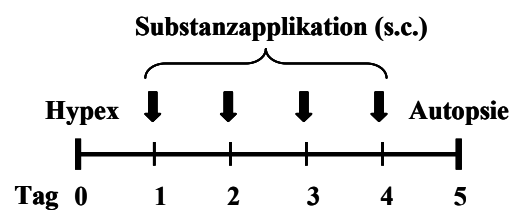


Abb. 1: Tierversuchsmodell der hypophysektomierten, weiblichen Ratte

Die absoluten Organfeuchtgewichte wurden als Gewichte in mg pro Tier bestimmt und das relative Ovarfeuchtgewicht in mg Ovargewicht pro 100g Körpergewicht berechnet. Weiterhin wurde der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Versuchsgruppe protokolliert. Für die weitere histologische und immunhistochemische Aufarbeitung wurden die Ovarien in Formaldehyd fixiert, bzw. für die in situ Hybridisierung eingefroren

Das Einfrieren (Schockgefrieren) ist eine schnell durchzuführende Methode, um Gewebe zu konservieren. Dazu wurde das Organ in Tissue Tek[®] O.C.T. Compound (#4583, Sakura Finetec, Inc., Torrance, USA) auf Trockeneis gelegt und bei -80°C gelagert. Für die chemische Fixierung wurde das Ovar größenabhängig mindestens 2 Stunden in 3.7% PBS (#14190-94, Dulbecco's, Life Technologies, Ltd. Paisley, Schottland) gepuffertem Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingelegt, wodurch eine Vernetzung der Proteine erreicht wurde. Hiernach wurden die Organe in 70% Äthanol überführt.

1.3.2 Untersuchung der frühen Follikulogenese bei GnRH Antagonist behandelten Mäusen

Die Untersuchungen wurden an weiblichen immaturren Mäusen (20 Tage alt) mit einem Körpergewicht von ca. 10g durchgeführt. Die chemische Kastration wurde durch eine Behandlung mit dem GnRH Antagonisten Cetrorelix erreicht. Das Gonadoliberin (GnRH)

wird im Hypothalamus synthetisiert und steuert das Hypothalamus-Hypophysen-System. Durch die Antagonisierung bleibt die GnRH stimulierte Sekretion der Gonadotropine LH und FSH aus dem Hypophysenvorderlappen aus, sodass folglich die Biosynthese der Sexualhormone fehlt. Die Tiere wurden randomisiert den Gruppen zu je 5 Tieren zugeordnet und für 8 Tage (Tag 1-8) mit 50µg/Tier/Tag Cetorelix behandelt. Ab Tag 5 erfolgte zusätzlich die tägliche Substanzgabe für 4 Tage (Tag 5-8) subkutan (Abb.2). Am Tag 9 wurden die Tiere in CO₂ Atmosphäre getötet und autopsiert. Die entnommenen Organe wurden gewogen und für die weitere Bearbeitung chemisch fixiert (siehe 1.3.1).

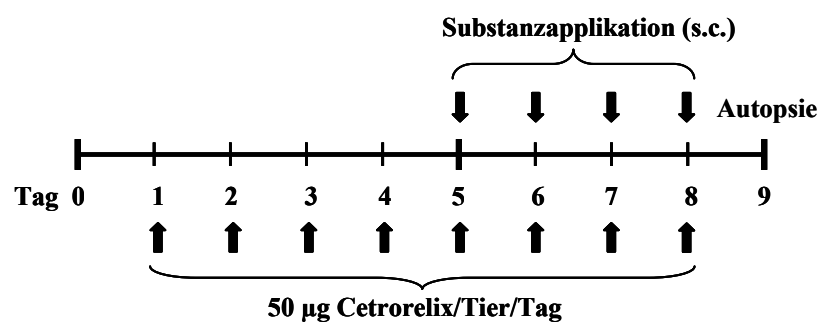


Abb. 2: Tierversuchsmodell der juvenilen GnRH Antagonist behandelten, weiblichen Maus

1.3.3 Uteruswachstumstest an der ovariectomierten Ratte

Für den Uteruswachstumstest wurden ca. 250g schwere, geschlechtsreife, weibliche Ratten eingesetzt. Die Tiere wurden in Äthernarkose unter möglichst sterilen Bedingungen ovariectomiert und frühestens 10 Tage später den verschiedenen Versuchsgruppen randomisiert zugeordnet. Dabei betrug die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe 5-6. Die Gabe von Testsubstanzen und Vehikelkontrolle erfolgte täglich für einen Zeitraum von drei Tagen (Tag 1-3). 24h nach der letzten Substanzapplikation wurden die Tiere in CO₂ Narkose getötet (Abb. 3) und beide Uterushörner entnommen.

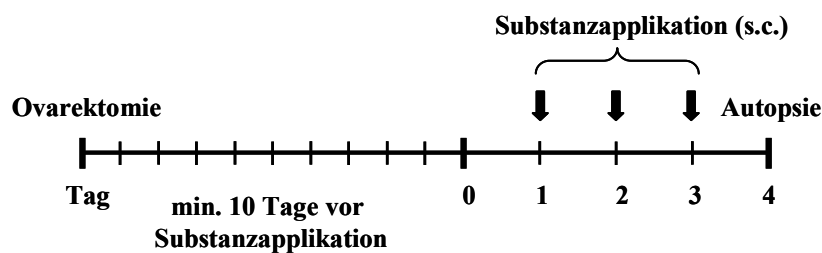


Abb. 3: Tierversuchsmodell der ovariectomierten, geschlechtsreifen, weiblichen Ratte

Beide Uterushörner wurden an der anatomischen Grenze von Uterus und Vagina, bzw. Tuben abgetrennt und von umgebendem Bindegewebe frei präpariert. Beide Hörner wurden zur Bestimmung des Uterusfeuchtgewichtes, nach dem Ausstreichen von Sekret, gewogen. Das Uterusfeuchtgewicht wurde gemessen, die absoluten (in mg/Tier) und relativen Werte (in mg/100g Körpergewicht) errechnet und für die weitere histologische und immun-histochemische Aufarbeitung in Formaldehyd fixiert (siehe B.1.3.1).

2 Probenaufarbeitung

2.1 Histologie

Für die in situ Hybridisierung wurden in Tissue Tec[®] (#4583, Sakura Finetec, Inc., Torrance, USA) geformte und bei –80°C gelagerten Organe verwendet. Mit der Kryostatschnitttechnik wurden Gewebeschnitte am Kryostat (2800 Frigocut, Reichert-Jung, Deutschland) in einer Dicke von 10µm hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden diese bei –80°C gelagert.

Um Paraffinschnitte herstellen zu können, wurden die in Formaldehyd fixierten Organe in aufsteigenden Alkoholreihen entwässert (jeweils 2 Stunden in 70%, 80%, 2x96% EtOH, 3x Isopropanol) und sowohl über alkohol-, als auch paraffinlösliche Zwischenmedien (Vulcite M2 #308843, Total Fina, Düsseldorf, Deutschland) mit flüssigem Paraffin durchtränkt (2x Paraffin, Erstarrungspunkt bei 56°-58°C, Merck, Darmstadt, Deutschland). Dies erfolgte automatisch im Autotechnikon (Modell 2050/DI, Bavimed Laborgeräte, Vieth/Wiesloch, Deutschland). Schließlich wurden die Organe am Paraffin Ausgießapparat (Medax Nagel, Kiel/Vieth, Deutschland) in Paraffin eingeblockt. Mit dem Mikrotom (HM 355, Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) wurden Schnitte in einer Dicke von 5µm hergestellt, die im warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen wurden. Im Wärmeschrank wurden die Schnitte bei 42°C über Nacht getrocknet.

Die Hämalaun-Eosin (HE-) Färbung ist eine gängige Übersichtsfärbung in der Histologie. Der Farbstoff Hämalaun färbt im alkalischen Milieu basophile Strukturen wie Zellkerne intensiv blau. Das Zytoplasma wird anschließend mit einer eosinhaltigen Lösung (1% Eosin in 70% EtOH, 0.1% Eisessig) rot gegengefärbt. Hierfür wurden die Gewebeschnitte in Xylol mindestens 15 Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% EtOH, VE-Wasser jeweils 2 Minuten) hydriert. Nach einem 10 minütigen Bad in Hämalaun nach Mayer (#2E 038, Schmid GmbH, Köngen, Deutschland), wurden die Schnitte wiederum 10 Minuten unter fließend Wasser gespült und 2 Minuten in Eosin gebadet. Es

schloss sich die Dehydration in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 70%, 80%, 96%, 100% EtOH) für jeweils 2 Minuten an. Die Schnitte wurden in Xylol überführt und nach mindestens 5 Minuten mit Histomount Eindeckmedium (#9999122, Shandon Life Sciences International GmbH, Frankfurt, Deutschland) und Deckplättchen eingedeckt.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Prinzip der LSAB- Methode

Die „labelled Streptavidin Biotin“ Methode (LSAB) nutzt die starke Affinität ($K=10^{-15}$ M) von Streptavidin für Biotin zur Kopplung enzymmarkierten Avidins an biotinylierte Sekundär-Antikörper. (Strept)avidin (*Streptomyces avidinii*) ist ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Aufgrund der molekularen Konfiguration binden jedoch weniger als vier Biotinmoleküle an das Avidin. Bei der LSAB Färbung bindet zuerst ein spezifischer Primärantikörper an das Antigen auf der Zelloberfläche und bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex. Der geeignete Primärantikörper wurde in empfohlener Konzentration in Verdünnungsmedium (#S2022, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) angesetzt und verwendet. Der Sekundärantikörper aus der Ziege (Färbekit #K5001, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) besteht aus anti-Maus und anti-Kaninchen Immunglobulinen und bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers, welcher nun als Antigen fungiert. Das an diesen zweiten Antikörper gebundene Biotin ist in der Lage das Peroxidase konjugierte Streptavidin zu binden (Abb. 4).

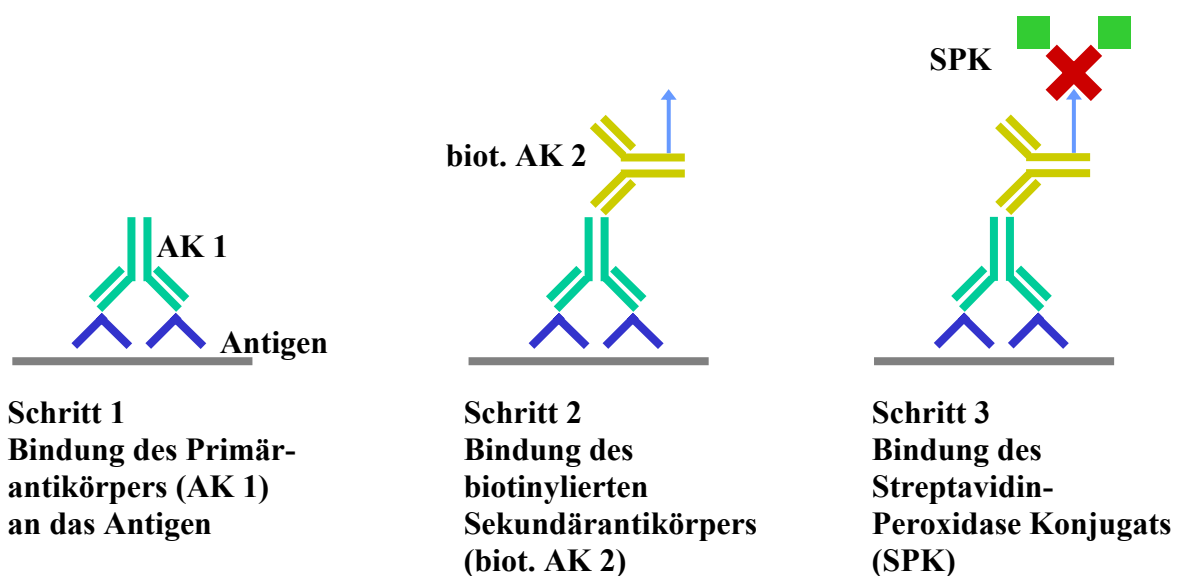


Abb. 4: Schematische Darstellung der LSAB Methode für immunhistochemische Färbungen

Die meisten Sekundärantikörper sind mit mehreren Biotinmolekülen markiert, so dass ein Makromolekül (Immunkomplex) entstehen kann. Durch die enzymatische Reaktion eines Substrats der Meerrettichperoxidase (Chromogen) können die Immunkomplexe sichtbar gemacht werden. Chromogen fungiert hier als Elektronendonator und wird durch Oxidation in ein unlösliches Reaktionsprodukt umgewandelt. Als Chromogen wurde bei dieser Färbemethode 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, DAB (#K5001, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), verwendet, welches ein braunes Reaktionsprodukt bildet und in Äthanol und organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

Die Immunperoxidase Methode kann zur Detektion von verschiedenen Antigenen und anderen Markern in der Immunhistochemie eingesetzt werden und ist anderen Färbemethoden durch die hohe Sensitivität überlegen [132, 133]. Die LSAB-Methode soll zu einer deutlichen Färbeintensität des Zellkerns oder Zytoplasmas mit geringem Hintergrund führen. Bei jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle des Primärantikörpers mit einem unspezifischen Antikörper (#H0960, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert wurde, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

2.2.2 Halbautomatisiertes Färben mit dem TechMate™ 500

Das TechMate™ 500 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) ist ein Färbeautomat, der verschiedene Wasch- und Färbeschritte einer immunhistologischen Färbung automatisiert.

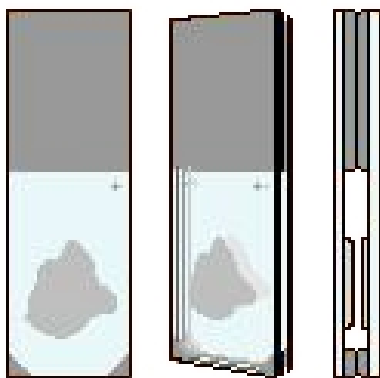


Abb. 5: Kapillarspaltprinzip der DAKO Objektträger

Dabei wird sich das Prinzip der Kapillarkraft zu Nutze gemacht. Für die Benutzung des TechMate™ müssen spezielle Objektträger (#S2024, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) benutzt werden. Diese bilden bei Gegenüberstellung einen Kapillarspalt, der eine Saugkraft erzeugt, welche die Reagenzien aspiriert (Abb. 5). Diese Technik ermöglicht, dass die Objektträger nur mit den Spitzen in die Flüssigkeiten eintauchen und dennoch das gesamte Gewebe schonend benetzt wird. So kann mit geringen Volumina der eingesetzten

Substanzen gearbeitet werden. Die Objektträger werden immer paarweise in einer Halterung befestigt, welche mit dem Roboterarm des TechMate™ zu den jeweiligen Färbevorgängen geführt wird. Die immunhistologische Färbung wird durch eine Software gesteuert, dessen einzelne Schritte standardisiert sind. An die jeweilige Färbung wird lediglich die

Inkubationsdauer des ersten und zweiten Antikörpers angepasst. Eine Färbung mit dem TechMate™ erfordert eine Vorbehandlung der Schnitte, die die Entparaffinierung und Hydratation, wie bereits bei der HE-Färbung beschrieben, inkludiert. Zusätzlich wurde noch eine Mikrowellen-Hitzebehandlung (HIER, Heat induced epitope retrieval) in Citratpuffer (#S2031, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) durchgeführt, welche der Antigendemaskierung dient. Wichtig ist hierbei, dass die Schnitte ca. 10 Minuten bei über 94°C im Citratpuffer stehen, um eine optimale Antigendemaskierung zu erreichen. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur für 30 Minuten wurde die Färbung begonnen.

Die Färbung am TechMate™ durchläuft eine Vielzahl von Einzelschritten, auf dessen detaillierte Wiedergabe hier verzichtet wird. Eine grobe Beschreibung der Vorgänge, die im Protokoll durchlaufen werden, soll ausreichend für das Verständnis dieser Technik sein.

Gestartet wurde in PBS (#14190-94, Dulbecco's, Life Technologies, Ltd., Paisley, Schottland), woraufhin sich multiple Waschvorgänge mit den dafür vorgesehenen, gebrauchsfertigen Waschpuffern (#K5006, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) anschlossen. Auch im Laufe der Färbung wurden die Schnitte immer wieder in den Waschpuffern gewaschen, um verwendete Reagenzien von den Schnitten zu spülen. Puffer 1 vermindert die unspezifische Bindung der immunologischen Reagenzien und wurde zu Beginn der Färbung verwendet. Puffer 2 und 3 blockieren Enzymreaktionen, während Puffer 4 als wässrige Lösung geeignet ist, um das zur Gegenfärbung verwendete Hämalaun nach Mayer (#2E 038, Schmid GmbH, Köngen Deutschland) abzuspülen. Die TechMate™ Software folgte der LSAB- Methode (siehe B.2.2.1). Die Inkubationszeit des ersten Antikörpers ist der Beschreibung der verwendeten Primärantikörper unter 2.2.3 zu entnehmen. Der gebrauchsfertige biotinylierte Sekundärantikörper aus dem Färbekit (#K5001, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde mit gleicher Inkubationsdauer verwendet, wie der eingesetzte Primärantikörper. Endogene Peroxidasen wurden geblockt (#S2023, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) und die Schnitte mit Streptavidin Peroxidase Konjugat (#K5001, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) 25 Minuten inkubiert. Mit dem Färbesubstrat DAB wurden positiv markierte Zellen angefärbt und das Gewebe mit Hämalaun gegengefärbt. Alle Schritte und Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.2.3 Im TechMate™ 500 eingesetzte Primärantikörper

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Der PCNA Antikörper reagiert mit proliferierenden Zellen und wurde als gebrauchsfertiger monoklonaler Maus Antikörper (Klon PC10, #H7116, DakoCytomation, Glostrup,

Dänemark) [50] verwendet. Eine Hitzebehandlung in der Mikrowelle ist bei dieser Färbung nicht nötig. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten.

Mib- 5

Der Mib- 5 Antikörper ist ein Ki-67 Antikörper der mit den Zellkernen von proliferierenden Zellen reagiert, die sich in den aktiven Phasen G1, S, G2 und Mitose, nicht aber in G0 befinden [49]. Der Mib-5 Antikörper erkennt nach einer Mikrowellen-Vorbehandlung (HIER) das Ki-67 Protein auch in Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Rattengewebe [48]. Der eingesetzte monoklonale Maus Antikörper (#M7248, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde in einer Verdünnung von 1:50 für 30 Minuten auf dem Gewebe inkubiert.

Östrogenrezeptor α (ER α)

Der monoklonale Maus Anti-Human Antikörper reagiert mit der N-terminalen Domäne (A/B Region) des Rezeptors und bindet stark an Nuklei von Zellen mit hoher ER α Expression, wie z.B. Epithel- und Myometriumzellen des Uterus. Der Antikörper (Klon 1D5, #H7098, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) ist gebrauchsfertig und mit einer Inkubationsdauer von 25 Minuten verwendet worden.

Progesteronrezeptor (PR)

Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen Kaninchen Anti-Human-Antikörper (#A0098, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), der mit der DNA bindenden Domäne (B Region, Aminosäuren 533-547) des Progesteronrezeptors reagiert [134]. Die Kerne mit einer hohen PR Expression, wie z.B. Epithel- und Myometriumzellen des Uterus zeigen eine starke Anfärbung. Die Gewebe wurden mit dem Antikörper in einer Konzentration von 1:50 für 25 Minuten inkubiert.

Inhibin α Untereinheit

Die Inhibin α Untereinheit wird in verschiedenen Geweben außerhalb und innerhalb des Reproduktionstraktes, z.B. in Granulosa Zellen des Ovars, exprimiert. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus Antikörper (Klon R1, #MCA951S, Oxford Bio-Innovation, Ltd., Oxfordshire, England), welcher die α Untereinheit (Aminosäuren 1-32) des humanen Inhibins erkennt [135]. Im TechMate™ 500 wurden die Gewebe mit einer Konzentration des Antikörpers von 1:100 für eine Stunde inkubiert.

Anti-Müllerian Hormon (AMH)

Der verwendete Antikörper (MIS C-20, #sc6886, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) ist ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege, der an das C-terminale Ende der humanen Müllerian Inhibiting Substance (MIS, Synonym: Anti-Müllerian Hormon) bindet [33]. Der Antikörper ist spezifisch für Maus-, Ratten- und Humangewebe und wurde in einer Konzentration von 1:1000 eine Stunde lang auf dem Gewebe inkubiert.

Als Sekundärantikörper wurden hier biotinylierte Kaninchen anti Ziege Immunglobuline (#0466, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:400 und einer Inkubationsdauer von einer Stunde verwendet. Als Verdünnungsmedium diente das Antikörper Verdünnungsmedium von DAKO (#S2022, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), welches auch bei allen anderen Primärantikörpern benutzt wurde.

2.2.4 Manuell durchgeführte immunhistochemische Färbemethoden zum Nachweis des ERβ

Der in dieser Arbeit eingesetzte Antikörper ist ein affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchenantikörper (Klon 310B, #PA1-310B, Dianova, Hamburg, Deutschland), gegen die Aminosäuresequenz 467 bis 485 des ERβ. Die Speziesreaktivität schließt Human- und Rattengewebe ein. Die Färbung wurde mit der Methode der Labelled Streptavidin Biotin Method (LSAB- Methode, siehe B.2.2.1) durchgeführt. Obwohl der theoretische Hintergrund analog zu der oben beschriebenen Methode ist, wurde das Protokoll modifiziert, um diese per Hand durchgeführte Färbung erfolgreich abzuschließen.

Die Gewebe wurden zunächst durch Entparaffinierung, Hydratation und Hitzebehandlung vorbereitet. Die Schnitte wurden in PBS (#14190-94, Dulbecco's, Life Technologies, Ltd., Paisley, Schottland) 2 x 5 Minuten gespült und zum Abblocken der endogenen Peroxydasen 15 Minuten in 3% H₂O₂/Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift (#S2002, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) umkreist und in einer feuchten Kammer weiterbehandelt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde nach jedem der folgenden Schritte die aufgetragene Substanz abgeklopft, mit PBS abgespült und daraufhin 2 x 5 Minuten in PBS gebadet.

Endogenes Avidin und Biotin wurden durch jeweils 30 Minuten Inkubation mit Avidin-Biotinlösung (#SP-2001, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) blockiert und in PBS gewaschen. Der ERβ- Primärantikörper, welcher in einer Verdünnung 1: 300 in Background reduzierendem Verdünnungsmedium (#S3022, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) angesetzt wurde, als auch die Negativkontrolle wurden auf die Schnitte getropft. Die

Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Der zweite Antikörper aus dem LSAB Kit (#K0609, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde aufgetragen und für 30 Minuten auf den Geweben belassen. Die Inkubationsdauer des folgenden Streptavidins betrug ebenfalls 30 Minuten. Während dieser Zeit wurde das Färbesubstrat DAB (3.3'- Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, #00-0214, Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, USA) entsprechend der Vorschrift hergestellt und ca. 5 Minuten auf den Schnitten inkubiert. Makroskopisch wurde die braune Färbung sichtbar und das DAB mit VE- Wasser abgespült. Anschließend wurde in VE- Wasser gespült, die Schnitte 15 Sekunden lang in Hämalun nach Mayer gebadet und 10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen, um eine adäquate Gegenfärbung zu erreichen. Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratation mit einem abschließenden Xylolbad an, wonach die Schnitte mit Histomount Eindeckmedium (#9999122, Shandon Life Sciences International GmbH, Frankfurt, Deutschland) und Deckplättchen eingedeckt wurden.

2.2.5 Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL Färbung

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist im Organismus von großer Bedeutung für den physiologischen Zellabbau. Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Der Zellkern schrumpft, das Chromatin verdichtet sich und es beginnen sich membranumschlossene Vesikel, die sogenannten apoptotischen Körperchen oder „apoptotic bodies“, von der Zelle abzuschnüren. Während der Apoptose kommt es durch die Aktivität von Nukleasen zu DNA-Strangbrüchen, die eine Identifizierung apoptotischer Zellen ermöglicht. Angewendet wird hierfür der sogenannte TUNEL Test (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling), bei welchem Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen werden. Die Markierung der Bruchstellen erfolgt durch das Enzym TdT (Terminale Desoxyribosyl-Transferase), welches an die freien 3'OH-Enden von DNA Strangbrüchen biotinyliertes UTP anhängt. Nach der Bindung von alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin (#016-050-084, Dianova, Hamburg, Deutschland) an UTP, können apoptotische Zellen durch ein Alkalische Phosphatase Substrat (Fast Red TR/Naphthol AS-MX, #F-4648, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) rot angefärbt werden. Dieser Farbstoff ist ein präzipitierendes Substrat, welches die Aktivität der alkalischen Phosphatase erkennt.

Es wurden Objektträger mit jeweils drei Gewebeschnitten mit einer Positiv-, Negativkontrolle und einem Reaktionsschnitt vorbereitet. Die Anordnung der Schnitte, sowie die Spülrichtung von Negativ- zu Positivkontrolle ist sehr wichtig, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern (Abb.6).

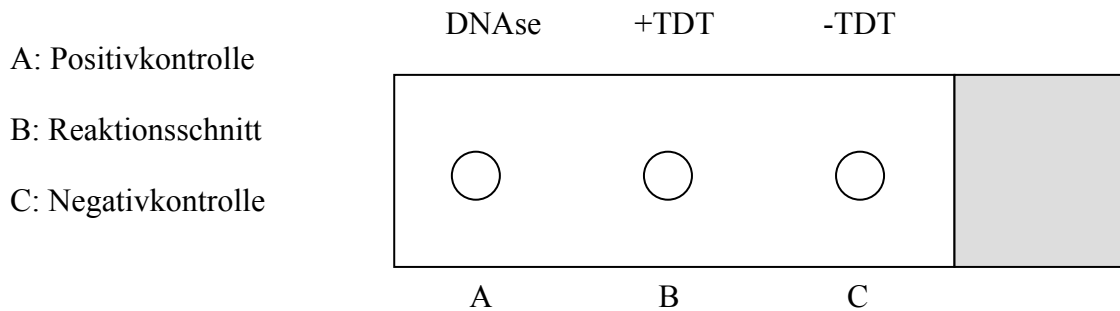


Abb. 6: Anordnung der drei Gewebeschnitte auf dem Objektträger für die TUNEL Färbung

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und zur Permeabilisierung der Zytoplasmamembran mit Pepsin (0.5% Pepsin in 100mM Na-Citrat, pH 3.5) behandelt, welches auf die Gewebeschnitte getropft und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Die Schnitte wurden mit Bidest (bidestilliertes H₂O) Spritzflasche, sowie 4 x 2 Minuten in Bidest Küvetten gespült, bevor auf die Positivkontrolle DNase I (#600032, Stratagene, La Jolla, USA) und auf den Reaktionsschnitt, und die Negativkontrolle DNase Puffer (10mM Tris-HCL, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 25mM KCl, pH 7.4) aufgetragen wurde (2 x 5min). DNase I spaltet die DNA und erzeugt so die für die Apoptose typischen DNA-Strangbrüche. Nachdem wiederum mit Bidest gespült wurde, wurde 2 x 5 Minuten TdT Puffer (30mM Tris-HCL, 140mM Na-Cacodylat, 1mM CoCl₂, 0.4mM Mercaptoethanol, pH 7.2) auf die Schnitte aufgetragen. Hiernach wurden die biotinylierten Nukleinsäuren mit dem Enzym auf die Positivkontrolle, bzw. den Reaktionsschnitt und ohne TdT auf die Negativkontrolle aufgetragen und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

- 1µl Biotin-14-ATP (# 19524-016, Life Technologies, Paisley, Schottland)
- 1µl Biotin-14-CTP (# 19519-016, Life Technologies, Paisley, Schottland)
- 0.5µl Biotin-16-UTP (# 1388908, Roche, Mannheim, Deutschland)
- 10µl Tailing Buffer (#600138, Stratagene, La Jolla, USA)
- 1.9µl TdT (#600138, Stratagene, La Jolla, USA,)
- 63.1µl H₂O

Die Reaktion wurde in Bidest gestoppt (2 x 3min). Das Auftragen von zwei prozentigem fetalen Kälber Serum für 2 x 5min blockte unspezifische Bindungsstellen ab und verhinderte

dadurch eine unspezifische Bindung des Streptavidins, welches für 60 Minuten bei 37°C auf den Schnitten belassen wurde. Das alkalische Phosphatase konjugierte Streptavidin hat an die biotinylierten Nukleinsäuren gebunden und konnte nach einem Waschvorgang mit PBS (3 x 5min) mit Alkalische Phosphatase Substrat angefärbt werden. Um eine adäquate Färbeintensität zu erreichen, mussten die Schnitte ca. 10 Minuten inkubiert werden. Anschließend wurden sie mit Bidest abgespült und in Bidest Küvetten 2 x 5min gespült. Die Schnitte wurden zuletzt in Glycergel Mounting Medium (#C563, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) mit Deckplättchen eingedeckt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Bei den molekularbiologischen Methoden wurde stets darauf geachtet, RNase frei zu arbeiten. Entsprechende Vorbereitungen der Materialien und Substanzen wurden vorgenommen.

2.3.1 RNA Isolierung

Die zur RNA Extraktion verwendeten Ovarien wurden geschlechtsreifen unbehandelten Ratten entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die RNA-Präparation wurde leicht modifiziert nach der Single-Step-Methode von Chomzynski und Sacchi [136] mit TRIzol® Reagenz durchgeführt. Dabei bewahrt TRIzol® Reagenz bei der Gewebekomogenisierung die Integrität der RNA, während Zellen zerstört und Zellkomponenten aufgelöst werden. Das Gewebekomogenat wurde mit 1 ml TRIzol® pro 50 mg Organgewicht versetzt und die Suspension mehrmals durch eine 1er Kanüle geschert, um Gewebestrukturen weiter zu trennen. Die Probe wurde mit 0.2ml Chloroform versetzt und ca. 15s lang in der Hand geschüttelt. Es entstand eine trübe Emulsion, die bei 12000g und 2-8°C für 15 Minuten zentrifugiert wurde (Kühlzentrifuge Varifuge 3.2 RS, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland). Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befand wurde abgenommen und zur Fällung der RNA 0.5 ml Isopropyl Alkohol pro 1 ml ursprünglich verwendetem TRIzol® hinzugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die präzipitierte RNA in der Heraeus Kühlzentrifuge bei 12000g und 2-8°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das gelartige RNA Pellet wurde mit 70% Äthanol gewaschen, wiederum zentrifugiert (7500g bei 2-8°C), dekantiert, und sorgfältig unter Vakuum getrocknet.

RNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260nm Wellenlänge (E260), Proteine bei 280 nm Wellenlänge (E280). Über den E260/ E280 Quotienten wurde die Reinheit der isolierten RNA

im Fotometer bestimmt. Werte mit einer E260/ E280- Ratio zwischen 1.6 und 2.0 wurden als qualitativ gut bewertet.

2.3.2 Erststrangsynthese mit Oligo dT

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase können RNA-Sequenzen in DNA-Sequenzen umgeschrieben werden. Die in den Reaktionsgemischen enthaltenen Desoxythymidin-Oligonucleotide (Oligo(dT)) dienen als Startmoleküle für die Synthese und hybridisieren mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle. Verwendet wurde das SuperScript II™ First Strand Synthesis System (#11904-018, Life Technologies, Paisley, Schottland).

2.3.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die gezielte Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Bei den durchgeführten Reaktionen wurde die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA als DNA-Template eingesetzt. Die Herstellung der verwendeten Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen Life Technologies (Groningen, Niederlande) (Tab.1).

Amplifikat	bp	Primersequenzen
Zelluläres Retinsäure bindendes Protein II (U2307)	264	CRABP II fo: 5'-AAGAGAAAGCCACCTTGCTG-3' CRABP II rev: 5'-CCCATCCACAGTCTGCTCTT-3'
Prostazyklin Synthase (U53855)	260	PGIS fo: 5'-GGGGCAGGTATGTCACTGTC-3' PGIS rev:5'- GCCTCCTTCTGTGGAGTCAC-3'

Tab. 1: Verwendete Primer für die PCR

Das 50 µl Reaktionsvolumen wurde angesetzt (5µl PCR Puffer, 4µl dNTP, 1µl Primer (20pmol/µl), 1µl cDNA, 0.5µl Taq Polymerase und 38.5µl DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser) und die cDNA in einem Thermozykler amplifiziert. Die Proben wurden bei 94°C für 10 Minuten denaturiert und dadurch die Taq Polymerase (Taq Gold, #808 0242, Perkin Elmer, Boston, USA) aktiviert. Es schlossen sich 35 Reaktionszyklen bestehend aus Denaturierung (1 min 94°C), Primer Annealing (1 min 58°C) und Synthese (1 min 72°C) an. Ein finaler Syntheseschritt für 10 Minuten beendete die PCR.

Das Ergebnis der PCR wurde in einem 1%igen Agarosegel mit Gelstar (#50535, BMA, Rockland, USA) unter UV Licht kontrolliert (Abb. 7). Das zu erwartende PCR Produkt hatte eine Länge von 264 bp (CRABP II) bzw. 260 bp (PGIS).

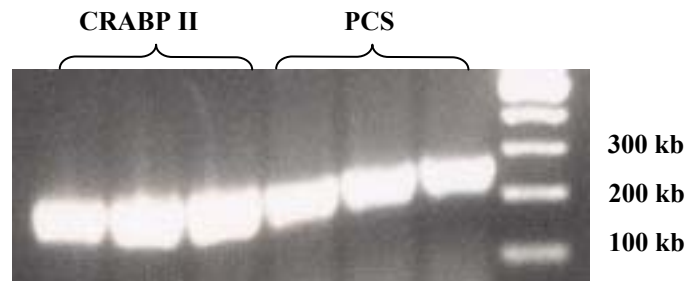


Abb. 7: Im Agarose- Gel nachgewiesene PCR Produkte von CRABP II und PGIS. Die schiefe Laufweite kommt durch Spannungsabweichungen am Rand des Gelträgers zustande.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung und Darstellung von Nukleinsäuregemischen nach ihrer Größe. Das 1%ige Agarose Gel wurde in TAE-Laufpuffer (40mM Tris-Acetat, pH 7.5-7.8, 1mM EDTA) angesetzt und mit Gelstar (#50535, BMA, Rockland, USA) versetzt. Die Proben sowie ein DNA-Längenmarker (100bp DNA ladder; Life Technologies, Paisley, Schottland) wurden zum Beschweren mit „loading Dye“ (0.25% Xylencyanol FF, 0.25% Bromphenolblau, 25% Glycerin) gemischt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30 Minuten bei 90V. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden unter UV-Licht beurteilt und fotografiert.

2.3.5 cDNA Gel Extraktion

Die erfolgreich aufgetrennte cDNA wurde aus dem Agarose Gel herausgeschnitten und mit dem Qia Quick Gel Extraction Kit (#250, Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Es wurde nach dem standardisierten Protokoll vorgegangen und die im Kit vorhandenen Substanzen verwendet. Eine weitere Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle durchgeführt

2.3.6 DNA Klonierung der PCR-Produkte

Bei der Methode des Klonierens werden die zu vervielfältigenden DNA-Fragmente zunächst in Plasmid-Vektoren und diese anschließend in Bakterien eingebracht. Bei Anzucht der Bakterien auf Nährböden kommt es zu einer gleichzeitigen Vermehrung der Fragment-tragenden Plasmid- DNA. Um die PCR- Fragmente zu klonieren, wurde das Verfahren der TA-Klonierung eingesetzt. Dabei wird die Erzeugung eines 3'-Single-A-Überhangs durch die Taq-Polymerase genutzt, um das PCR- Produkt effizient in einen Transskriptonsvektor mit 5'-Single-T-Enden zu klonieren. Die DNA wird in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors kloniert, die von zwei RNA Polymerasepromotoren eingerahmt ist (T3, T7, Abb. 9).

Die Ligation wurde mit dem TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Groningen, Niederlande) und dem dazugehörigen Standardprotokoll durchgeführt. Die Vektoren wurden auf Agarplatten bebrütet und Insert tragende, weiße Bakterienkolonien für die weitere Bearbeitung abgenommen. Bei Insert tragenden Kolonien wurde die Synthese von β -Galaktosidase unterbrochen, wodurch der Abbau eines zugesetzten Indikators zu einem blauen Produkt nicht mehr möglich war.

Durch eine PCR wurde das Vektoren-genom amplifiziert (PCR Ansatz: 25 μ l Master Mix (Perkin Elmer, Boston, USA), 1 μ l Primer Mix T3/ T7 20 pmol/ μ l und 24 μ l DEPC Wasser) und in der Gelelektrophorese auf Vorhandensein der gewünschten Sequenz hin überprüft. Eine Kolonie wurde ausgewählt und über Nacht in 200 ml Nährmedium schüttelnd kultiviert (200 rpm, 37°C).

2.3.7 Maxi Präparation

Die Insert tragenden Plasmide wurden aus der Übernachtskultur durch alkalische Lyse und Zentrifugation isoliert und anschließend über Säulen aufgereinigt. Die DNA wurde mit dem Qiafilter Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Zur Überprüfung der Qualität der DNA wird die optische Dichte gemessen, der E260/E280 Quotient bestimmt und die Konzentration der Probe errechnet.

2.3.8 Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte

Die Identifizierung der Basenfolge wurde durch Sequenzieren mit Reverse Primern bei der Firma AGOWA (Berlin, Deutschland) und anschließender Abgleichung der Ergebnisse mit der NCBI Datenbank überprüft.

2.3.9 Linearisierung der Plasmide

Das gewonnene Plasmid wurde durch die ECO RI Restriktionsendonuklease beiderseits der multiplen Klonierungsstelle (MCS) geschnitten und das cDNA Insert herausgetrennt. Die vollständige Linearisierung wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert und diente der Vermeidung von read-through Transkripten. Mit den Restriktionsendonukleasen SPE I und NOT I, welche innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) schneiden, wurden die Plasmide in Bezug auf den gewählten Promoter stromabwärts von der Fremd-DNA linearisiert (Abb. 8 und 9).



Abb. 8: vollständig linearisierte Plasmide mit den Inserts CRABP II und PGIS. Die Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen NOT I und SPE I geschnitten.

Der Restriktionsansatz (10µl Puffer 2/3, BioLabs, Inc., Frankfurt, Deutschland, 4µl Restriktionsenzym, 10µg DNA, 76µl H₂O) wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und die gewonnene DNA durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt (Phenol/Chloroformisoamyl-alkohol, #15593-031, Life Technologies, Paisley, Schottland). Die DNA wurde bei –20°C gefällt (3M Na-Acetat pH 5.2, 100% Ethanol) und 30 Minuten bei 12000g in der Biofuge (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Das gebildete Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, wiederum zentrifugiert, dekantiert und unter Vakuum getrocknet. Das Ergebnis wurde gelelektrophoretisch kontrolliert.

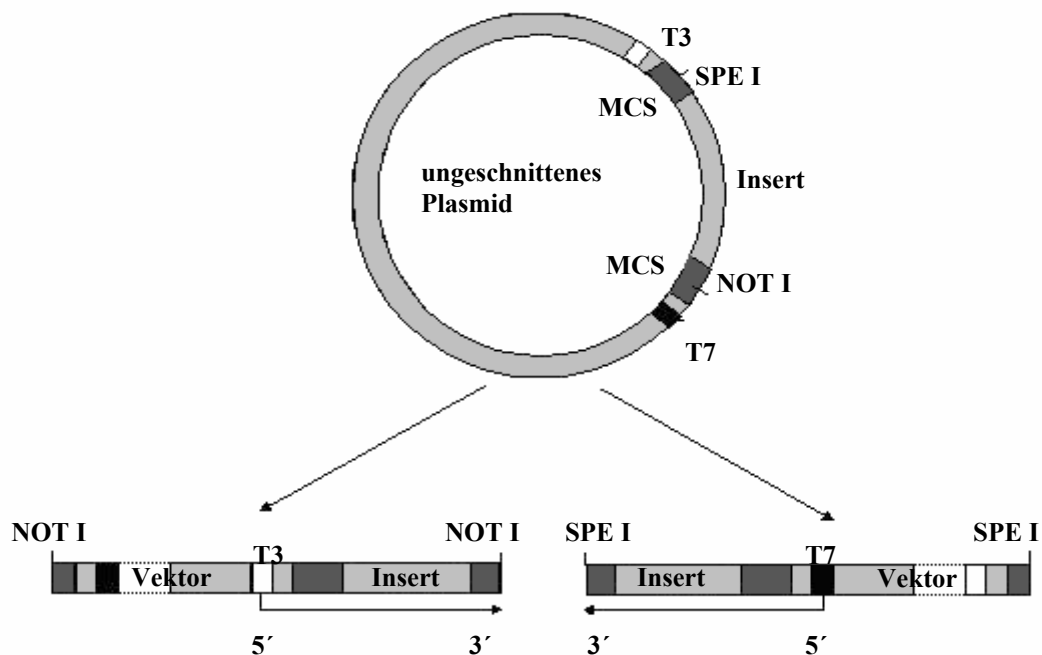


Abb. 9: Darstellung des Aufbaus eines ungeschnittenen Plasmids mit seinen Schnitt- und Klonierungsstellen

2.3.10 In Vitro Transkription

Je 1 µg des linearisierten Plasmids wurde mittels *in vitro* Transkription mit Digoxigenin in beiden Richtungen markiert. Durch Transkription mit der T3- Polymerase (15 U/µl, #600111, Stratagene, La Jolla, USA) entstand das antisense konfigurierte Transkript, durch Verwendung der T7 Polymerase (15 U/µl, #600123, Stratagene, La Jolla, USA) das sense konfigurierte Transkript (Negativkontrolle). Die beiden Transkriptionen erfolgten in einem 50 µl Ansatz mit:

- 4 µl linearisierte DNA (1 µg)
- 22 µl DEPC- Wasser
- 10 µl 5x Transkriptionspuffer
- 5 µl DIG RNA labelling mixture 10x
- 5 µl 0,1 M DTT
- 1.2 µl RNasin (#P2020, Promega, Mannheim, Deutschland)
- 3 µl RNA Polymerase (T3; bzw.T7)

Dieser Ansatz wurde für zwei bis drei Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl DNase RNase-frei (35U/µl, #776 785, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) innerhalb von 30 Minuten gestoppt, indem die DNA abgebaut wurde. Die Transkripte wurden bei –20°C für eine Stunde gefällt (1/10 Volumen 4M LiCl und 2.5 Volumen 100% Ethanol) und daraufhin gewaschen, getrocknet und resuspendiert. Die Transkript RNA wurde in einem 1% Formaldehydgel überprüft.

2.3.11 Formaldehyd-Gel für denaturierende RNA-Trennung

Die Agarose wurde für ein 1% iges Formaldehyd-Gel in Morpholinopropansulfansäure (MOPS) gelöst und nach Abkühlung auf ca. 65°C mit 37% Formaldehyd versetzt. Vor der Gelektrophorese für 60 Minuten bei 100V wurden die Proben mit 2 Volumen Probenpuffer (50 µl 100% Formamid, 20 µl 37% Formaldehyd, 20 µl 5x MOPS, 4 µl Gelstar) vermischt und für fünf Minuten bei 80°C denaturiert. Die Transkripte wurden unter UV-Licht in Bezug auf Größe und Quantität überprüft (Abb.10).

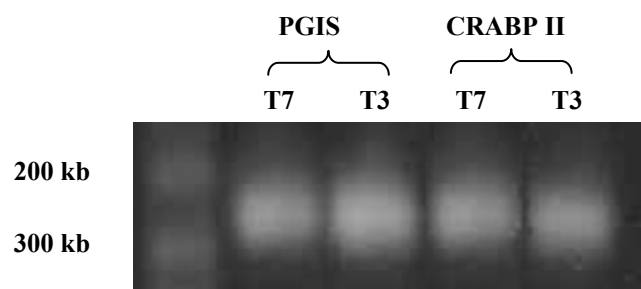


Abb. 10: in Formaldehydgel nachgewiesene, mit T7-, bzw. T3 Polymerase transkribierte RNA Produkte.

2.3.12 Konzentrationsbestimmung der Probe

Die Konzentration der RNA Transkripte wird mit Hilfe einer Eichreihe bestimmt. Auf eine Nylonmembran (#NEF.-976, NEN GenScreen, Boston, USA) wird jeweils 1µl einer Eichreihe (DIG- markierte Kontroll- RNA, #1585 746, Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland) und einer Probenverdünnungsreihe aufgetragen und nach dem Trocknen im UV- Crosslinker (UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA) fixiert. Für die immunologische Detektion der Proben wurde die Membran in verschiedenen Puffern geschwänkt. Beginnend mit Puffer 1 (0.1M Maleinsäure, 0.15M NaCl, pH 7.5) für 2 Minuten, folgte das Blocken für 30 Minuten in Puffer 2 (1% Blockingreagenz für Nukleinsäure-Hybridisierung, #1096 176, Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland in Puffer 1). Im nächsten Schritt fand die Inkubation des Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragments für 30 Minuten statt (#1093 274, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Die Membran wurde zweimal 15 Minuten in Puffer 1 gewaschen, bevor sie für 5 Minuten in Puffer 3 (0.1M Tris-HCL, 0.1M NaCl, 5mM MgCl, pH 9.5) überführt wurde. Anti-DIG-Antikörper sind mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, die anschließend hinzugegebenes Chemolumineszenz-Substrat (CSPD, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) spaltet, wodurch eine photochemische Reaktion entsteht. Die Membran wurde in einer Folie luftdicht eingeschweißt und konnte einem Fotofilm aufgelegt werden.

Durch vergleichen der Farbintensität der Probenpunkte mit der Eichreihe wurde die DIG-Konzentration der Probe bestimmt.

2.3.13 In situ Hybridisierung

Die 10µm dicken Gewebeschnitte wurden am Kryostat geschnitten und auf Superfrost Plus Objektträger (#041300, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen bei -80°C gelagert. Vor der Fixierung wurden die Objektträger getrocknet und für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS (#14190-94, Dulbecco's, Life Technologies, Ltd. Paisley, Schottland) fixiert. Die Schnitte wurden in PBS gewaschen (2 x 5 min), acetyliert (2.9ml Triethanolamin und 625µl Acetanhydrid in 250ml Wasser) und noch einmal in PBS gewaschen (2 x 5 min). Prähybridisiert wurde in einer feuchten Kammer mindestens 4 Stunden mit Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC, 5x Denhardt's, 200µg/ml bakers yeast tRNA, 100µg/ml hering sperm DNA (#R5636, bzw. #D7290, SIGMA, Taufkirchen, Deutschland)). Hybridisierungspuffer wurde mit der DIG-RNA-Probe vermennt, für 5 Minuten bei 85°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. 100µl wurden aufgetragen, die Schnitte mit Deckgläschen bedeckt und mit Fixogum Klebstoff (Marabu, Tamm, Deutschland) luftdicht versiegelt. Die Hybridisierung fand in einer feuchten Kammer über

Nacht bei 72°C statt. Die Deckgläschen konnten in einem 5x Citratpuffer (SSC) bei 72°C entfernt und die Schnitte darin gewaschen werden. Nach 15 Minuten folgte ein RNase-Verdau unspezifisch gebundener RNA in RNase-Puffer (40µg/ml RNase, 0.5M NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, 10mM DTT) für eine Stunde bei 37°C. Kurzem Spülen in 5x SSC (72°C) folgte stringentes Waschen in 0.2x SSC für eine Stunde bei 72°C und fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Unter stringenten Bedingungen bleiben nur Sonden mit nahezu perfekt komplementären Sequenzen gepaart, was den Anteil der falsch gepaarten Basen reduziert und die Spezifität erhöht. Die mit der Zielsequenz hybridisierten Sonden wurden immunogen mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper (#1093 274, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) markiert. Hierzu wurden die gleichen Puffer verwendet, wie in B.2.3.12 bereits beschrieben. Die Präparate wurden für 5 Minuten in Puffer 1 gespült, bevor sie eine Stunde mit Puffer 2 inkubiert wurden. Puffer 2 blockt unspezifische Bindungsstellen im Gewebe ab und gewährleistet so eine spezifische Bindung des Anti-Digoxigenin Antikörpers, welcher in einer Konzentration von 1: 5000 aufgetragen und nach einer Stunde Inkubation abgesaugt wurde. Dem Waschen in Puffer 1 (2x 30 min) folgte eine Äquilibration in Puffer 3 für 5 Minuten. Die Farbreaktion in Puffer 4 (45µl NBT, 35µl X-Phosphat (#N6876, bzw. #B8503, SIGMA, Taufkirchen, Deutschland) in 10ml Puffer 3) verlief im Dunkeln unter Luftausschluß für ca. 24 Stunden. Abgestoppt wurde die Farbreaktion in Puffer 5 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) für weitere 24 Stunden, bevor die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach Überführung in Xylol in Histomount Eindeckmittel (#9999122, Shandon Life Sciences International GmbH, Frankfurt, Deutschland) eingedeckt wurden.

3 Histologische und immunhistochemische Auswertung

3.1 Quantitative Auswertung

3.1.1 Epithelhöhen

Für die Messung der Epithelhöhe des Uterus wurde mit dem Photomikroskop (Axiophot2, Zeiss, Jena, Deutschland) mit angeschlossenem Bildanalysesystem (KS 400 Imaging System 3.0, Zeiss, Jena, Deutschland) gearbeitet. Die Epithelhöhe des luminalen Rattenendometriumepithels wurde an HE-gefärbten Präparaten gemessen. Dabei wurde mit einem 40fachen Objektiv die Epithelhöhe an mindestens fünf repräsentativen Stellen pro Präparat durch Einfügen eines Messbalkens gemessen. Dabei war es wichtig, dass an diesen Stellen das einschichtige Zylinderepithel senkrecht zum darunter liegenden Stroma

geschnitten und in der ganzen Höhe erfassbar war. Das Bildanalyseprogramm errechnete den Mittelwert der vermessenen Punkte in μm .

3.1.2 Proliferation

Das gleiche Bildanalyseprogramm wurde dazu verwendet die Uterusproliferation zu messen. Dazu wurde bei 20fachem Objektiv die Gesamtlänge des luminalen Endometriumepithels sowie des Drüsenepithels gemessen. Weiterhin wurde jede proliferierende Zelle, die in der Mib-5, bzw. PCNA Proliferationsfärbung deutlich positiv gefärbt war, gezählt. Die Software errechnete einen Proliferationsindex für das luminale Endometriumepithel und einen Proliferationsindex für das Drüsenepithel. Dieser Index gibt die Anzahl der proliferierenden Epithelzellen pro Millimeter Endometrium- bzw. Drüsenepithellänge an und besitzt die Einheit Zellen/ mm Epithel.

3.1.3 Follikelstaging

Das Follikelstaging wurde an Serienschnitten eines gesamten Ovars durchgeführt. Dabei wurden Schnitte in einer Dicke von $5\mu\text{m}$ im Abstand von $20\mu\text{m}$ angefertigt und HE gefärbt. Klassifiziert wurde jeder Follikel in Anlehnung an die Definitionen von Pederson und Peters [137] anhand des Entwicklungsstadiums, definiert durch die Anzahl und Morphologie der Granulosazellen (Abb. 11). Eingeteilt wurde in Follikel mit einer kompletten Schicht Granulosazellen (Typ 3a und 3b), zwei Granulosazellschichten (Typ 4), präantrale Follikel (Typ 5a und 5b) und antrale Follikel (Typ 6, 7 und 8). Der Abstand der Serienschnitte von $20\mu\text{m}$ ist sinnvoll, da der Zellkern der Oocyte einen Durchmesser von ca. $20\mu\text{m}$ hat und so weder ein Follikel übersehen noch doppelt gezählt wird, wenn nur in der Ebene des Nukleus klassifiziert wird.

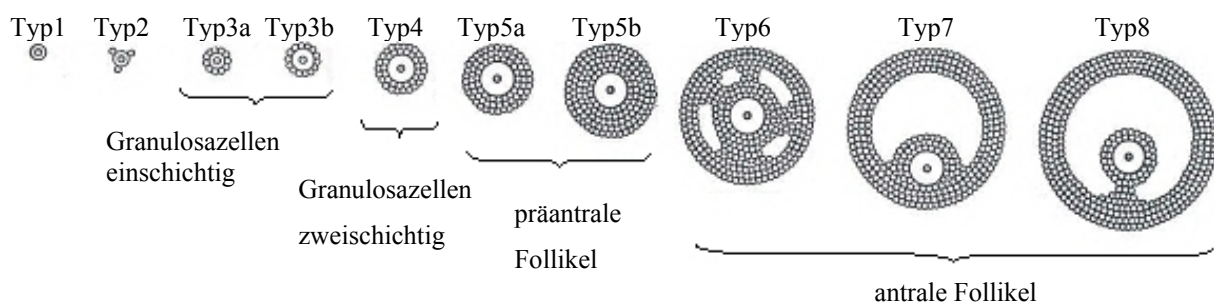


Abb. 11: Einteilung der Entwicklungsstadien von Follikeln in vier Entwicklungsstadien: einschichtige Granulosazellschicht, zweischichtige Granulosazellschicht, präantrale Follikel, antrale Follikel

3.2 Semiquantitative Auswertung

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte am Lichtmikroskop. Aus der Färbeintensität und Anzahl der immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen im untersuchten Gewebe, wurde ein Färbescore von negativ -, leicht +, deutlich ++, stark +++ ermittelt.

Um die semiquantitative Auswertung anschaulicher zu gestalten, wurden die Werte gemittelt und die Standardabweichung der Bewertung errechnet. Auf diese Weise war es möglich die semiquantitative Auswertung in Diagrammen übersichtlich darzustellen und Abweichungen innerhalb einer Versuchsgruppe aufzuzeigen.

3.3 Fotografische Dokumentation

Für eine fotografische Dokumentation von ausgewählten Schnitten der histologischen und immunhistologischen Färbungen wurde das Lichtmikroskop (Axiophot2, Zeiss, Jena) mit der Software Axiovision und den geeigneten Objektiven der Firma Zeiss verwendet.

3.4 Statistische Auswertung

Bei allen durchgeführten Tierversuchen wurde für die quantitativen Parameter relatives Ovarfeuchtgewicht, relatives Uterusfeuchtgewicht, Epithelhöhen und Proliferationsindex des luminalen, bzw. glandulären Uterusepithels aus den Einzelwerten der Versuchstiere pro Gruppe der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 3.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, USA). Um signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsmethoden herauszufinden, wurde mit den oben aufgezählten quantitativen Parametern für jeden Tierversuch ein One-way ANOVA (Analysis of Variance) Test mit dem Dunnett's Posttest [138] durchgeführt. Als Vergleichsgruppe wurde stets die Vehikelgruppe gewählt.

Semiquantitativ ausgewertete Parameter im Ovar, wie Proliferationsaktivität, Apoptose, Expression von ER α und ER β , Inhibin α Untereinheit und Anti-Müllerian Hormon, wie auch im Uterus die Expression von ER α und Progesteronrezeptor wurden in den jeweiligen Gruppen gemittelt (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Da es sich hier um eine deskriptive Bewertung handelte, wurde von der Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede abgesehen.

Die Beurteilung der molekularbiologischen Ergebnisse erfolgte deskriptiv.

3.5 Spezifität der Färbungen

3.5.1 Spezifität immunhistochemischer Färbungen

In jeder durchgeführten immunhistochemischen Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, um zu überprüfen, ob es zu unspezifischen Bindungen kam. Dabei wird statt des Primärantikörpers eine gebrauchsfertige Negativkontrolle (#H0960, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) mit unspezifischem Antikörper verwendet, wodurch das Antigen nicht markiert und so die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers überprüft wird. Allen oben beschriebenen immunhistologischen Färbungen wird folgend die entsprechende Negativkontrolle einem repräsentativen, positiv markierten Gewebeschnitt gegenübergestellt. Positiv markierte Zellen sind braun markiert. Die Abbildungen 12 bis 19 veranschaulichen die Spezifität der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen.

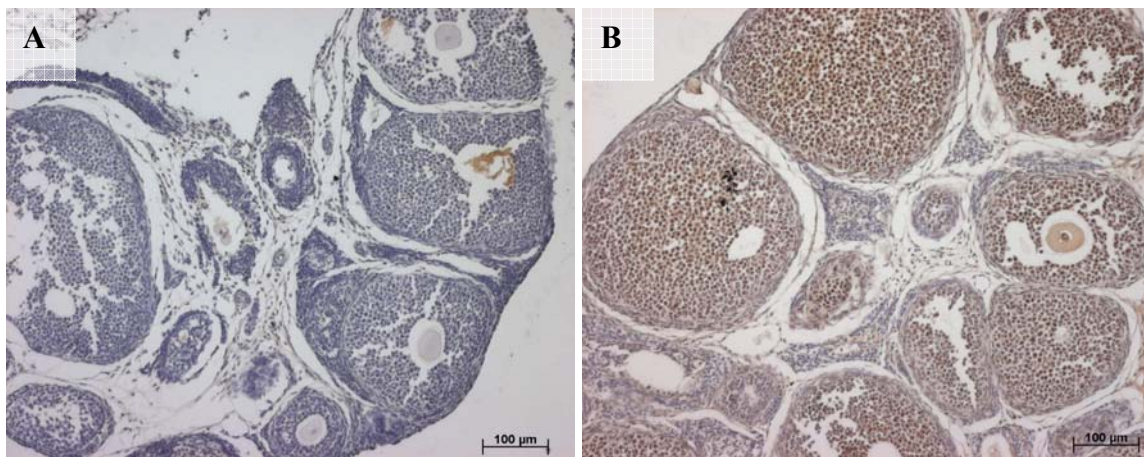


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von Proliferation mit der PCNA Färbung im Paraffinschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 100fache Vergrößerung.

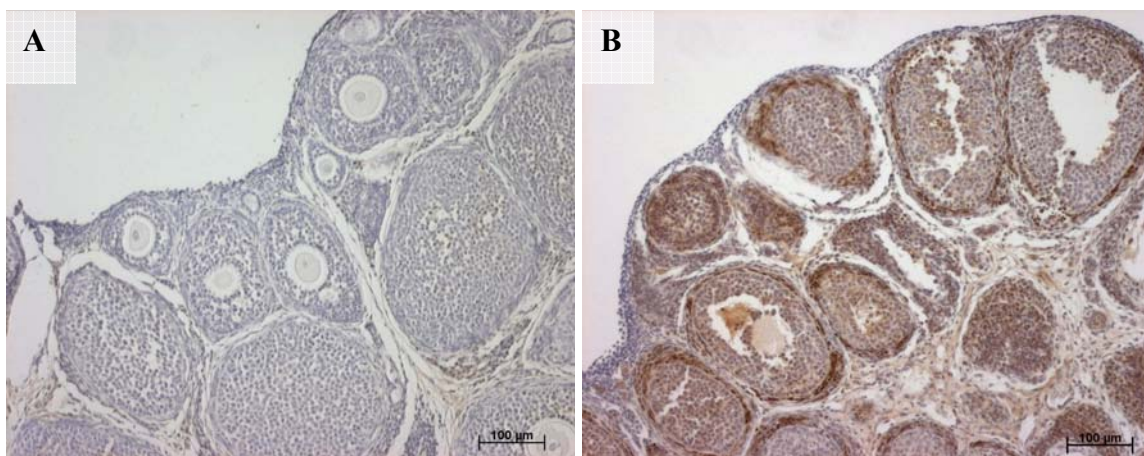


Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptor α (ER α) im Paraffinschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 100fache Vergrößerung.

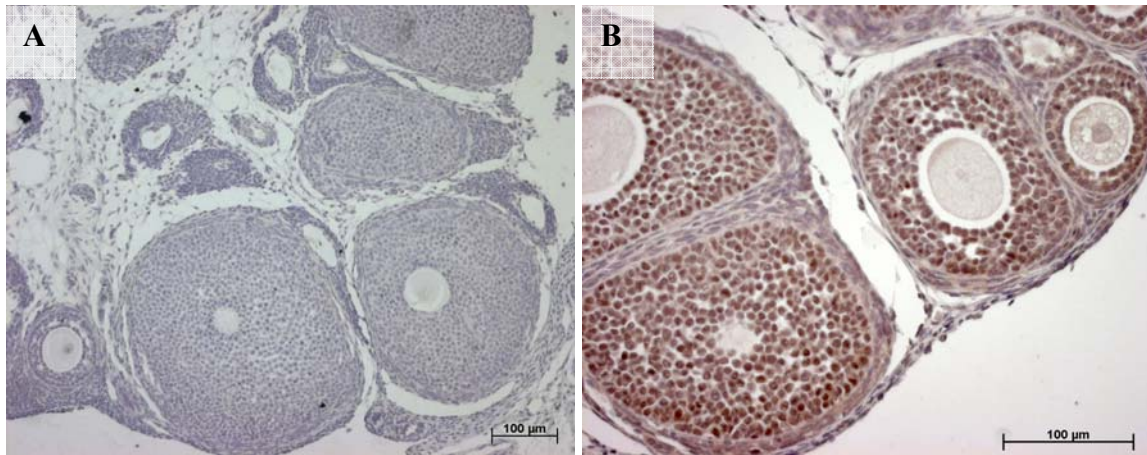


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptor β (ER β) im Paraffinschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 200fache Vergrößerung.

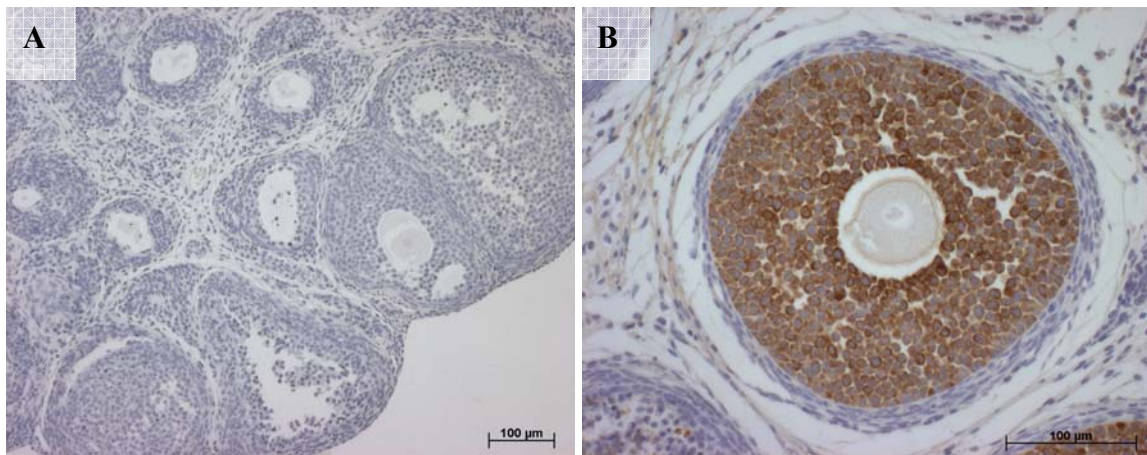


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von Inhibin α Untereinheit im Paraffinschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 200fache Vergrößerung.

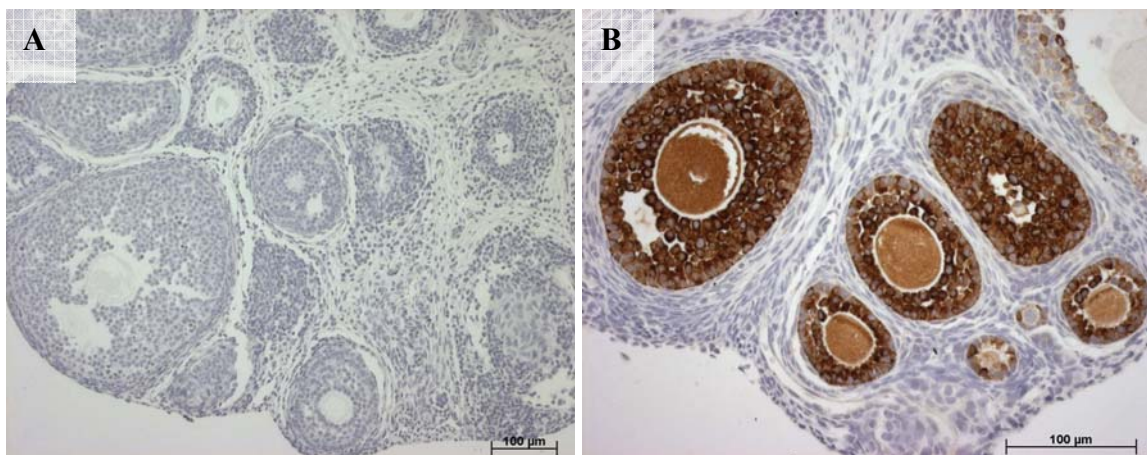


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von Anti-Müllerian Hormon (AMH) im Paraffinschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 200fache Vergrößerung.

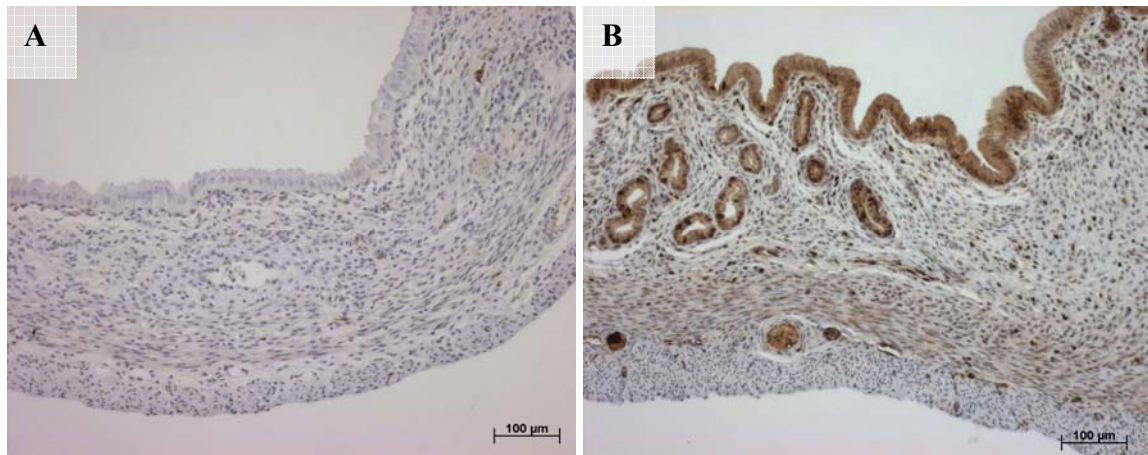


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 mit der Mib-5 Färbung im Paraffinschnitt eines Rattenuterus, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 100fache Vergrößerung.

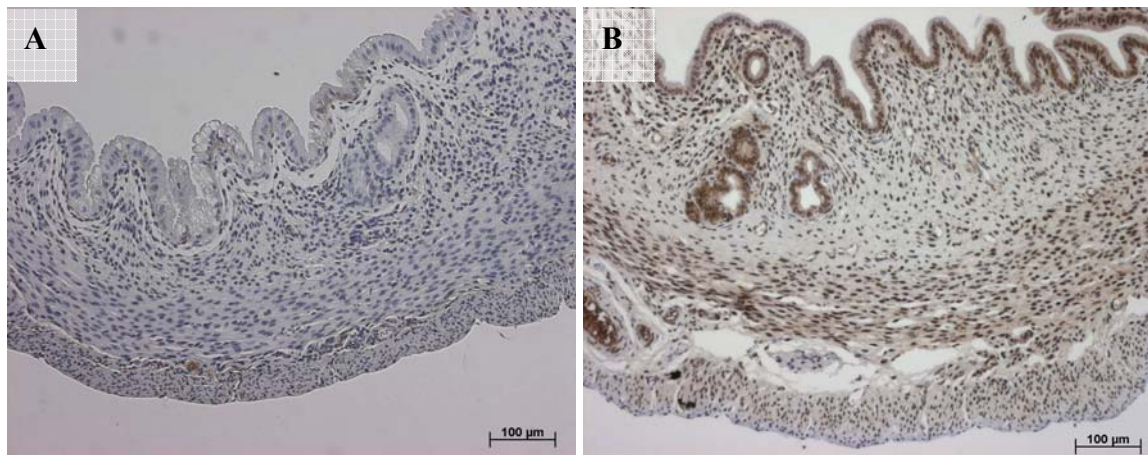


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptor α (ER α) im Paraffinschnitt eines Rattenuterus, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 100fache Vergrößerung.

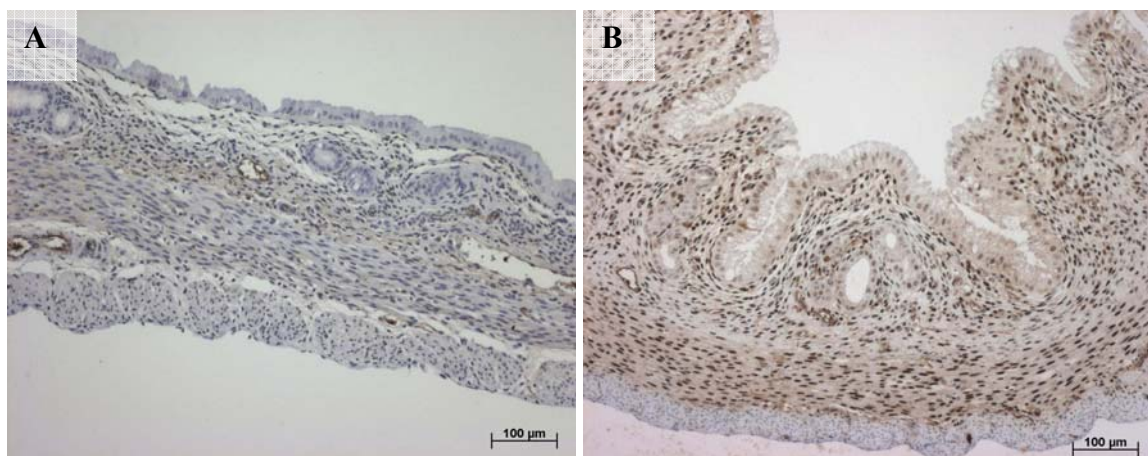


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptor (PR) im Paraffinschnitt eines Rattenuterus, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 100fache Vergrößerung.

3.5.2 Spezifität der TUNEL Färbung

Durch das fehlende Enzym TdT (Terminale Desoxyribosyl-Transferase) im Gemisch der Negativkontrolle werden die markierten Nukleinsäuren nicht an die DNA Bruchstellen des Gewebes angesetzt. Tritt dennoch eine positive Markierung auf, kann diese nur durch unspezifische Bindung zustande kommen, wodurch die Spezifität dieser Färbung kontrolliert wird.

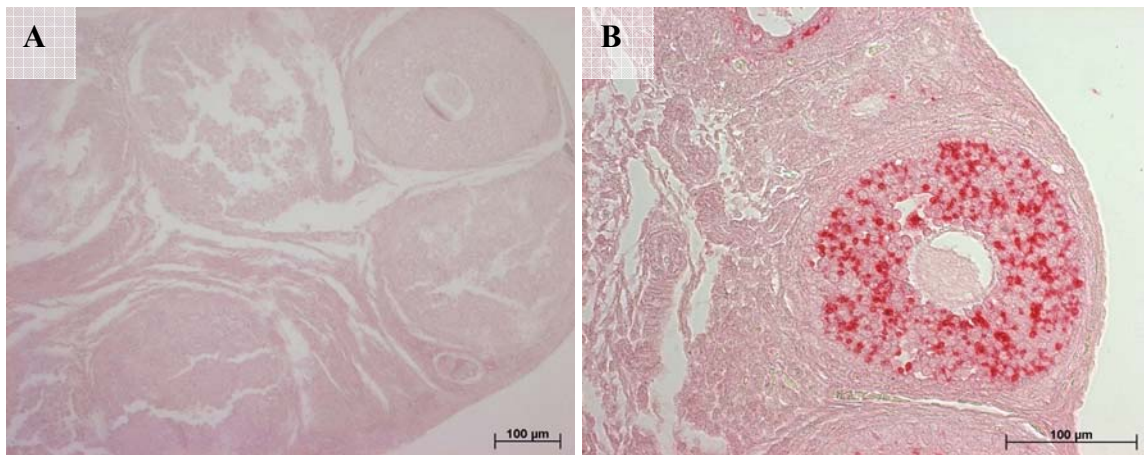


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von Apoptose mit der TUNEL Färbung im Paraffinschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 200fache Vergrößerung.

3.5.3 Spezifität der in-situ Hybridisierung

Bei der in situ Hybridisierung wurde in jeder verwendeten feuchten Kammer, in welcher die immunologische Detektion durchgeführt wurde, eine Negativkontrolle eingesetzt. Der Negativkontrolle fehlte die für die Hybridisierung nötige RNA Probe, wodurch die Spezifität der übrigen Substanzen überprüft wurde.

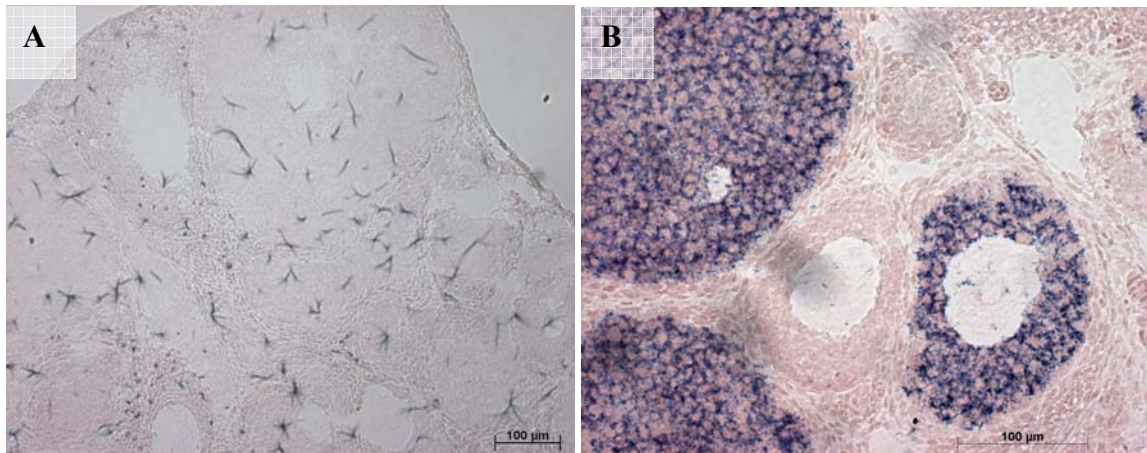


Abb. 21: molekularbiologischer Nachweis von zytosolischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II) mit Hilfe der in situ Hybridisierung im Gefrierschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 200fache Vergrößerung.

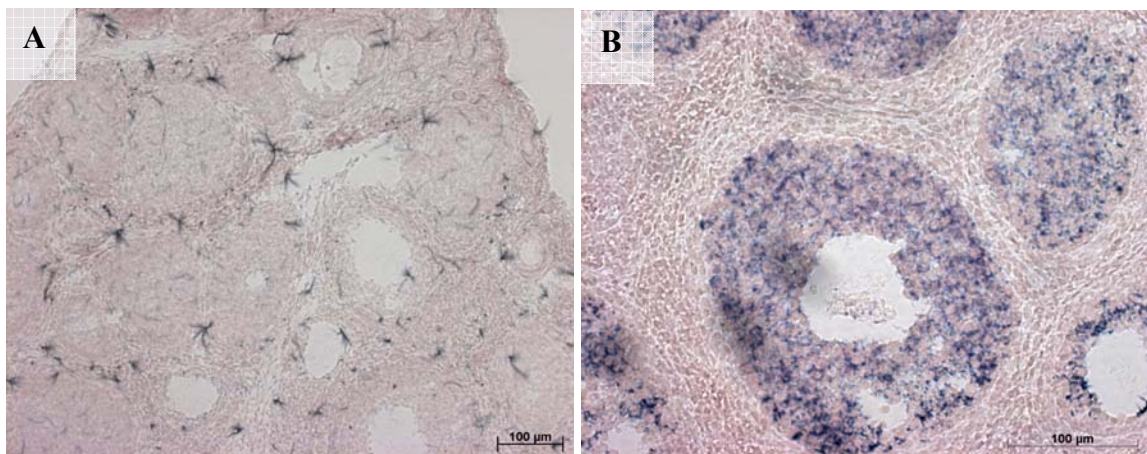


Abb. 22: molekularbiologischer Nachweis von Prostazyklin Synthase mit Hilfe der in situ Hybridisierung im Gefrierschnitt eines Rattenovars, A) Negativkontrolle: 100fache Vergrößerung, B) positiv markiertes Gewebe: 200fache Vergrößerung.

C Ergebnisse

1 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf das Ovar von Ratte und Maus

Es wurden die Wirkungen von ER α und ER β Agonisten im Vergleich zu Vehikel und 17 β -Östradiol in hypophysektomierten immaturren Ratten und GnRH Antagonist behandelten immaturren Mäusen untersucht, die täglich über 3-4 Tage subkutan behandelt wurden (siehe Kapitel B.1.3). Als Untersuchungsendpunkte dienten im Ovar beider Spezies das Organgewicht und die Follikelreifung, welche mit Hilfe des Follikelstagings untersucht wurde (siehe Kapitel B.3.1.3). Weitere Untersuchungsendpunkte in Ratten waren die Proliferation und Apoptose und die Protein- oder Genexpression verschiedener Rezeptoren und Proteine, wie die Östrogenrezeptoren α und β , Inhibin α Untereinheit, Anti-Müllerian Hormon (AMH), zytosolisches Retinsäure bindendes Protein II (CRABP II) und Prostazyklin Synthase (PGIS).

1.1 Einfluss auf das Ovargewicht

Ratte:

Das relative Ovarfeuchtgewicht der mit Vehikel behandelten Ratten diente als Kontrollgruppe, an dessen Wert die Ovargewichte der anderen Versuchsgruppen gemessen wurde. Im Mittel wogen die Ovarien der Kontrollgruppe 20.5 mg/100g Körpergewicht. Durch Applikation des ER α Agonisten in der Dosis 0.1mg/Tier/Tag und 1mg/Tier/Tag kam es zu keiner Veränderung der Organgewichte (Abb. 23). Bei 17 β -Östradiol kam es bei Applikation der niedrigsten Dosis von 0.1mg/Tier/Tag zu einem signifikanten Ovargewichtsanstieg. Dieser konnte bei erhöhter Dosis (1mg/ Tier/Tag) weiter signifikant gesteigert werden (Abb. 23). Bei Applikation des ER β Agonisten war bei einer Dosis von 0.1mg/Tier/Tag noch kein signifikanter Ovargewichtsanstieg festzustellen. Mit Verabreichung von 1mg/Tier/Tag kam es zu einer signifikanten Steigerung der Ovargewichte im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 23).

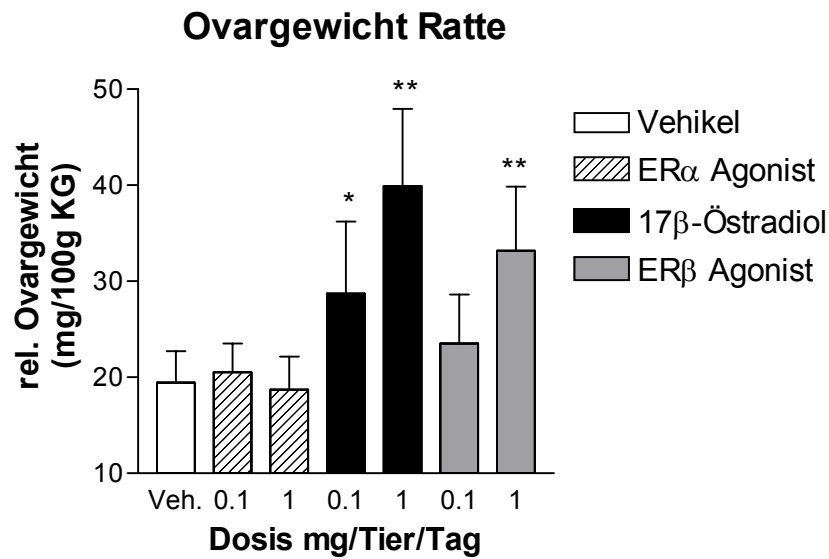


Abb. 23: relatives Ovarfeuchtgewicht in mg/100g Körpergewicht von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol bzw. ER β Agonist für eine Dauer von 4 Tagen (MW $\pm$ SD). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

Maus:

Die Behandlung der Mäuse mit 50 μ g/Tier/Tag Cetorelix + Vehikel stellte die Negativkontrolle dar. Mit 2.35 ± 0.47 mg durchschnittlichem relativen Ovargewicht war diese Gruppe sehr ähnlich der ER α Agonist behandelten Gruppe (2.32 ± 0.3 mg; siehe Abb.24). Zu signifikanter Steigerung des relativen Ovargewichts kam es durch die Behandlung mit 50 μ g/Tier/Tag Cetorelix + 0.3mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. + 0.3mg/Tier/Tag ER β Agonist (Abb.24).

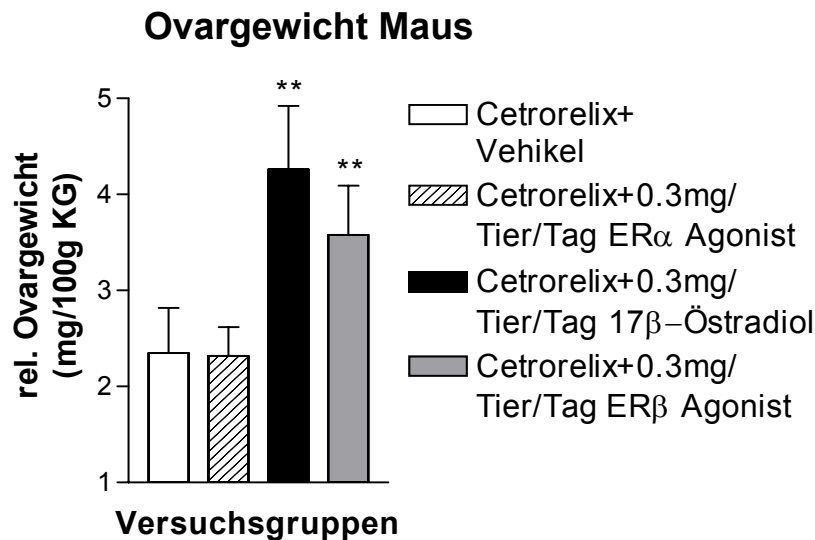


Abb. 24: relatives Ovarfeuchtgewicht in mg/100g Körpergewicht von Mäusen nach subkutaner Applikation von 50 μ g/Tier/Tag Cetorelix (Tag 1-8) und Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol bzw. ER β Agonist von Tag 5-8 (MW $\pm$ SD). ** = $p < 0.01$

1.2 Histologische Befunde

Ziel war es die Follikelanzahl und das Follikelstadium histologisch zu erfassen. Dazu wurden von den Ovarien Serienschritte angefertigt und mit HE gefärbt. Diese Auswertungsmethode ist sehr aufwendig, weshalb die Anzahl der ausgewerteten Tiere und die Gruppen reduziert wurden.

Ratte:

Im Tiermodell der hypophysektomierten immaturen Ratte wurden jeweils drei Tiere pro Versuchsgruppe ausgewertet. Dabei wurden nur die Gruppen berücksichtigt, in der die maximale Dosis von ER α Agonisten (1mg/Tier/Tag), 17 β -Östradiol (1mg/Tier/Tag), und ER β Agonisten (1mg/Tier/Tag) eingesetzt wurde, sowie eine Kontrollgruppe. Auf Grund der niedrigen Tieranzahl wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Ovarien der Vehikelgruppe waren klein und die Follikel in Interstitium eingebettet, welches einen großen Teil des Ovars ausmachte. Der Durchmesser der präantralen und antralen Follikel war in der Regel gering. Mit steigendem Durchmesser zeigten diese Follikel vermehrt Zeichen der Atresie. Durch die Behandlung mit dem ER α Agonisten konnten keine Veränderungen des Follikelwachstums festgestellt werden. Sowohl das morphologische Bild, als auch die Auszählung der Follikel entsprach größtenteils den Daten der Vehikelgruppe (Tab. 2). Ovarien der 17 β -Östradiol behandelte Ratten waren größer und schwerer, als in der Vehikel- und ER α Agonist Gruppe. Außerdem war die Morphologie zu unterscheiden. Das

Interstitium war weitgehend verdrängt von großen präantralen und antralen Follikeln, welche dicht an dicht gruppiert waren. Zeichen der Atresie konnten kaum beobachtet werden. Bei kleineren Follikeln vom Typ 3a/b und 4 wurden keine Unterschiede zur Vehikelgruppe festgestellt. Die Auszählung der präantralen und antralen Follikel bestätigte das morphologische Bild. Die Anzahl dieser Follikel war mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu Vehikeltieren (Tab. 2). Die Verabreichung des ER β Agonisten führte zu einem morphologischen Bild, das den E₂ behandelten Tieren glich. Auch in dieser Gruppe konnten keine Unterschiede in der Anzahl der Typ 3a/b und 4 Follikel zur Vehikelgruppe beobachtet werden. Fast die doppelte Anzahl an präantralen und mehr als doppelt so viele antrale Follikel, wie in der Vehikelgruppe, prägten in diesen Ovarien das Bild (Tab. 2).

Follikel- Beh.-staging gruppen	Typ 3a/b Follikel	Typ 4 Follikel	präantrale Follikel	antrale Follikel
Vehikel	157 $\pm$ 76	56 $\pm$ 22	68 $\pm$ 12	102 $\pm$ 43
ERα Agonist	68 $\pm$ 34	36 $\pm$ 15	83 $\pm$ 36	113 $\pm$ 32
17β-Östradiol	100 $\pm$ 44	28 $\pm$ 6	150 $\pm$ 68	249 $\pm$ 89
ERβ Agonist	125 $\pm$ 42	37 $\pm$ 12	119 $\pm$ 53	215 $\pm$ 16

Tab. 2: Anzahl der Follikel verschiedener Entwicklungsstadien pro Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol bzw. 1mg/Tier/Tag ER β Agonist für 4 Tage (MW $\pm$ SD).

Maus:

Bei GnRH Antagonist behandelten immaturren Mäusen wurden jeweils 5 Tiere aus den Versuchsgruppen (Cetrorelix + Vehikel, Cetrorelix + 0.3mg/Tier/Tag ER α Agonist, 0.3mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 0.3mg/Tier/Tag ER β Agonist) erfasst.

Die Morphologie der Ovarien war vergleichbar mit der der oben beschriebenen Rattenovarien. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen präsentierten sich jedoch deutlich ausgeprägter, was durch die höhere Tieranzahl, auch eine statistische Auswertung zuließ. Die Vehikelgruppe wies eine geringe Anzahl wachsender Follikel jeden Stadiums auf (Abb. 25). Besonders die weiterentwickelten Follikel waren deutlich von Atresie geprägt (Abb. 26). Die Applikation des ER α Agonisten führte nicht zu gesteigertem

Follikelwachstum, da in keiner der untersuchten Follikelstadien. Unterschiede zur Kontrollgruppe zu sehen waren (Abb. 25). Atretische Follikel waren hier meist antralen Reifestadiums und die histologischen Merkmale der Atresie stark ausgeprägt (Abb. 26). Ovarien von 17β -Östradiol behandelten Mäusen wiesen eine erhöhte Anzahl von Follikeln des Typs 3a/b auf, während keine Unterschiede zur Vehikelgruppe bei den Typ 4 Follikeln festgestellt werden konnte. Die Anzahl der präantralen Follikel war mehr als 5fach erhöht, die der antralen Follikel ebenfalls deutlich signifikant, fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe (Abb. 25). Der ER β Agonist führte in den Mäusen zu analogen Ergebnissen, verglichen mit der Wirkung des 17β -Östradiols (Abb. 25). Bei Typ 3a/b Follikeln wurde hier eine signifikant erhöhte Anzahl der Follikel gezählt. In beiden Gruppen konnten Zeichen der Atresie nur sehr vereinzelt gefunden werden (Abb. 26).

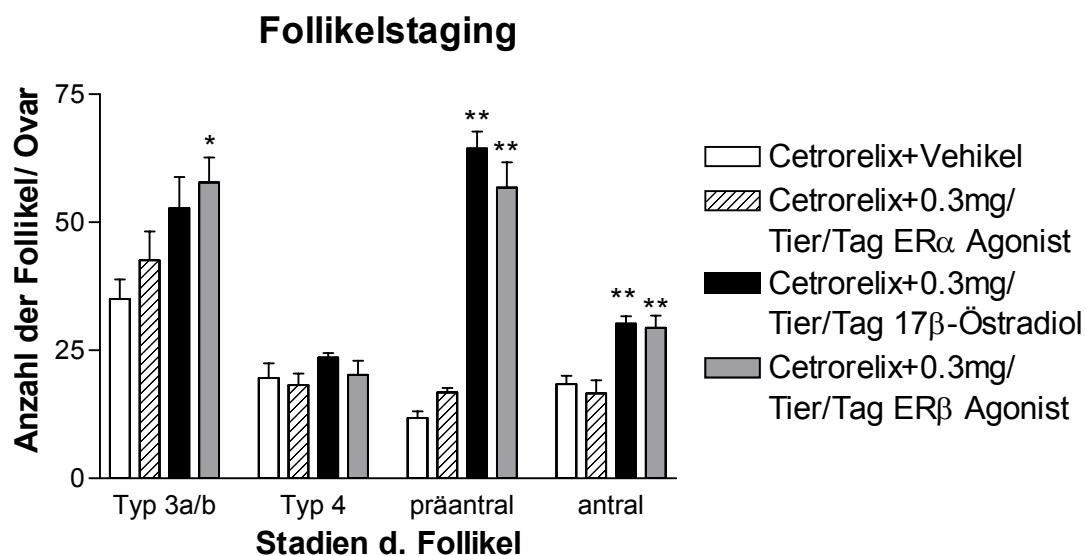


Abb. 25: Anzahl der Follikel verschiedener Entwicklungsstadien pro Ovar von immaturren Mäusen nach Behandlung mit $50\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ Cetorelix (Tag 1-8) und Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17β -Östradiol, bzw. ER β Agonist von Tag 5-8 (MW $\pm$ SD). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

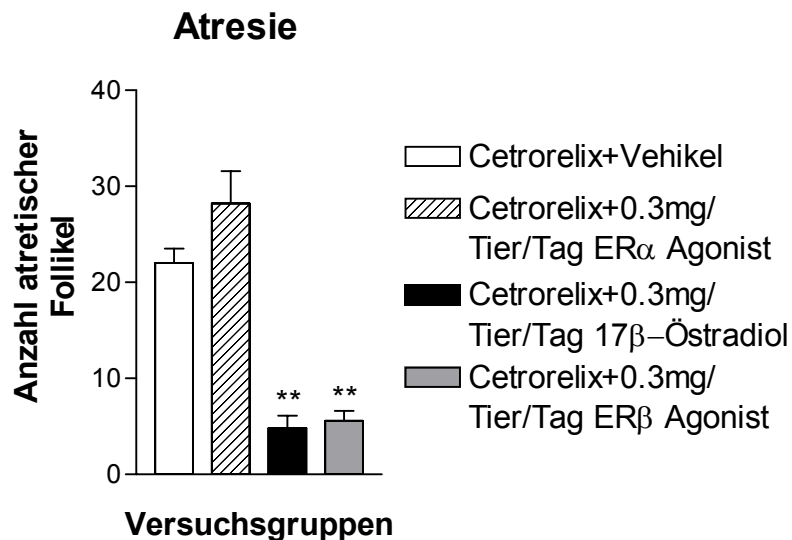


Abb. 26: Anzahl der atretischen Follikel, überwiegend präantralem und antralem Reifestadiums, pro Ovar von immaturren Mäusen nach Behandlung mit 50 μ g/Tier/Tag Cetorelix (Tag 1-8) und Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist von Tag 5-8 (MW $\pm$ SD). ** = $p < 0.01$

1.3 Einfluss auf Proliferation und Apoptose

1.3.1 Untersuchung der Proliferation mit der PCNA Färbung

Untersucht wurden immature hypophysektomierte Ratten (6 Tiere pro Gruppe), die mit folgenden Substanzen behandelt wurden: Vehikel, 0.1 und 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 0.1 und 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. 0.1 und 1mg/Tier/Tag ER β Agonist.

Die Proliferation wurde mit der PCNA Färbung nachgewiesen, die eine positive Immunreaktion in den Nuklei von proliferierenden Zellen erkennen ließ. Die Vehikelgruppe zeigte in allen Follikelstadien eine geringe Anzahl positiv markierter Zellen, deren Intensität der Färbung deutlich positiv war. Kleinere Follikel vom Typ 3a/b, 4 und kleine präantrale Follikel präsentierten sich mit wenigen proliferierenden Granulosazellen und ohne positiv markierte Thekazellen. Bei großen präantralen Follikeln konnten sowohl bei Granulosazellen, als auch bei Thekazellen mehr proliferierende Zellen beobachtet werden, was bei vielen antralen Follikeln nicht mehr der Fall war (Abb. 27A). Vor allem die Zellen atretischer Follikel waren überwiegend unmarkiert. Durch die Applikation des ER α Agonisten (1mg/Tier/Tag) wurde ein der Vehikelgruppe sehr ähnliches Bild beobachtet, welches auch durch wenige intensiv markierte Zellen auffiel (Abb. 27B). 17 β -Östradiol (1mg/Tier/Tag) führte zu einer sehr hohen Anzahl positiv markierter Zellen. Die großen präantralen und antralen Follikel, die in diesen Ovarien dominant sind, bestanden aus stark proliferierenden Granulosa- und Thekazellen und auch die kleineren präantralen Follikel waren in dieser Gruppe stark proliferativ (Abb. 27C). Der ER β Agonist (1mg/Tier/Tag) führte ebenso wie

17 β -Östradiol zu einer hohen Anzahl stark proliferierender Zellen, dessen Ausprägung der Beschreibung der 17 β -Östradiolgruppe entsprach (Abb. 27D). 0.1mg/Tier/Tag der applizierten Testsubstanzen führte zu einem ähnlichen Expressionsmuster wie bei der höheren Dosis, jedoch in der Differenz zwischen den verschiedenen Gruppen nicht so ausgeprägt. In Abbildung 28 wird der Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und der Dosisänderung veranschaulicht.

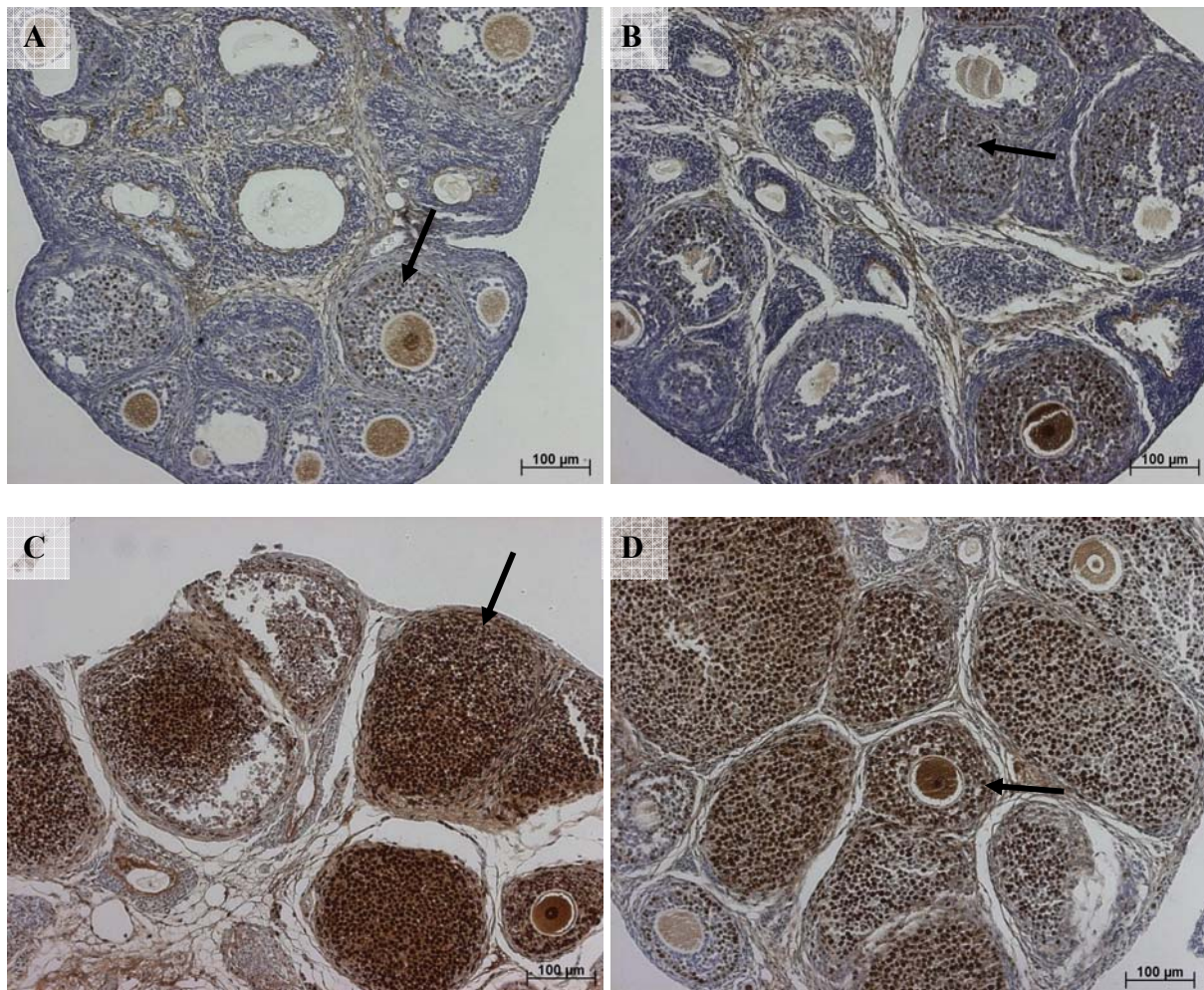


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol und D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist für 4 Tage.

Die Pfeile zeigen auf braune, positiv markierte Granulosazellen.

Semiquantitativ ausgewertet zeigen die Vehikelgruppe und die Gruppe der ER α Agonist behandelten Tiere eine leichte bis deutliche immunhistochemische Markierung (Abb. 28). Eine hohe Intensität, jedoch eine geringe Anzahl positiv markierter Zellen fiel bei der Auswertung auf. Bei Ratten, die mit 17 β -Östradiol behandelt wurden, war sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl der positiv markierten Zellen maximal, was zu einer maximalen Bewertung führte. Der ER β Agonist war in seiner Wirkung auf die Proliferation

im Ovar dem E₂ sehr ähnlich, eine nicht ganz so homogene Ausprägung des PCNA Nachweises in der Behandlungsgruppe führte zu einem etwas niedrigeren Färbescore.

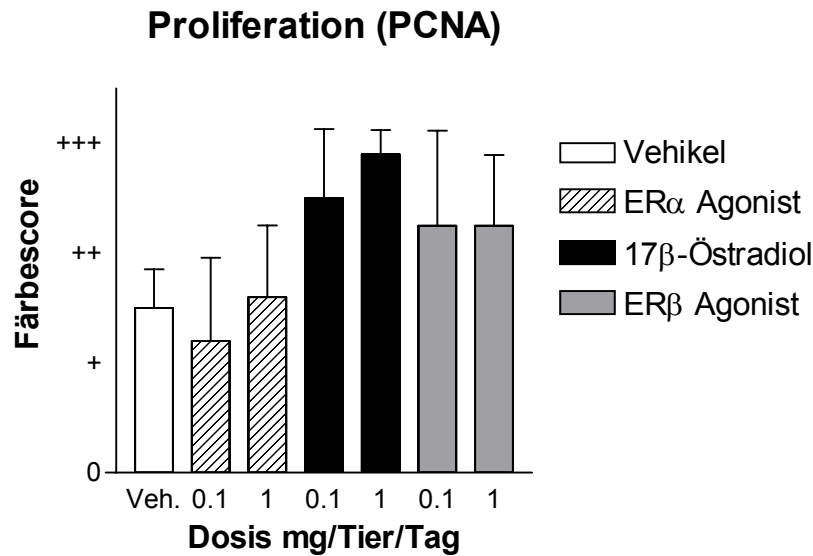


Abb. 28: semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von PCNA im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol und ER β Agonist für eine Dauer von 4 Tagen (MW $\pm$ SD).

0 (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark)

1.3.2 Untersuchung der Apoptose mit der TUNEL Färbung

Untersucht wurden jeweils 6 immature hypophysektomierte Ratten der Behandlungsgruppen Vehikel, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag ER β Agonist.

Die Vehikelgruppe ist durch eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen gekennzeichnet. Eine positive Markierung ist in den Granulosazellen von kleinen und großen präantralen Follikeln, sowie in antralen Follikeln zu finden (Abb. 29A). Follikel die seit längerer Zeit apoptotisch sind und auch schon morphologische Veränderungen zeigen, sogenannte apoptotische Überbleibsel („apoptotic remnants“), sind sehr stark angefärbt, da diese Strukturen weitgehend aus Zellfragmenten bestehen. Auch in der ER α Agonist behandelten Gruppe waren die Granulosazellen von vielen Follikeln apoptotisch. Wie in der Kontrollgruppe waren auch hier die Zellen reiferer Follikel, d.h. mindestens im Stadium präantraler Follikel, betroffen (Abb. 29B). Die Applikation von 17 β -Östradiol führte zu einer geringeren Anzahl apoptotischer Zellen im gesamten Schnitt. Follikel jeden Stadiums, aber vor allem große präantrale und antrale Follikel wiesen nur sehr vereinzelt apoptotische Zellen auf. Selten wurden defekte Follikel mit vielen apoptotischen Zellen beobachtet. „Apoptotic remnants“ von früher zugrunde gegangenen Follikeln konnten auch hier gefunden werden. Sie waren wie

in der Kontrollgruppe stark angefärbt (Abb. 29C). Eine positive Reaktion wurde bei ER β Agonist behandelten Ratten noch vereinzelter gefunden. Bis auf apoptotische Residuen, die auch hier positiv markiert waren, konnten in den betrachteten Gewebeschnitten kaum apoptotische Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29D).

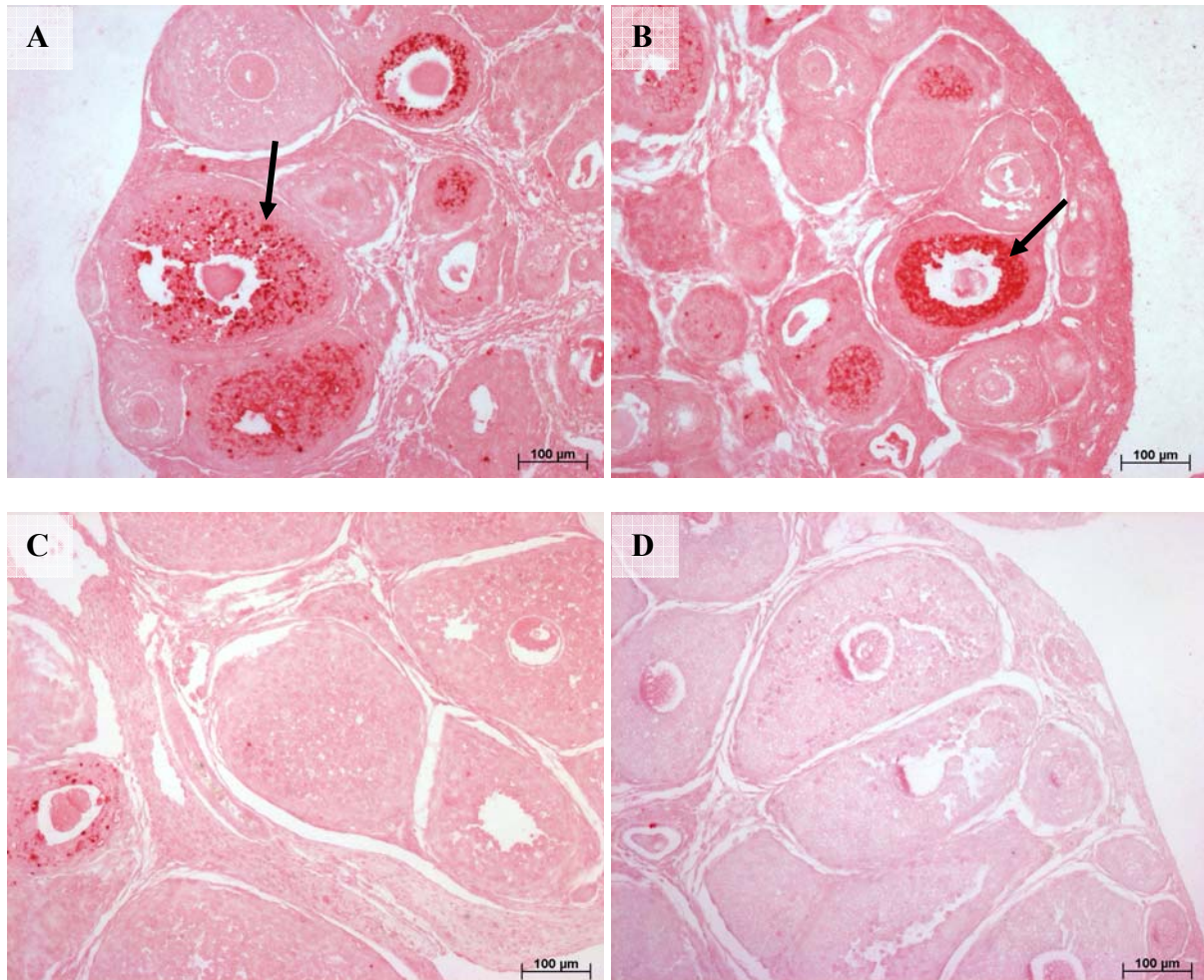


Abb. 29: Nachweis von apoptotischen Zellen mit Hilfe der TUNEL Färbung im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tag 17-Östradiol und D) 1mg/Tag ER β Agonist für 4 Tage.

Der Pfeil zeigt auf rote, positiv markierte, apoptotische Zellen.

Die Beurteilung der Gewebeschnitte mit dem Färbescore führte bei Vehikel behandelten Ratten zu einem maximalen Wert. Sowohl die Anzahl der apoptotischen Zellen insgesamt, als auch die Anzahl atretischer Follikel waren sehr hoch. Durch die Behandlung mit dem ER α Agonisten konnte kein von der Kontrollgruppe abweichendes Ergebnis erreicht werden. Die Bewertung dieser Gruppe unterschied sich daher nicht von der Kontrollgruppe (Abb. 30). In den 17 β -Östradiol behandelten Tieren wurde ein eindeutig geringeres Apoptosevorkommen festgestellt. In die Bewertung eingeschlossen wurden auch die „apoptotic remnants“. Auch in

der Gruppe der ER β Agonist behandelten Ratten wurden eindeutig weniger Apoptosen nachgewiesen als in der Kontrollgruppe (Abb. 30).

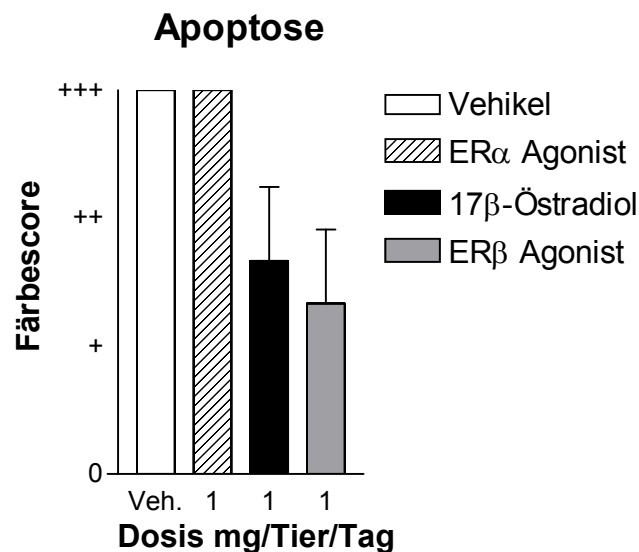


Abb. 30: semiquantitative Auswertung der TUNEL Färbung zum Nachweis von apoptotischen Zellen im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol und ER β Agonist für eine Dauer von 4 Tagen (MW $\pm$ SD).

0 (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark)

1.4 Einfluss auf Östrogenrezeptoren (ER)

1.4.1 Einfluss auf die Expression des Östrogenrezeptor α (ER α)

Die ER α Färbung liefert ein wechselhaftes Bild der Proteinexpression dieses Rezeptors. Untersucht wurde das Vorkommen des ER α in den verschiedenen Zelltypen des Ovars immaturren hypophysektomierter Ratten. Alle Tiere (n=6) folgender Behandlungsgruppen wurden ausgewertet: Vehikel, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag ER β Agonist. Zellen des Interstitiums zeigten keine positive Immunreaktion, während Thekazellen und Granulosazellen den ER α je nach Behandlungsart unterschiedlich exprimierten.

In der Vehikelgruppe fiel ein positiv markierter Ring an Thekazellen um reifere Follikel auf, der eine starke Expression in diesen Zellen signalisierte. Kleinere Follikel hatten in der Regel noch keine ausgebildete Schicht Thekazellen, weshalb eine positive Immunreaktion bei diesen Follikeln ausblieb. Granulosazellen waren bei Tieren dieser Gruppe immunhistochemisch nicht markiert (Abb. 31A). Die Applikation des ER α Agonisten führte dazu, dass in den Ovarien dieser Tiere kein ER α exprimiert wurde. Weder in Theka- noch in Granulosazellen

wurde eine positive Immunreaktion hervorgerufen (Abb. 31B). In der Gruppe 17 β -Östradiol behandelter Ratten wurde keine Markierung der Thekazellen beobachtet. Vereinzelt oozytennahe Granulosazellen exprimierten den ER α (Abb. 31C). In der Gruppe der ER β Agonist behandelten Ratten konnten positiv markierte Thekazellen erfasst werden, die allerdings in ihrer Expression des ER α nicht so intensitätsreich und zahlreich gekennzeichnet waren wie in der Vehikelgruppe. Bei den Granulosazellen wurden, wie schon in der 17 β -Östradiol Gruppe, vereinzelt ER α exprimierende Zellen gesehen, die in ihrer Intensität deutlich markiert waren (Abb.31D).

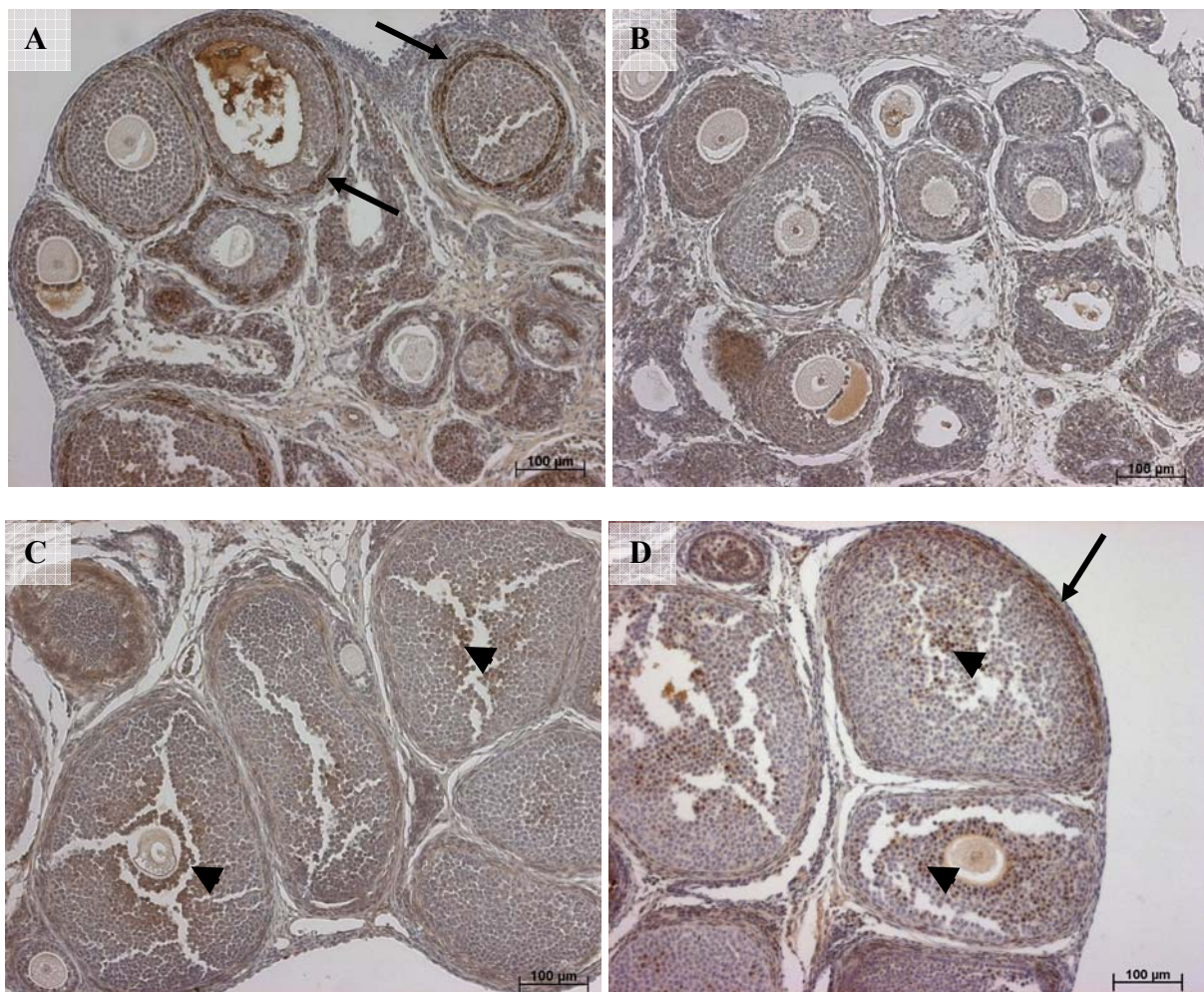


Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis von ER α in Thekazellen (Pfeile) und Granulosazellen (Pfeilspitzen) im Ovar von immaturren hypophysectomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist für 4 Tage.

Beurteilt wurden die Behandlungsgruppen semiquantitativ nach den Zelltypen. In der Vehikelgruppe waren die Thekazellen eindeutig maximal markiert, während die Granulosazellen keine positive Immunreaktion zeigten (Abb. 32). Die Behandlung mit ER α Agonisten ließ kaum eine positive Markierung des untersuchten Rezeptors in den beiden

Zelltypen erkennen (Abb. 32). Die 17β -Östradiolgruppe exprimierte den $ER\alpha$ in den Thekazellen nicht und leicht bis deutlich in Granulosazellen. Interessanter Weise führte die Applikation des $ER\beta$ Agonisten sowohl in Theka-, als auch Granulosazellen zu einer mäßig ausgeprägten Expression des $ER\alpha$ (Abb. 32).

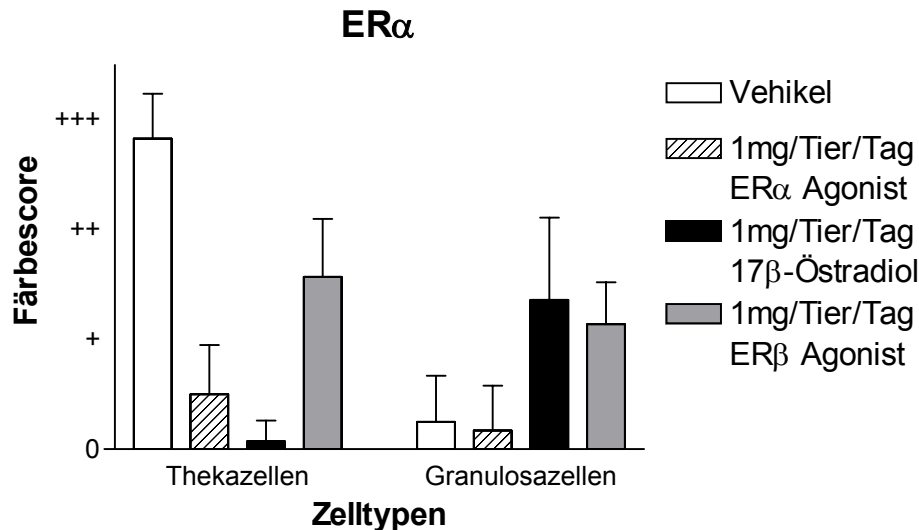


Abb. 32: Semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von $ER\alpha$ in Thekazellen und Granulosazellen im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten. Die Tiere wurden 4 Tage lang subkutan mit Vehikelsubstanz, $ER\alpha$ Agonist, 17β -Östradiol und $ER\beta$ Agonist behandelt (MW $\pm$ SD).

Färbescore: 0 (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark)

1.4.2 Einfluss auf die Expression des Östrogenrezeptor β ($ER\beta$)

Untersucht wurde die Expression des $ER\beta$ im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten. Alle Tiere (n=6) folgender Behandlungsgruppen wurden ausgewertet: Vehikel, 1mg/Tier/Tag $ER\alpha$ Agonist, 1mg/Tier/Tag 17β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag $ER\beta$ Agonist.

Der $ER\beta$ wurde hauptsächlich in Granulosazellen exprimiert und nur vereinzelt in Thekazellen nachgewiesen. Follikel jeden Stadiums exprimierten den Rezeptor in gleicher Ausprägung. Atretische Follikel zeigten eine stark verminderte bis negative Immunreaktion. In der Vehikelgruppe waren vorwiegend kleinere Follikel immunologisch markiert. Der Radius präantraler und antraler Follikel, die den $ER\beta$ exprimierten war in der Regel recht klein. Follikel mit einem großen Radius waren oft atretisch und wie das Stroma, welches einen großen Teil des Organs ausmachte nicht markiert (Abb. 33A). Durch die Applikation des $ER\alpha$ Agonisten stellte sich ein der Kontrollgruppe ähnliches Ovar dar, in welchem ebenfalls Stroma und atretische Follikel große Teile des Organs ausmachten. Die Granulosazellen intakter Follikel jeden Stadiums exprimierten den $ER\beta$. Dabei war die

Intensität der Anfärbung höher als in der Vehikelgruppe (Abb. 33B). Zahlreich vorhandene große Follikel deren Granulosazellen stark angefärbt waren, prägten das Bild der Ovarien 17 β -Östradiol behandelter Tiere. Auch positiv markierte Thekazellen konnten bei weit entwickelten Follikeln vereinzelt beobachtet werden. Follikel jeden Entwicklungsstadiums exprimierten den Rezeptor stark (Abb. 33C). Das Stroma war weitgehend von den Follikeln verdrängt und atretische Follikel wurden ausgesprochen selten beobachtet. Der ER β Agonist führte, ebenso wie 17 β -Östradiol, zu einer hohen Anzahl stark ER β exprimierender Zellen, dessen Ausprägung dieser Färbung der Beschreibung der 17 β -Östradiolgruppe entspricht (Abb. 33D).

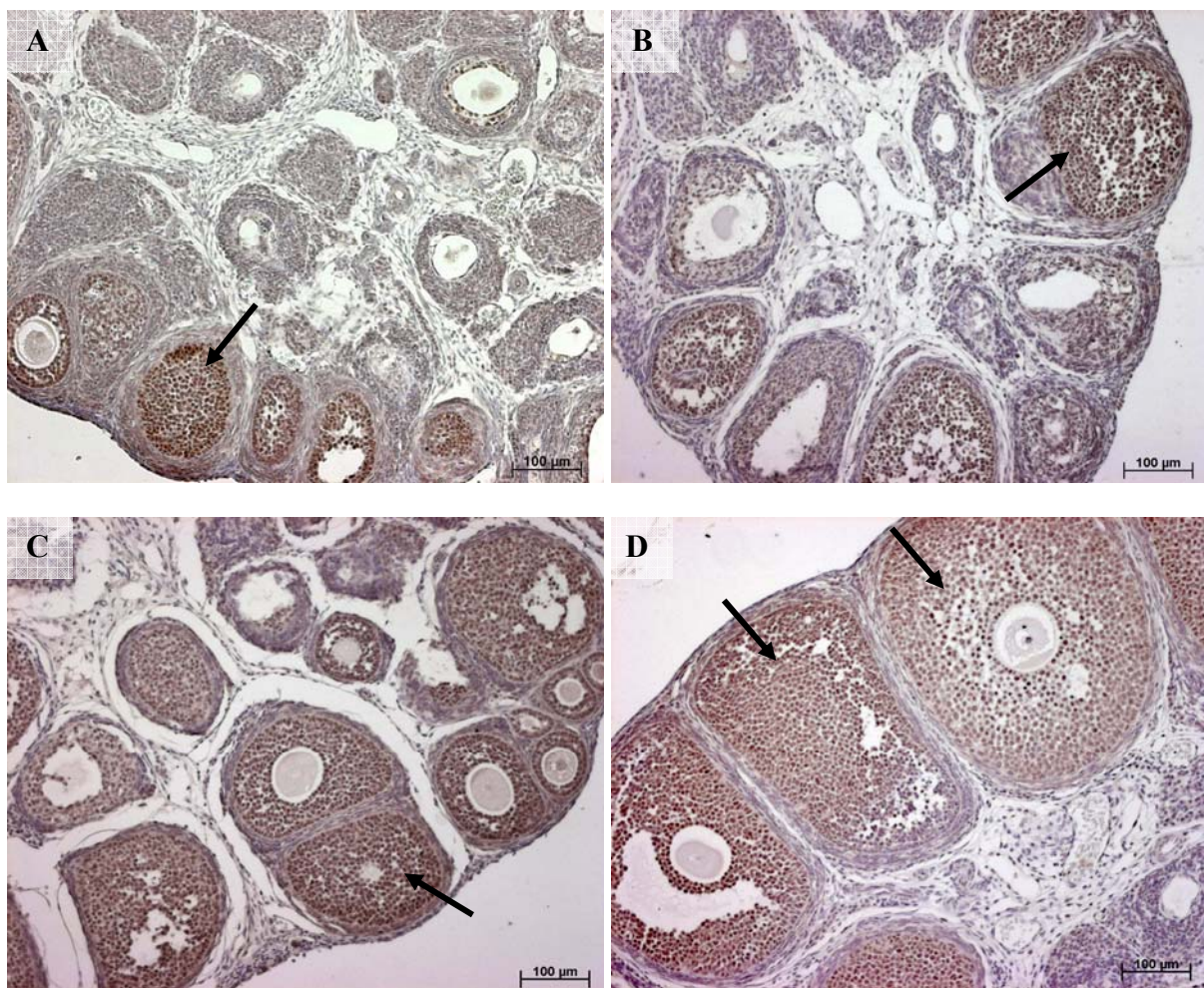


Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis von ER β im Ovar von immaturren hypophysectomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist für 4 Tage.

Die Pfeile markieren braune, positiv markierte Granulosazellen

In der semiquantitativen Beurteilung wurde die Vehikelgruppe mit einer deutlichen bis geringen Markierung klassifiziert (Abb. 34). Dabei wurde in die Bewertung mit einbezogen,

dass die angefärbten Follikel dieser Gruppen zwar seltener und nicht dicht an dicht gelagert zu finden waren, aber dennoch die Intensität der Färbung eine eindeutige Immunreaktion signalisierte. ER α Agonist behandelte Tiere wiesen größere Abweichungen innerhalb der Gruppe auf und die Intensität der Färbung war höher als in der Vehikelgruppe (Abb. 33). Eine maximale Immunreaktion war in den Ovarien der 17 β -Östradiolgruppe zu beobachten. Sämtliche Tiere der Behandlungsgruppe exprimierten den Rezeptor stark. Sowohl die Intensität, als auch die Homogenität der positiven Immunreaktion führten zu der maximalen Bewertung im Färbescore. Entsprechendes war auch durch die Behandlung mit dem ER β Agonisten zu beobachten, die Bewertung fiel gleichermaßen aus (Abb. 33).

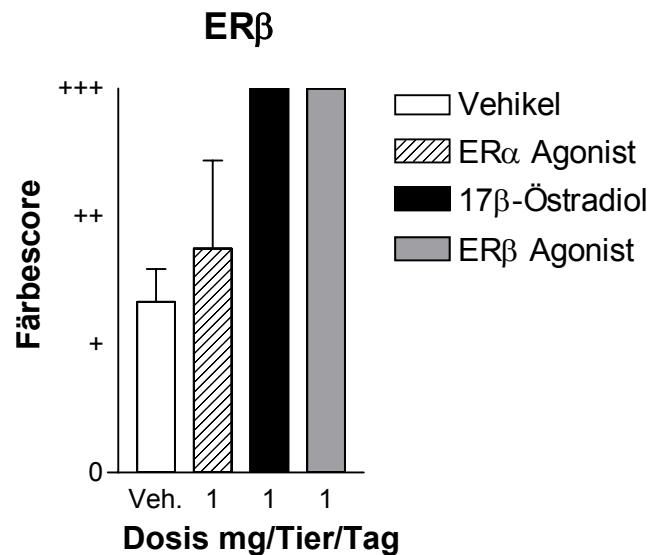


Abb. 33: semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von ER β im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten. Die Tiere wurden 4 Tage lang subkutan mit Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist behandelt (MW $\pm$ SD).

Färbescore: 0 (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark)

1.5 Einfluss auf Granulosazellmarker

1.5.1 Einfluss auf die Expression von Inhibin α Untereinheit

Für diesen immunhistochemischen Nachweis wurden jeweils drei Tiere der folgenden Behandlungsgruppen untersucht: Vehikel, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag ER β Agonist.

Die Inhibin α -Untereinheit wird im Zytosol von Granulosazellen der größeren Follikel (große präantrale und antrale Follikel) nachgewiesen. Kleinere Follikel des Typus 3a/b, 4, kleine präantrale, sowie atretische Follikel waren nicht oder nur schwach angefärbt. Thekazellen und Zellen des Stromas waren in den Ovarien nicht markiert.

In der Vehikelgruppe konnte nur eine schwache immunologische Reaktion beobachtet werden, da nur wenige weit entwickelte Follikel in den Ovarien gefunden werden konnten und sowohl die Anzahl der positiv markierten Granulosazellen, als auch die Intensität der Färbung niedrig war (Abb. 34A). Die Applikation des ER α Agonisten bewirkte eine höhere Intensität und größere Anzahl positiv markierter Follikel. Dennoch war in diesen Organen die Anzahl der atretischen Follikel und das Stroma ausgeprägt, sodass diverse Bereiche des Ovars negativ gefärbt blieben (Abb. 34B). 17 β -Östradiol behandelte Ratten zeigten viele große präantrale und antrale Follikel mit einer hohen Anzahl stark markierter Granulosazellen. Die dicht gepackten Follikel wurden durch den nicht angefärbten Ring Thekazellen voneinander abgegrenzt, das Stroma war weitgehend verdrängt (Abb. 34C). Die Immunreaktion der ER β Agonist Gruppe war mit der 17 β -Östradiolgruppe gleich (Abb. 34D).

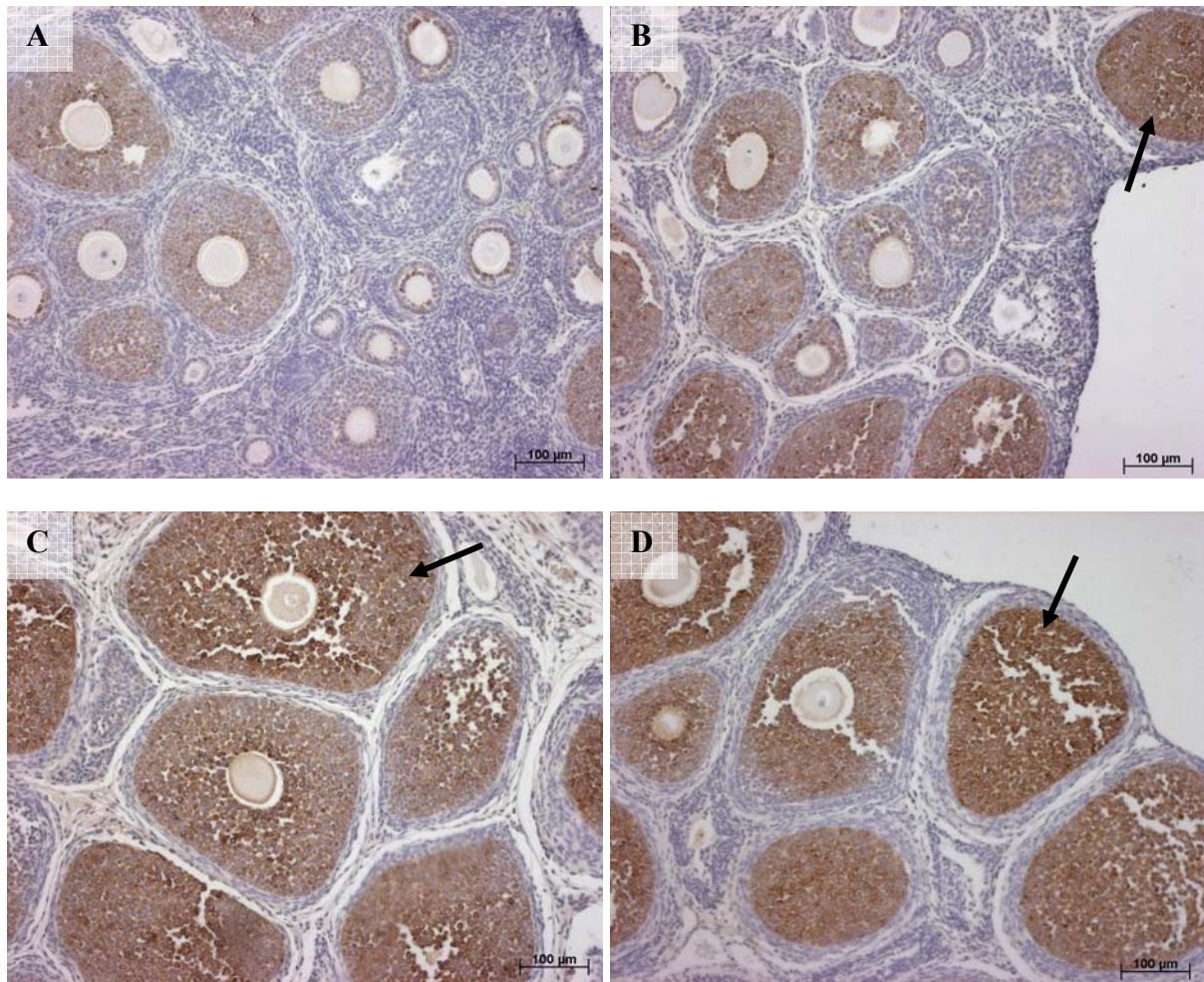


Abb. 34: Immunhistochemischer Nachweis von Inhibin α Untereinheit im Ovar von immaturren hypophysectomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist für 4 Tage.

Die Pfeile markieren braune, positiv markierte Granulosazellen.

Bei der semiquantitativen Auswertung führte die geringe Anzahl positiv markierter Zellen und niedrige Färbintensität in der Vehikelgruppe zu einem geringen Färbescore. Die Gruppe der ER α behandelten Tiere unterschied sich von dieser Gruppe durch eine erhöhte Anzahl angefärbter Follikel und etwas höhere Intensität (Abb. 35). Die hohe Expression der Inhibin α Untereinheit in vielen Follikeln der 17 β -Östradiol behandelten Ratten führte zu einer fast durchgehend maximalen Beurteilung, was auch auf die Gruppe der ER β behandelten Tiere zutraf (Abb. 35).

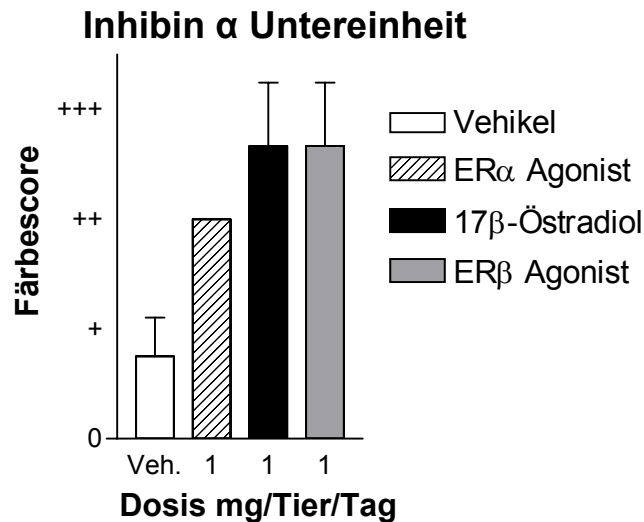


Abb. 35: semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von Inhibin α Untereinheit im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten. Die Tiere wurden 4 Tage lang subkutan mit Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist behandelt (MW $\pm$ SD).

Färbescore: 0 (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark)

1.5.2 Einfluss auf die Expression von Anti-Müllerian Hormon (AMH)

Die AMH Expression wurde im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten untersucht. Dabei wurden jeweils 3 Tiere pro Behandlungsgruppe (Vehikel, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag ER β Agonist) ausgewertet.

AMH konnte im Zytosol von Granulosazellen nachgewiesen werden. Dabei waren die Zellen kleinerer Follikel (Typ 3a/b, Typ 4 und kleine präantrale Follikel) mit einer hohen Intensität gefärbt und große präantrale und antrale Follikel mit zunehmendem Radius schwächer markiert. Keine immunologische Reaktion zeigten Thekazellen, das Stroma und atretische Follikel.

In der Vehikelgruppe dominierten kleine, mit höchster Intensität angefärbte Follikel das Bild. Ungefärbtes Stroma und atretische Follikel bildeten einen Kontrast zu den stark markierten Granulosazellen. Nur wenige weit entwickelte präantrale oder antrale Follikel konnten gefunden werden, die sich wiederum nur schwach angefärbt präsentierten (Abb. 36A). Auch durch die Applikation des ER α Agonisten überwogen maximal angefärbte, kleinere Follikel (Typ3a/b, Typ 4, bis zu präantralen Follikel) (Abb. 36B). Große präantrale und antrale Follikel waren selten und wie in der Kontrollgruppe in niedriger Intensität markiert. Stark positiv angefärbte kleine Follikel fanden sich auch in den Ovarien der mit 17 β -Östradiol behandelten Tiere, hier jedoch neben vielen negativ bis leicht positiv markierten großen präantralen und antralen Follikeln, die das Volumen des Ovars überwiegend ausmachten

(Abb. 36C). Dieses Muster wurde auch nach Applikation des ER β Agonisten gesehen. Es bot sich ein Bild, geprägt von großen präantralen und antralen Follikeln, die kaum AMH exprimierten (Abb. 36D) und kleineren stark angefärbten Follikel, wie sie in der 17 β -Östradiol Gruppe zu finden waren.

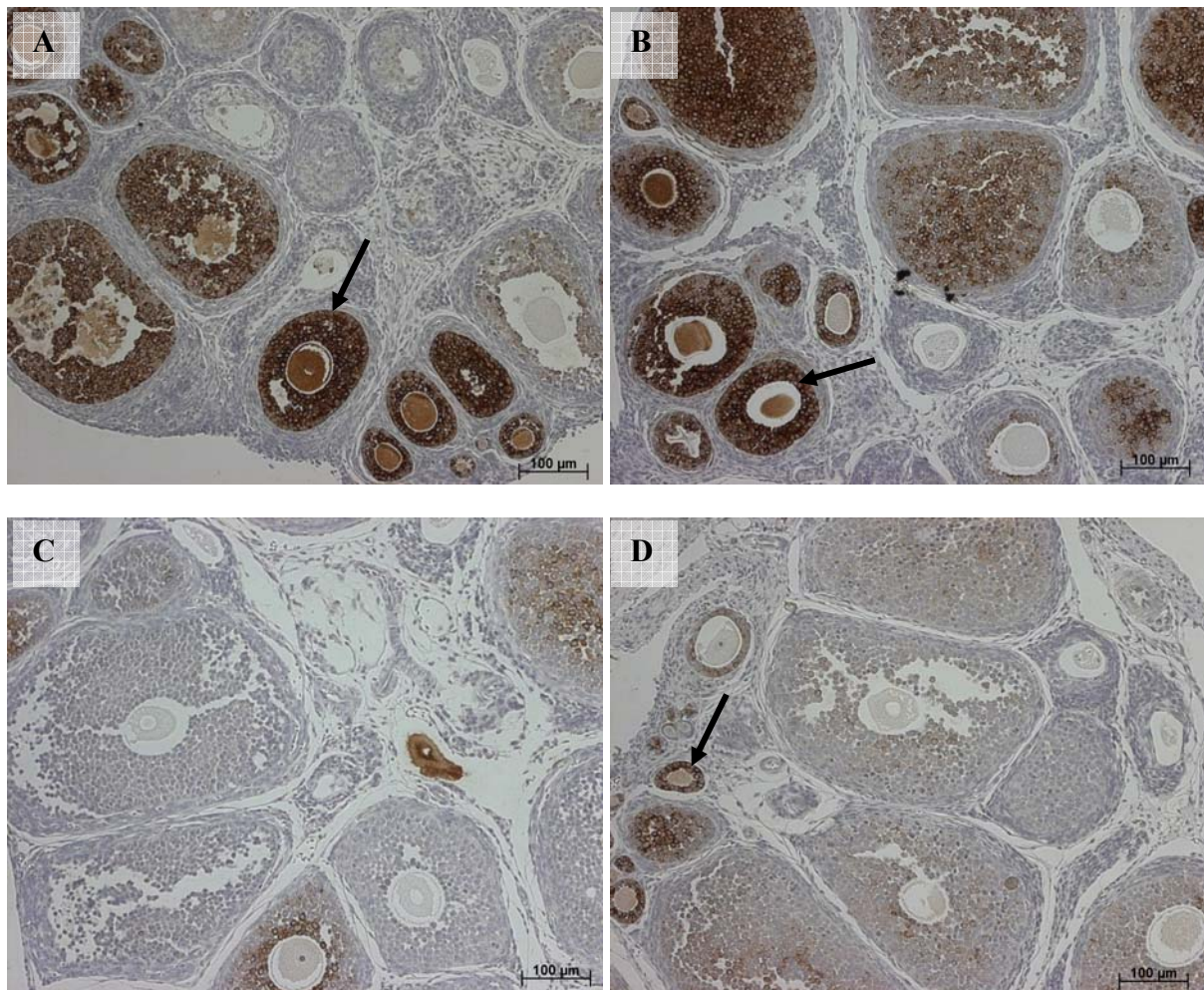


Abb. 36: Immunhistochemischer Nachweis von Anti-Müllerian Hormone im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist.

Die Pfeile zeigen auf braune, positiv markierte Granulosazellen.

Die unterschiedliche Morphologie der jeweiligen Ovarien ist also richtungsweisend für das Expressionsmuster. Dennoch differiert das Ergebnis der semiquantitativen Auswertung durch ein vergleichbar hohes Vorkommen kleinerer positiv markierter Follikel nur geringfügig.

Bei Beurteilung der Vehikelgruppe nach dem Färbescore konnte beobachtet werden, dass der AMH Antikörper die Granulosazellen durchgehend stark positiv markierte. Hier wurden zahlreiche Follikel des Entwicklungsstadiums 3a/b, 4 und kleine präantrale in maximaler Intensität erfasst. Der ER α Agonist führte ebenso zu maximaler Expression des AMH, in

analoger Verteilung in den Follikeln (Abb. 37). In 17 β -Östradiol behandelten Tieren differierte das Ergebnis der semiquantitativen Auswertung von der Deskription der Gewebe, denn obwohl nicht markierte große Follikel in diesen Ovarien dominant waren und eindeutig das Bild bestimmten, waren auch kleinere stark markierte Follikel vorhanden. Der Gesamteindruck wurde in der semiquantitativen Auswertung mit „deutlich“ bewertet. Die Gruppe der ER β Agonist behandelten Tiere erbrachte ein analoges Bild der Follikel zur 17 β -Östradiolgruppe (Abb. 37). Die einzelnen Ergebnisse der Ovarien waren hier mannigfaltiger, was auf größere Unterschiede in der Anzahl kleinerer Follikel zurückzuführen ist.

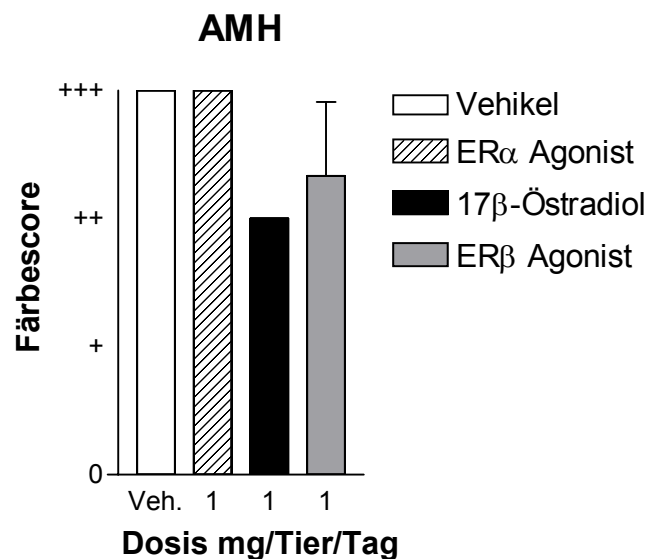


Abb. 37: semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von AMH im Ovar von immaturren hypophysectomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist für 4 Tage (MW $\pm$ SD).

Färbescore: 0 (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark)

1.6 In situ Hybridisierung

1.6.1 Expression von zytoplasmatischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II)

Die Expression von zytoplasmatischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II) wurde in den Ovarien von jeweils 3 Tieren der Behandlungsgruppen (Vehikel, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag ER β Agonist) untersucht.

Ein positiver Nachweis dieses Proteins konnte in den Granulosazellen gefunden werden, während Thekazellen und das Stroma nicht markiert wurden. Atretische Follikel exprimierten das Protein nicht und waren in der Gruppe der Vehikel behandelten Tiere häufig zu finden. Positiv markierte Follikel konnten in dieser Gruppe nur sehr vereinzelt gefunden werden,

waren jedoch in der Intensität der Markierung stark (Abb. 38A). Durch die Applikation des ER α Agonisten wurde das CRABP II in deutlich mehr Follikeln nachgewiesen, als in der Vehikelgruppe. Die Intensität der Färbung war hier allerdings inhomogen und differierte von Follikel zu Follikel stark. Unterschiede der Expression in verschiedenen Reifestadien der Follikel konnten nicht beobachtet werden (Abb. 38B). Eine auffällig starke und überwiegend alle Follikel betreffende Expression des CRABP II wurde in Tieren nachgewiesen, die mit 17 β -Östradiol behandelt wurden (Abb. 38C). Auch die mit ER β Agonist behandelten Ratten zeigten ein der 17 β -Östradiolgruppe vergleichbares Bild, bestehend aus großen dicht gepackten Follikeln, die stark positiv markiert waren. Eine positive Immunreaktion zeigten auch die Granulosazellen weniger weit entwickelter Follikel (Abb. 38D).

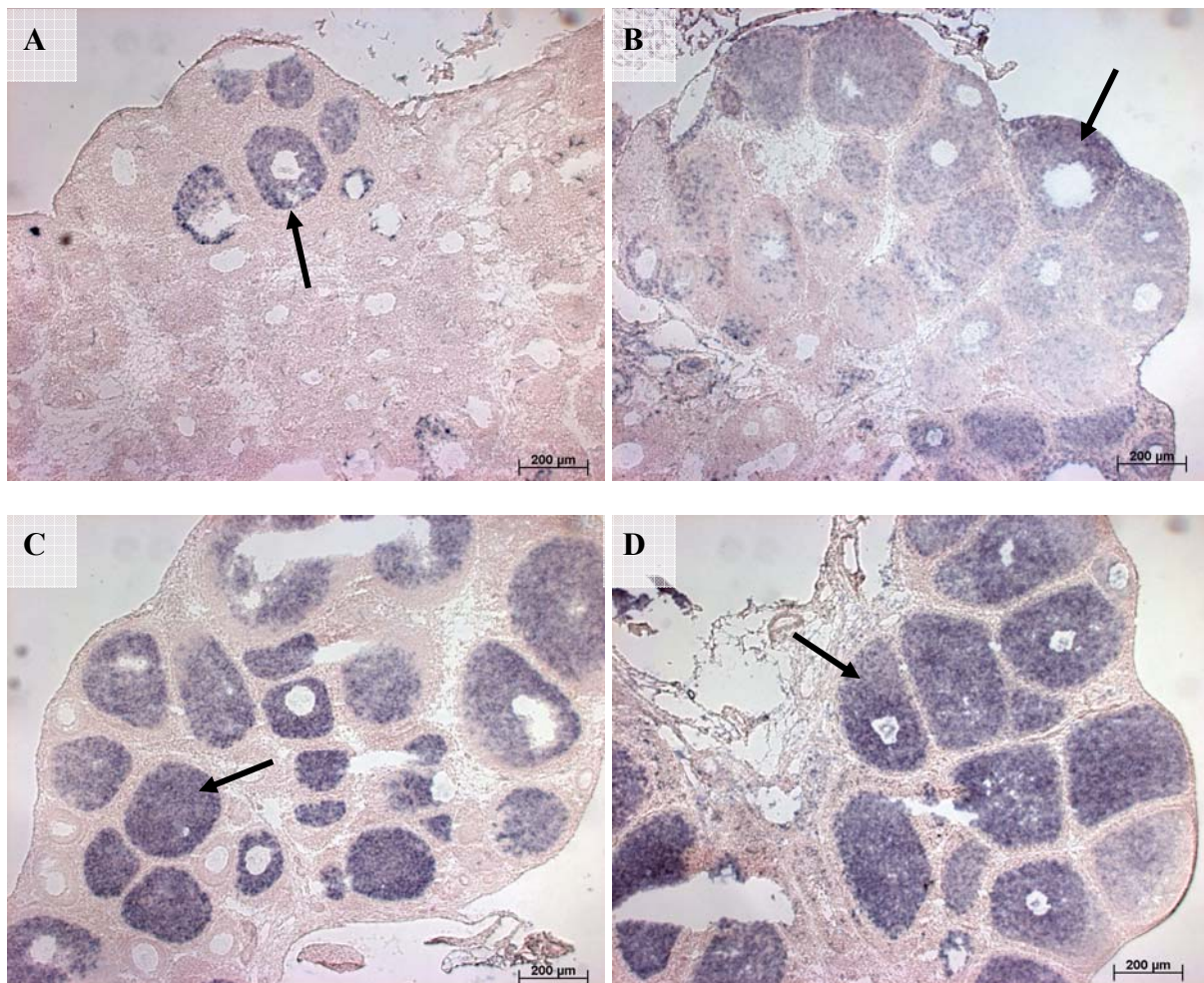


Abb. 38: Molekularbiologischer Nachweis von zytoplasmatischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II) mit Hilfe der in situ Hybridisierung im Ovar von immaturren hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist.

Die Pfeile zeigen auf positiv markierte Granulosazellen.

1.6.2 Expression von Prostazyklin Synthase (PGIS)

Jeweils 3 Tiere der Behandlungsgruppen Vehikel, 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, 1mg/Tier/Tag ER β Agonist wurden auf die Expression von PGIS untersucht.

Nachgewiesen werden konnte dieses Enzym in den Granulosazellen von Follikeln jeden Reifestadiums. Andere Gewebe, wie Thekazellen und Stroma zeigten keine positive Reaktion, wie auch atretische Follikel gering bis nicht angefärbt waren. In der Vehikelgruppe waren intakte Follikel jeder Größe, aber hauptsächlich kleinere Follikel (Typ 3a/b, 4, kleine präantrale) positiv markiert. Dabei war die Intensität der Färbung einheitlich deutlich (Abb. 39A). Alle eingesetzten Testsubstanzen, d.h. ER α Agonist, 17 β -Östradiol oder ER β Agonist zeigten gleiche Ergebnisse. So konnte in keiner der Gruppen eine Anfärbung von Follikeln beobachtet werden. Nur selten wurden positiv markierte Follikel gefunden, die dann eine niedrige Färbeintensität aufwiesen (Abb. 39 B, C und D)

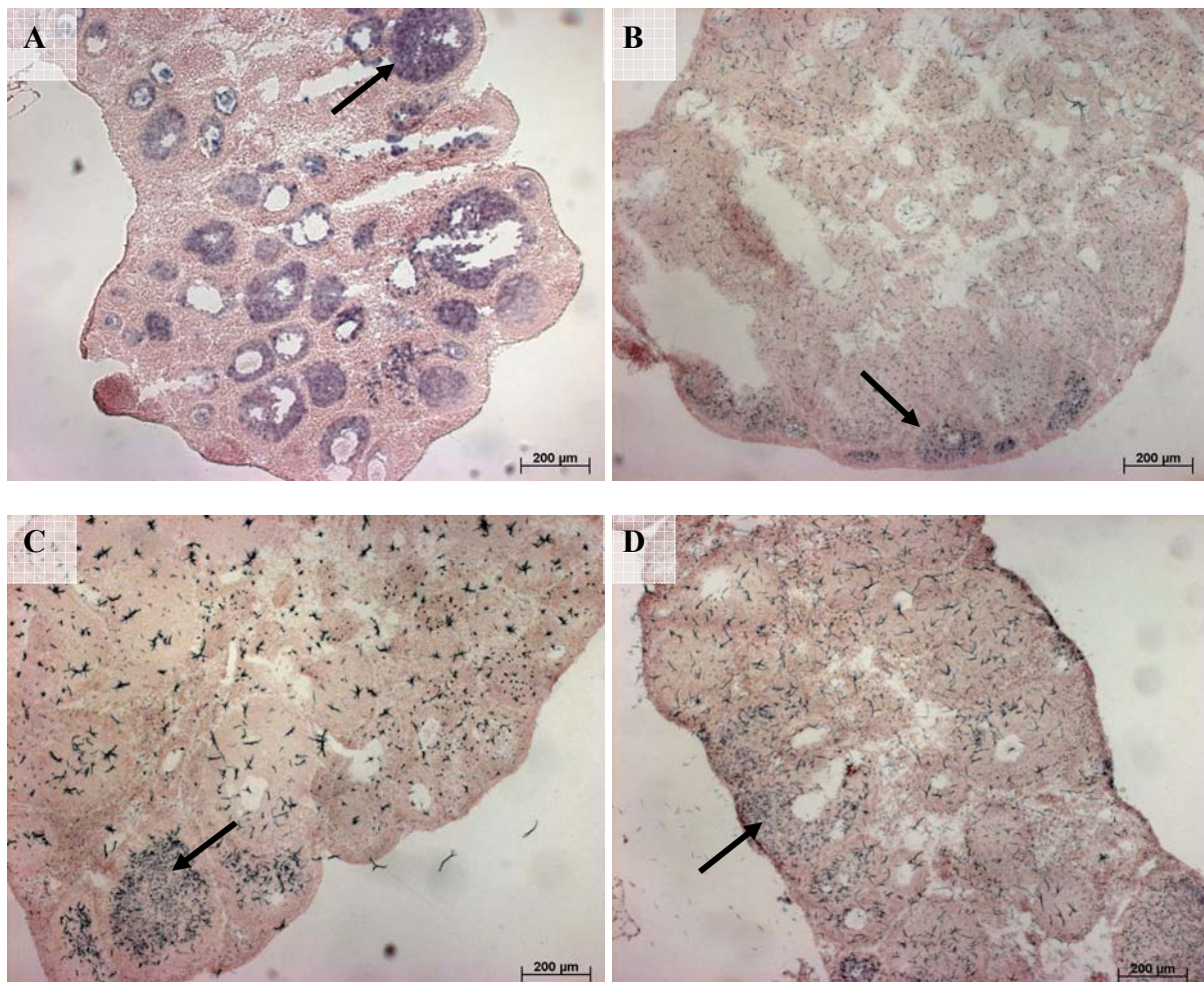


Abb. 39: Molekularbiologischer Nachweis von Prostazyklin Synthase mit Hilfe der in situ Hybridisierung im Ovar von immaturen hypophysektomierten Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 1mg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 1mg/Tier/Tag 17 β -Östradiol, bzw. D) 1mg/Tier/Tag ER β Agonist.

Die Pfeile markieren positiv markierte Granulosazellen.

2 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf den Uterus von ovariectomierten Ratten

Als Zeichen von Östrogenität wurden im Uterus die Wirkungen von ER α und ER β Agonisten auf das Organgewicht und die Höhe des Endometriumepithels untersucht. Zudem wurde immunhistochemisch der Nachweis von Proliferationsmarker Ki-67, Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) durchgeführt. Im verwendeten Tiermodell wurden adulte Ratten ovariectomiert und nach mindestens 10 Tagen mit den Substanzen für 3 Tage behandelt. Eine Behandlungsgruppe bestand aus 5 Tieren, die mit den folgenden Dosierungen behandelt wurden: Vehikel, 0.02, 0.2, 2 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ ER α Agonist, 0.02, 0.2, 2 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ 17 β -Östradiol, 0.06, 0.6, 6 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ ER β Agonist.

2.1 Einfluss auf das Uterusgewicht

Das mittlere Gewicht von Uteri der mit Vehikel behandelten Tiere lag bei $26.90 \pm 1.50 \text{ mg}/100 \text{ g KG}$.

Das relative Uterusfeuchtgewicht stieg durch die Behandlung mit dem ER α Agonisten dosisabhängig signifikant an. Bei einer Dosis von 0.02 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ war zunächst kein Unterschied zwischen dieser und der Vehikelgruppe gemessen worden. Bei der Dosis von 0.2 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ war der Gewichtsanstieg dann signifikant, was bei der Dosis von 2 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ noch deutlicher wurde (Abb. 40). 17 β -Östradiol behandelte Ratten verzeichneten einen ähnlichen Gewichtsanstieg der Uteri, wie nach Behandlung mit ER α Agonist. In der niedrigsten Dosierung konnte im Vergleich mit der Vehikelgruppe kein Anstieg beobachtet werden. Auch hier war der Anstieg der Uterusfeuchtgewichte bei der Dosis von 0.2 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ und 2 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ signifikant (Abb. 41).

Keinen Effekt auf das Uterusfeuchtgewicht zeigte die Applikation des ER β Agonisten in den Dosierungen 0.06, 0.6 und 6 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ (Abb. 40).

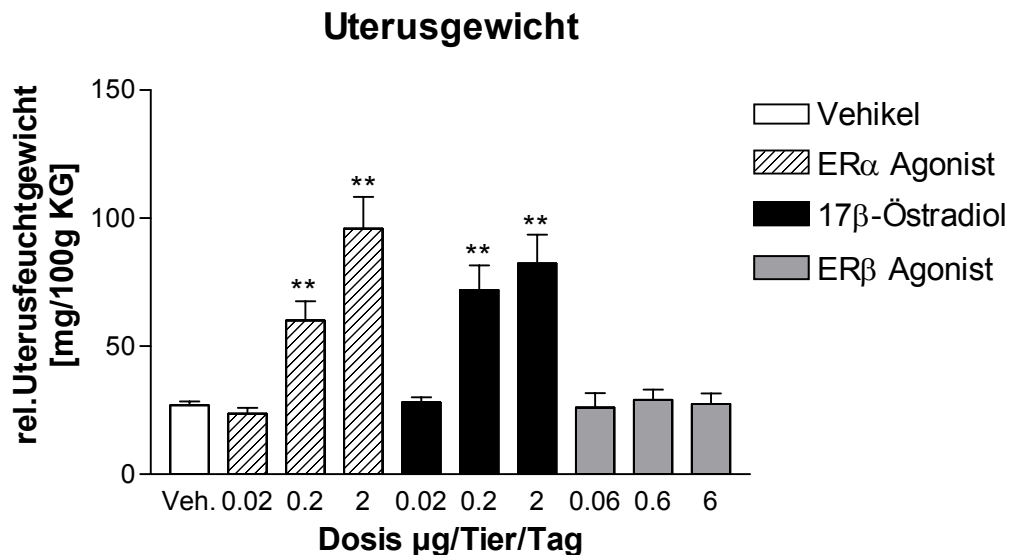


Abb. 40: relatives Uterusfeuchtgewicht in mg/100g Körpergewicht von ovariectomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol und ER β Agonist für eine Dauer von 3 Tagen (MW $\pm$ SD). ** = $p < 0.01$

2.2 Histologische Befunde

2.2.1 Einfluss auf die Histologie

Uteri unbehandelter Ratten waren klein und mit einem im Umfang geringen Lumen. Das Endometriumepithel war als schmale kubische Zellreihe zu erkennen. Das Stroma machte einen Großteil der Uterusmasse aus, war aber nicht proliferiert. In das Stroma eingebettet konnten Drüsen gefunden werden und die periphere Begrenzung des Stromas wurde von einem schmalen Ring Myometriumzellen gebildet (Abb. 41A). Der ER α Agonist führte zu einem großen Uterus mit proliferiertem hochprismatischem Endometriumepithel und voluminösem Lumen (0.2 und 2 µg/Tier/Tag). Das Stroma war zum Teil ödematös aufgetrieben und umfasste die Drüsen, die zahlreicher zu finden waren, als in der Vehikelgruppe. Das Myometrium war sehr kräftig ausgeprägt (Abb. 41B). Die Behandlungsgruppe der 17 β -Östradiol behandelten ovariectomierten Ratten zeigte durch die Verabreichung von 0.2 und 2 µg/Tier/Tag einen großen ballonartig ausgedehnten Uterus, der in seinen Veränderungen der ER α Agonist Gruppe entsprach. Hier konnte ein hochprismatisches Endometriumepithel und eine auffällig dicke Myometriumschicht beobachtet werden. Das Lumen des Uterus war bei steigender Dosis größer und die Uteruswand entsprechend gedehnt, weshalb das Stroma dünner und die Drüsen verteilter erschienen (Abb. 41C). Uteri der ER β Agonist behandelten Ratten stellten sich in allen getesteten Dosierungen analog zu den Beobachtungen der Vehikelgruppe dar (Abb. 41D).

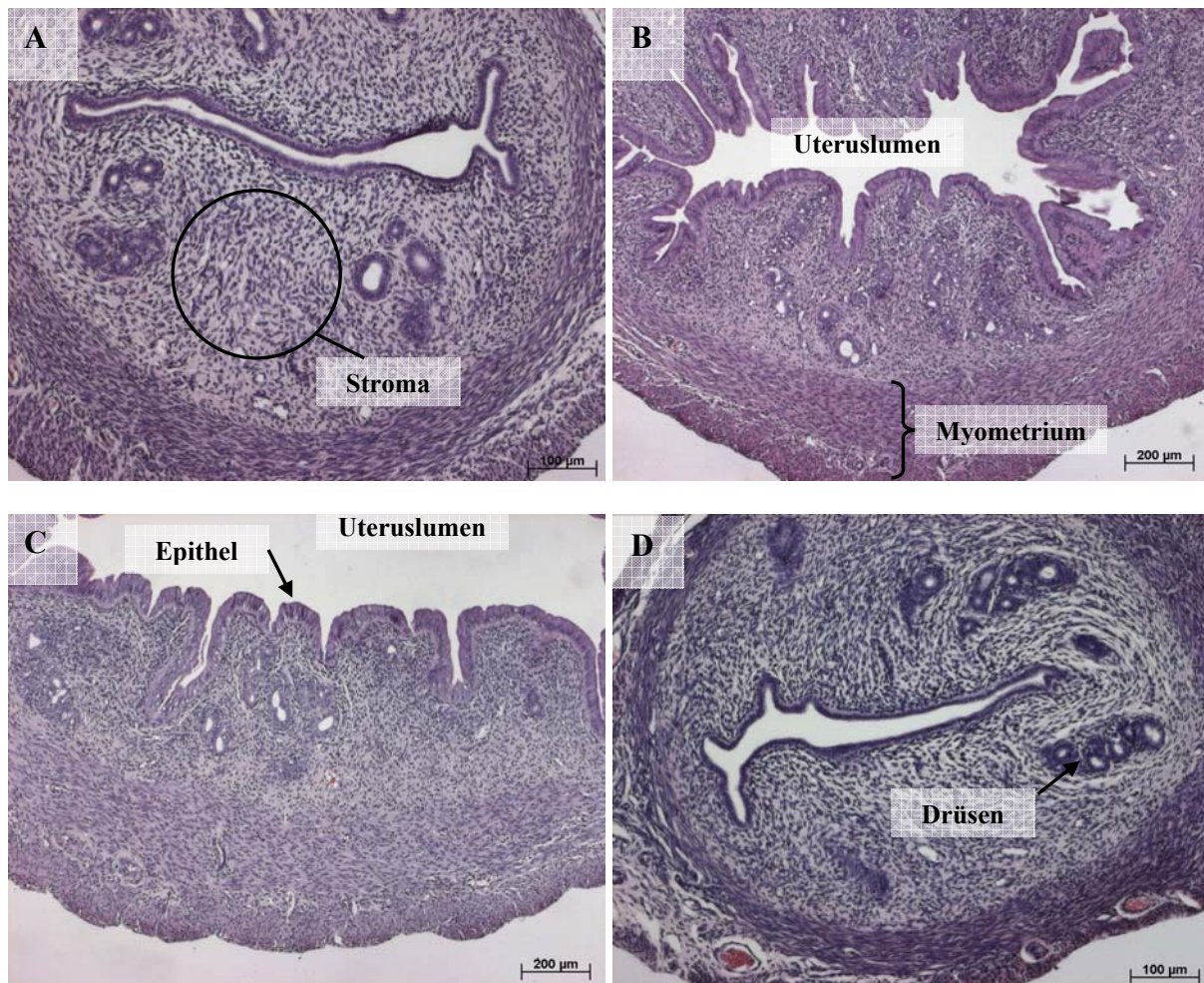


Abb. 41: HE Färbung von Uteri ovariectomierter Ratten nach 3tägiger subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 0.2µg/Tier/Tag ERα Agonist, C) 0.2µg/Tier/Tag 17β-Östradiol und D) 6µg/Tier/Tag ERβ Agonist.

2.2.2 Einfluss auf die endometriale Epithelhöhe

In der Vehikelgruppe hatte das luminale Endometriumepithel eine durchschnittliche Höhe von $8.37 \pm 0.82 \mu\text{m}$. Durch die Behandlung mit ERα Agonist wurde bei einer Dosis von $0.02 \mu\text{g/Tier/Tag}$ kein proliferativer Effekt auf das Epithel ausgelöst. Eine signifikante Steigerung der Epithelhöhe konnte bei einer Dosis von $0.2 \mu\text{g/Tier/Tag}$ und $2 \mu\text{g/Tier/Tag}$ gemessen werden (Abb. 42). Stark ausgeprägt war die Zunahme des Endometriumepithels auch durch die Applikation von 17β-Östradiol. Ab einer wirksamen Dosis von $0.2 \mu\text{g/Tier/Tag}$ kam es zu einer signifikanten Steigerung der Epithelhöhe. Noch stärker baute sich das hochprismatische Endometriumepithel durch die Applikation von $2 \mu\text{g/Tier/Tag}$ 17β-Östradiol auf und erreichte eine signifikante Zunahme der Epithelhöhe auf ein vielfaches der Vehikelgruppe (Abb. 42). Ein proliferierender Effekt konnte durch die Behandlung mit ERβ

Agonist in keiner der verabreichten Dosierungen beobachtet werden. Die Höhe des Endometriumepithels war identisch mit der der Kontrollgruppe (Abb. 42).

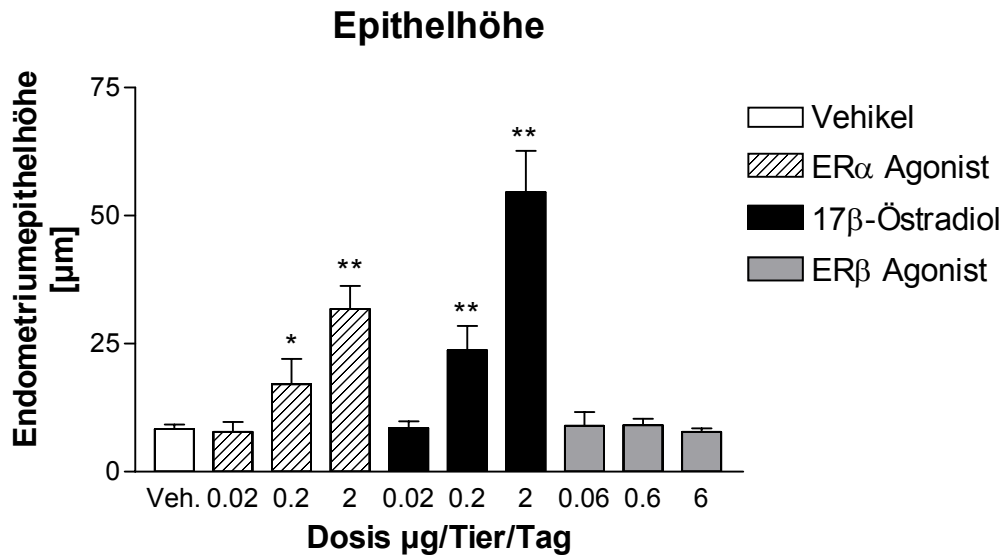


Abb. 42: Epithelhöhe des luminalen Endometriumepithels [µm] von ovariectomierten Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ERα Agonist, 17β-Östradiol und ERβ Agonist für eine Dauer von 3 Tagen (MW ± SD). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

2.3 Einfluss auf die Proliferation

Die immunhistochemische Ki-67 Proliferationsfärbung mit dem Mib-5 Antikörper markierte vorwiegend luminal und glanduläre Epithelzellkerne, vereinzelt aber auch Zellkerne des Stromas und Myometriums. Quantitativ ausgewertet wurden nur die Endometriumepithelien.

Die Uteri der Vehikel behandelten Tiere waren bis auf sehr vereinzelte positiv markierte Zellkerne in luminalen und glandulärem Endometriumepithel frei von Proliferationsaktivität (Abb. 43A). Durch die Applikation des ERα Agonisten kam es ab einer Dosis von 0.2 µg/Tier/Tag in den Endometriumepithelien zu gesteigerter Proliferationsaktivität, im luminalen Epithel signifikant (Abb. 43B). Interessanter Weise führte sowohl die Verabreichung der niedrigeren Dosis (0.02 µg/Tier/Tag), als auch der höheren Dosis (2 µg/Tier/Tag) ERα Agonist zu geringer Proliferationsaktivität im luminalen Endometriumepithel (Abb. 44). Ähnlich war diese dosisabhängige Proliferationsaktivität im glandulären Epithel zu sehen, jedoch war der Effekt nicht so ausgeprägt wie im luminalen Epithel (Abb. 45). Auch bei den 17β-Östradiol behandelten Tieren konnte dieses Dosis-Wirkungs-Muster beobachtet werden. Im luminalen Epithel wurde bei der niedrigsten Dosis noch kein Effekt auf die Proliferationsaktivität festgestellt und eine vergleichbare Anzahl markierter Zellen gezählt, wie in der Kontrollgruppe. 0.2 µg/Tier/Tag 17β-Östradiol führte zu signifikant erhöhter Proliferationsaktivität sowohl im luminalen, als auch im glandulären Epithel

(Abb.43C, 44, 45). Die maximal applizierte E₂ Dosis führte, wie schon beim ER α Agonist berichtet wurde, zu einer herabgesetzten Anzahl proliferierender Zellen im luminalen und glandulären Endometriumepithel (Abb. 44 und 45). Die Epithelzellen konnten in allen Dosisgruppen durch die Applikation des ER β Agonisten in ihrer Proliferationsaktivität nicht über das Niveau der Vehikelgruppe stimuliert werden (Abb.43D). Es konnte bei keiner der eingesetzten Dosierungen ein Effekt beobachtet werden, der signifikante Unterschiede verdeutlicht hätte (Abb. 44 und 45).

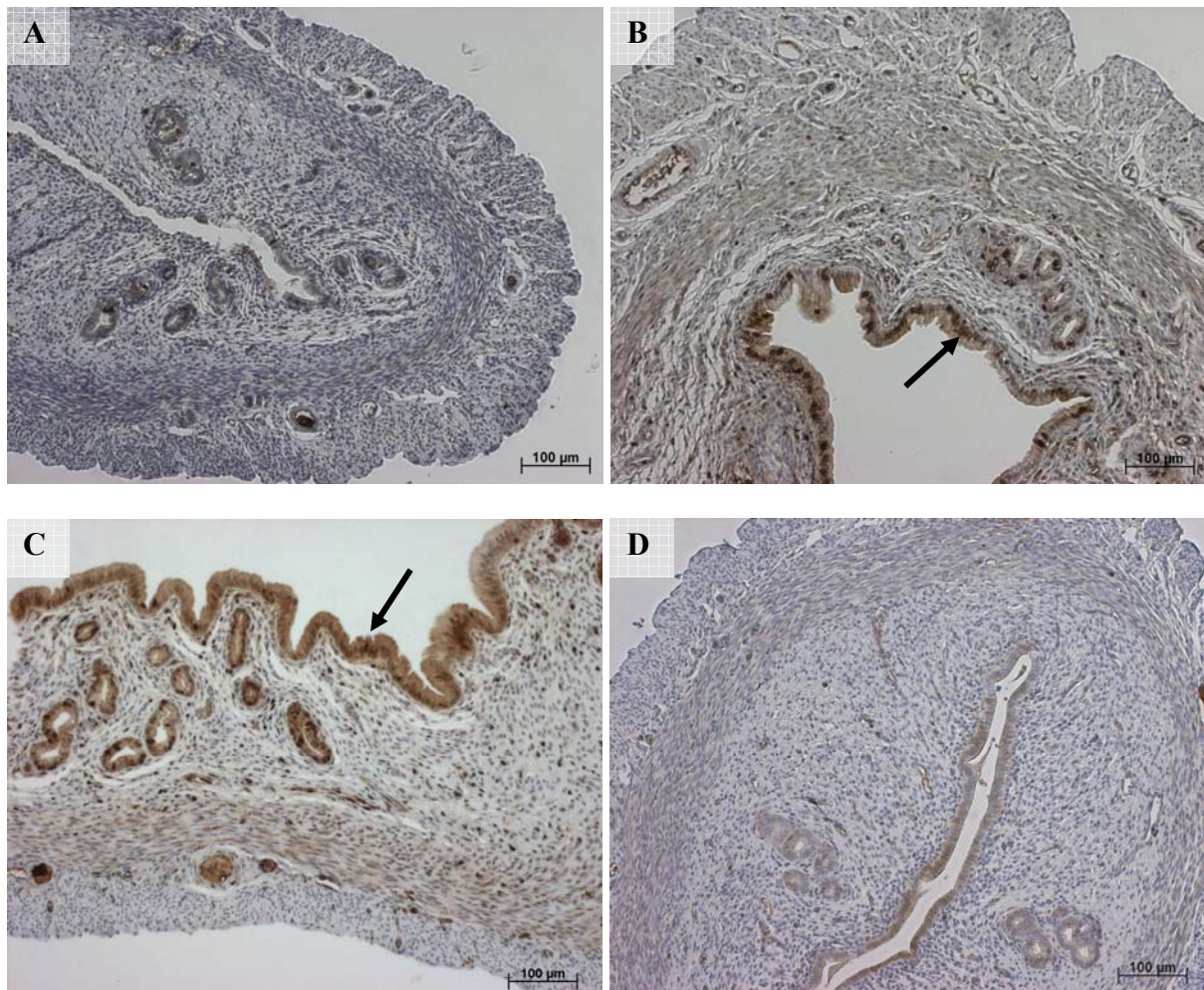


Abb. 43: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 mit dem Mib-5 Antikörper im Uterus ovariectomierter Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 0.2µg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 0.2µg/Tier/Tag 17 β -Östradiol und D) 6µg/Tier/Tag ER β Agonist für eine Dauer von 3 Tagen.

Die Pfeile zeigen auf braune, positiv markierte, luminal Epithelzellen des Endometriums.

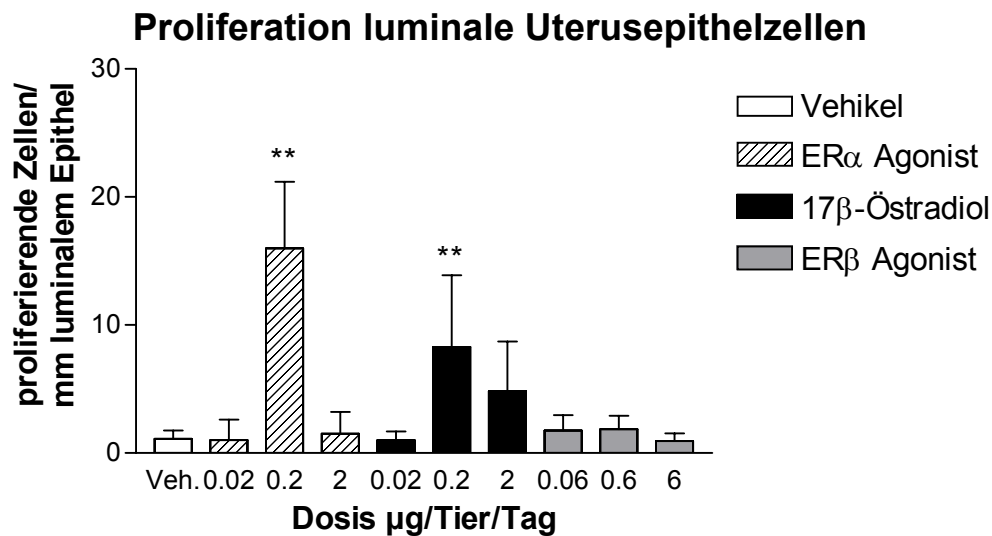


Abb. 44: Anzahl proliferierender Zellen im luminalen Uterusepithel ovariectomierter Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol und ER β Agonist für eine Dauer von 3 Tagen (MW $\pm$ SD). ** = $p < 0.01$

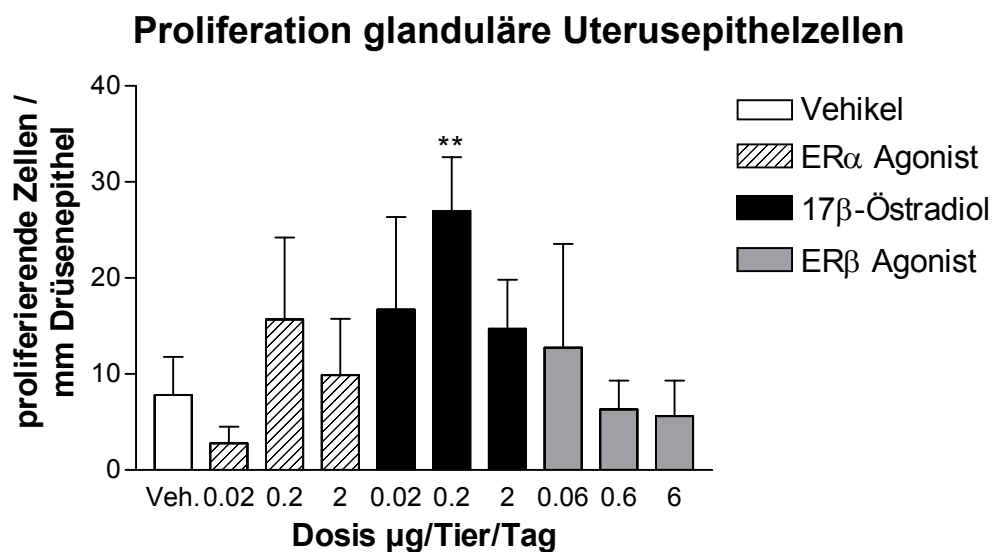


Abb. 45: Anzahl proliferierender Zellen im glandulären Uterusepithel ovariectomierter Ratten nach subkutaner Applikation von Vehikelsubstanz, ER α Agonist, 17 β -Östradiol und ER β Agonist für eine Dauer von 3 Tagen (MW $\pm$ SD). ** = $p < 0.01$

2.4 Einfluss auf Steroidrezeptoren

2.4.1 Einfluss auf die Expression des Östrogenrezeptor α (ER α)

Effekte auf die Proteinexpression von ER α wurden detailliert für die jeweiligen Gewebekompartimente des Uterus ausgewertet. Beurteilt wurden das luminale und glanduläre Endometriumepithel, das subepitheliale und periphere Stroma, sowie das Vorkommen

markierter Zellen im Myometrium. Positive Immunreaktionen waren im Nukleus der ER α exprimierenden Zellen lokalisiert.

In der Vehikelgruppe wird deutlich, dass die Expression des ER α im luminalen und glandulären Epithel, sowie im subepithelialen Stroma stark und in der Peripherie, d.h. im peripheren Stroma und im Myometrium gering ausgeprägt ist (Tab. 3, Abb. 46A).

Der ER α Agonist führte bei einer Dosis von 0.02 μ g/Tier/Tag zu sehr ähnlicher Expression des ER α wie in der Vehikelgruppe. Während die Expression des ER α in den Endometriumepithelien deutlich bis stark war, wurde im peripheren Stroma und dem Myometrium nur eine leichte Färbeintensität beobachtet. Im Unterschied zur Vehikelgruppe war hier das subepitheliale Stroma von geringer Expression des ER α geprägt. Die mittlere Dosis von 0.2 μ g/Tier/Tag führte zu einem deutlich bis starken Vorkommen des ER α im gesamten Gewebe des Uterus (Tab. 3). Diese Intensität der Färbung wurde durch die Behandlung mit 2 μ g/Tier/Tag des ER α Agonisten nicht mehr beobachtet und führte zu reduziert positiven Markierungen in allen untersuchten Gewebekompartimenten (Tab. 3, Abb. 46B).

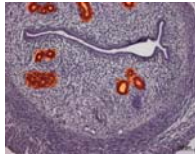
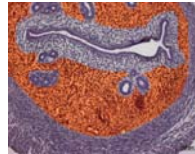
Die Injektion von 17 β -Östradiol in den Dosierungen 0.02, 0.2 und 2 μ g/Tier/Tag ließ einen vergleichbaren dosisabhängigen Effekt entstehen, wie dies bei Applikation des ER α Agonisten zu sehen war. Die niedrigste Dosis vermittelte keine Effekte auf die Expression des Rezeptors (Tab.3). Bei der mittleren Dosis von 0.2 μ g/Tier/Tag wurde der ER α in den Endometriumepithelien (luminal und glandulär) nur sehr gering exprimiert, wohingegen es im Stroma und Myometrium zu deutlicher Färbung kam (Tab. 3). Die maximal eingesetzte Dosis von 2 μ g/Tier/Tag 17 β -Östradiol inhibierte die ER α Expression in allen untersuchten Gewebekompartimenten. Nur im peripheren Stroma und Myometrium war eine sehr geringe Anfärbung weniger Zellen zu beobachten (Tab. 3, Abb. 46C).

Die Versuchsgruppe, die mit ER β Agonist behandelt wurde, zeigte in Bezug auf steigende Dosierungen ein sehr homogenes Bild der ER α Expression. In allen verwendeten Dosierungen (0.06, 0.6 und 6 μ g/Tier/Tag) wurde der Rezeptor im luminalen und glandulären Endometriumepithel stark und im subepithelialen Stroma deutlich positiv markiert. Peripheres Stroma und Myometrium zeigten eine sehr geringe Markierung (Tab. 3 und Abb. 46D).

Sowohl morphologisch, als auch in Bezug auf die immunhistochemische ER α Färbung kann festgehalten werden, dass die Applikation der niedrigsten Konzentrationen an 17 β -Östradiol und ER α Agonist, sowie alle Dosierungen des ER β Agonisten zu übereinstimmenden

Ergebnissen mit der Kontrollgruppe führten und ineffektiv blieben. Eine wirksame Hormonsubstitution mit Veränderung der ER α Expression konnte erst bei höheren Konzentrationen erreicht werden. Dabei wird in erster Linie die Expression des ER α in der Peripherie stimuliert und im Endometriumepithel inhibiert.

Östrogenrezeptor α (ER α)

Gewebe- kompar- timente Dosis $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$	<u>Epithel</u>		<u>Stroma</u>		<u>Myometrium</u>
	luminal	glandulär	subepithelial	peripher	
					
Vehikel	++(+)	+++	++	(+)	(+)
ERα Agonist					
0.02	++(+)	++(+)	+	(+)	(+)
0.2	++(+)	++	++	++	++
2	+	+	+	+	+
17β-Östradiol					
0.02	+++	+++	+	(+)	(+)
0.2	(+)	(+)	++	+++	+++
2	-	-	-	(+)	(+)
ERβ Agonist					
0.06	+++	+++	++	(+)	(+)
0.6	+++	+++	++	(+)	(+)
6	+++	+++	++	+	+

Tab. 3: semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von ER α im Uterus von ovariectomierten Ratten nach subkutaner Applikation der Testsubstanzen. Beurteilt wurden die Gewebekompartimente luminales und glanduläres Endometriumepithel, subepitheliales und peripheres Stroma, sowie das Myometrium.

Das mit - (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark) bewertete Gewebekompartiment ist im Bild rot unterlegt. Zwischenwerte sind möglich.

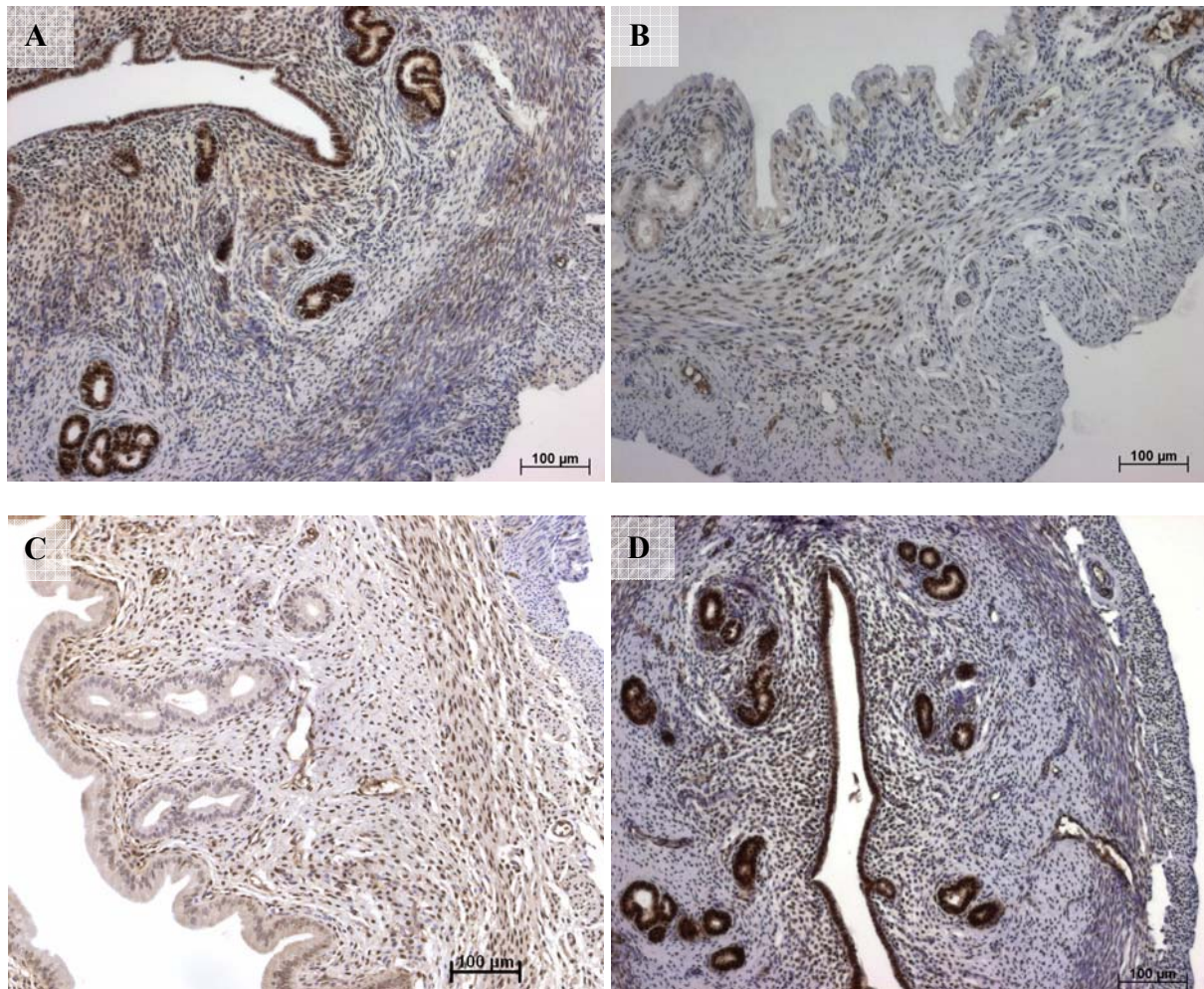


Abb. 46: Immunhistochemischer Nachweis von ER α im Uterus ovariectomierter Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikel B) 2 μ g/Tier/Tag ER α Agonist C) 0.2 μ g/Tier/Tag 17 β -Östradiol und D) 6 μ g/Tier/Tag ER β Agonist für eine Dauer von 3 Tagen.

2.4.2 Einfluss auf die Expression des Progesteronrezeptors (PR)

Wie bei der Auswertung der immunhistochemischen ER α Färbung, wurde die Expression des Progesteronrezeptors in den jeweiligen Gewebekompartimenten des Uterus untersucht. Beurteilt wurden das luminale und glanduläre Endometriumepithel, das subepitheliale und periphere Stroma, sowie das Myometrium. Positive Immunreaktionen waren im Nukleus der PR exprimierenden Zellen lokalisiert.

Die Vehikelgruppe exprimierte den Progesteronrezeptor stark im luminalen und glandulären Endometriumepithel und deutlich im subepithelialen Stroma. Peripheres Stroma und das Myometrium zeigten praktisch keine positiv markierten Zellen (Tab. 4, Abb. 47A).

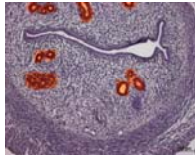
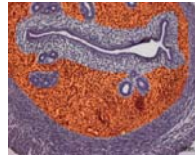
Durch Applikation des ER α Agonisten wurde bei einer Dosis von 0.02 μ g/Tier/Tag kein Unterschied zur Vehikelgruppe in der Verteilung der positiv gefärbten Zellen beobachtet. Die Endometriumepithelien waren konstant stark angefärbt, während im subepithelialen Stroma

mehr Zellen positiv markiert waren als im peripheren Stroma. Genau wie das Myometrium, exprimierte das periphere Stroma keinen Progesteronrezeptor. Die mittlere Dosis des ER α Agonisten verursachte eine Inhibition der PR Expression in den untersuchten Epithelien bei verstärkter Synthese im Stroma und Myometrium (Tab. 4). Die höchste Dosis ER α Agonist führte, verglichen mit der Kontrollgruppe, zu verminderter Expression des Progesteronrezeptors im Endometriumepithel (luminal und glandulär) und hohem Vorkommen des Rezeptors im Stroma und Myometrium (Tab. 4, Abb. 47B).

Die mit 0.02 μ g/Tier/Tag 17 β -Östradiol behandelten Tiere exprimierten in den betrachteten Epithelien den Progesteronrezeptor sehr deutlich. Die Färbeintensität im subepithelialen Stroma war nur sehr gering, während im peripheren Stroma und Myometrium keine positiv markierten Zellen gewertet werden konnten (Tab. 4). Die Differenz zwischen den untersuchten Uteri war in Bezug auf die Epithelien recht groß. Morphologisch konnte aber eine mit der Vehikelgruppe vergleichbare Organstruktur erkannt werden. 0.2 μ g/Tier/Tag 17 β -Östradiol bewirkte in den Rattenuteri eine deutliche Expression des Rezeptors im gesamten Stroma und eine noch ausgeprägtere im Myometrium. 17 β -Östradiol führte hingegen bei einer Dosis von 0.2 μ g/Tier/Tag im luminalen und glandulären Endometriumepithel zu ausgeprägter Inhibition der Synthese und geringer Expression des PR (Tab. 4, Abb. 47C). Die höhere Dosis 17 β -Östradiol (2 μ g/Tier/Tag) zeigte im gesamten Stroma und Myometrium eine hohe PR Expression und führte zu inhibierter Expression des Rezeptors in den endometrialen Epithelzellen (Tab. 4).

Die Uteri der ER β Agonist behandelten Tiere zeigten in den Dosierungen 0.06, 0.6 und 6 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ ein der Vehikelgruppe analoges Bild. Es zeigte sich eine hohe Expression des Progesteronrezeptors im luminalen, sowie glandulären Endometriumepithel, kombiniert mit leicht positiv markierten Zellen des subepithelialen Stromas und einer negativen Peripherie, bestehend aus peripherem Stroma und Myometrium (Tab. 4, Abb. 47D).

Progesteronrezeptor (PR)

Gewebe- kompar- timente Dosis $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$	<u>Epithel</u>		<u>Stroma</u>		<u>Myometrium</u>
	luminal	glandulär	subepithelial	peripher	
					
Vehikel	++(+)	+++	++	(+)	(+)
ERα Agonist					
0.02	+++	+++	+	-	-
0.2	-	(+)	++	++	++(+)
2	+(+)	(+)	+++	++(+)	+++
17β-Östradiol					
0.02	++(+)	+++	++	-	-
0.2	-	(+)	++	++	+++
2	-	-	++	++	+++
ERβ Agonist					
0.06	+++	+++	++	-	-
0.6	+++	+++	+	-	-
6	+++	+++	+(+)	-	-

Tab. 4: semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von Progesteronrezeptor (PR) im Uterus von ovariectomierten Ratten nach subkutaner Applikation der Testsubstanzen. Beurteilt wurden die Gewebekompartimente luminales und glanduläres Endometriumepithel, subepitheliales und peripheres Stroma, sowie das Myometrium.

Das mit - (negativ), + (gering), ++ (deutlich), +++ (stark) bewertete Gewebekompartiment ist im Bild rot unterlegt. Zwischenwerte sind möglich.

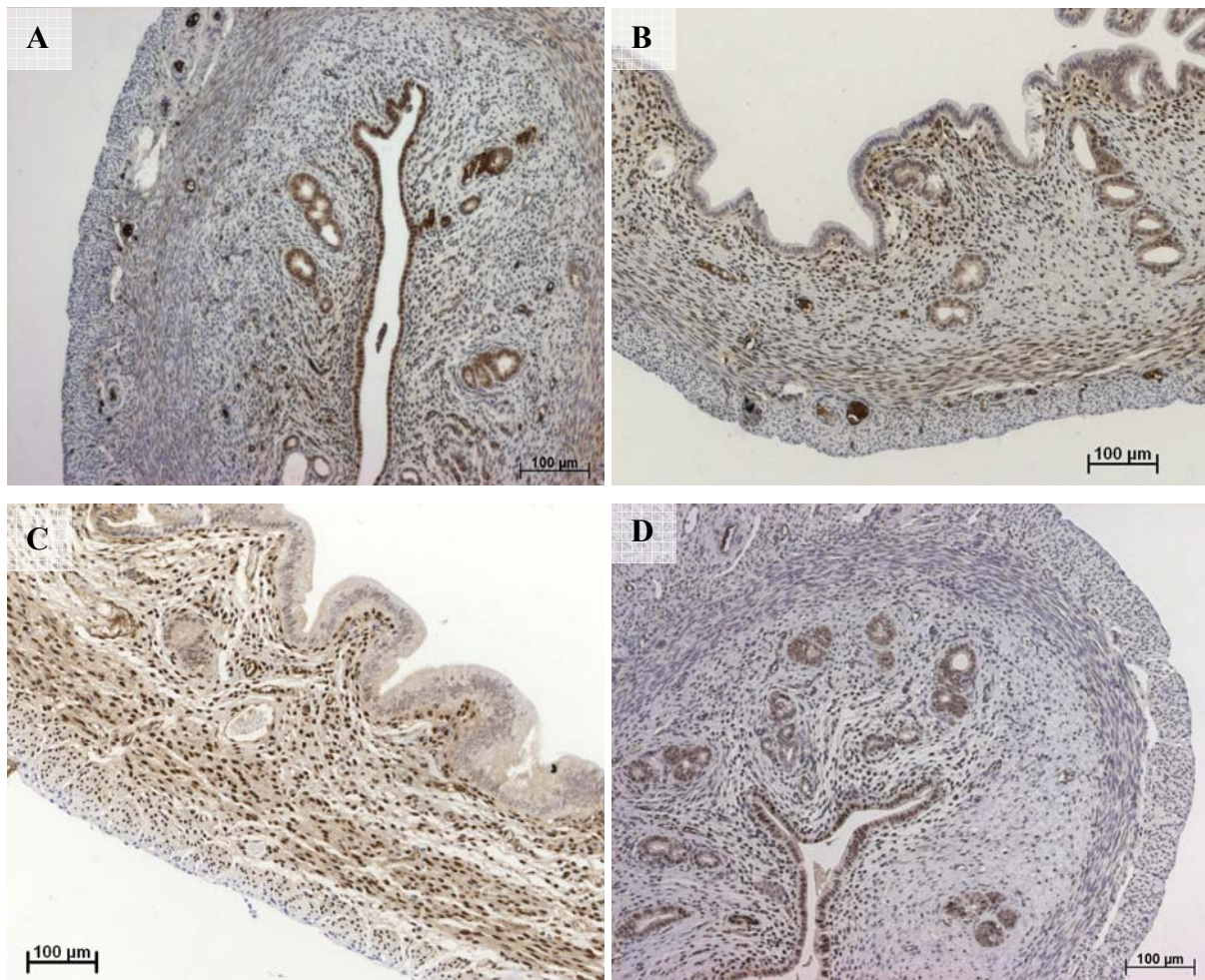


Abb. 47: Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptor im Uterus ovariectomierter Ratten nach subkutaner Applikation von A) Vehikelsubstanz, B) 0,2µg/Tier/Tag ER α Agonist, C) 0.2µg/Tier/Tag 17 β -Östradiol und D) 6µg/Tier/Tag ER β Agonist für eine Dauer von 3 Tagen.

D Diskussion

Die Beeinflussung des Hormonhaushaltes durch Östrogene ist in der heutigen Zeit nicht mehr wegzudenken. Mannigfaltige Anwendungsgebiete, zu denen die seit Jahrzehnten praktizierte Verhütung mit der Pille oder die Behandlung klimakterischer Beschwerden als die populärsten gerechnet werden können. Unerwünschte allgemeine, kardiovaskuläre und metabolische Nebenwirkungen [139, 140] signalisieren, dass weiterhin Forschungsbedarf zur Optimierung von Hormonpräparaten besteht. Besonders die historisch gesehen sehr junge Entdeckung eines zweiten Östrogenrezeptors, nährte die Phantasie ein Instrument in die Hände zu bekommen, um neue Indikationen für Östrogene, bzw. neu entwickelte Substanzen zu redefinieren. Die Wissenschaft arbeitet mit Hochdruck an neuen Erkenntnissen, um mit Hilfe synthetisch hergestellter Substanzen bekannte und unbekannte Einsatzgebiete zu explorieren. Eine große Rolle spielt hierbei freilich die Beeinflussung des weiblichen Reproduktionstraktes. Insbesondere die ovarielle Follikulogenese und der Uterus, der als sensibles östrogenes Zielorgan auch Fokus von Nebenwirkungen ist. Versuchsmodell der Wahl ist hierbei das Tiermodell im Nager (z.B. Maus oder Ratte), das seit vielen Jahren zur Charakterisierung von Sexualsteroiden herangezogen wird [23, 38, 39, 124, 141-143]. Weiterhin ist der Nager eine polyovulatorische Spezies [12], dessen Follikelentwicklung sich postnatal vollzieht und so unabhängig von der fetalen Umgebung ist. Eine Beeinflussung der Follikulogenese wird hierdurch erleichtert [144].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines ER β Agonisten positive Effekte auf die Follikulogenese und die an ihr beteiligten Regulatoren hat, während im Uterus keine östrogenen Effekte nachgewiesen werden konnten. Der ER α Agonist führte am Ovar kaum zu Effekten. Im Uterus dagegen konnten bekannte östrogene Effekte mit dem ER α Agonisten reproduziert und die bekannte Dominanz des ER α bestätigt werden [25, 145]. Der Vergleich der Agonisten untereinander sowie mit 17 β -Östradiol hat die Funktionsweise der Versuchssubstanzen und die Regulation der Östrogenrezeptoren verdeutlicht.

1 Diskussion der verwendeten Methoden

1.1 Hypophysektomie

Das Versuchsmodell der immaturen hypophysektomierten Ratte liefert wertvolle Informationen über die direkte Wirkung von Östrogenen auf das Ovar [37, 40, 143, 146]. Weder die Hypophysenhormone noch Hormone von Corpora lutea können die Follikelreifung beeinflussen, wodurch beobachtbare Effekte isoliert durch applizierte Substanzen zustande

kommen. Bei hypophysektomierten Ratten kommt es zu einem anormalen hormonellen Milieu im Organismus und damit auch zu veränderter, bzw. arretierter Follikelreifung. Ab dem Tag der Hypophysektomie ist es nur noch möglich, durch eine adäquate Hormonsubstitution weiteres Follikelwachstum zu initiieren, da die Gonadotropine der Hypophyse entfallen [37, 40]. Unter physiologischen Bedingungen wird 17β -Östradiol während des Zyklus vom Ovar produziert und wirkt lokal auf die Follikulogenese [147]. In der Substitutionstherapie sind daher hohe Dosen von exogenem 17β -Östradiol und $ER\beta$ Agonisten nötig, um wirksame intraovarielle Wirkungs Dosen zu erreichen und die frühe Follikulogenese in hypophysektomierten Ratten und GnRH Antagonist behandelten Mäusen signifikant zu stimulieren. Die optimale Dosis für die subkutane Applikation in hypophysektomierten Ratten wurde von Goldenberg et al. [38] in Dosis-Wirkungs-Versuchen ermittelt und liegt bei ca. 1mg/Tier/Tag.

1.2 Ovariectomie

Das Versuchsmodell der ovariectomierten Ratten ist gut geeignet, um östrogene Wirkungen an Zielgeweben des Reproduktionstraktes der geschlechtsreifen Ratte zu untersuchen [148]. Dies ist darauf zurück zu führen, dass der weibliche Reproduktionstrakt sehr sensitiv auf Östrogene reagiert. Nach der Kastration weiblicher Tiere kommt es zum Abbau des körpereigenen 17β -Östradiols und damit zur Atrophie des Uterus. Eine hormonelle Substitution führt dann je nach Wirkungsprofil der verabreichten Substanzen zu verschiedenen Effekten am Uterus und ist somit geeignet, die Auswirkung von 17β -Östradiol, $ER\alpha$, bzw. $ER\beta$ Agonist auf das Organ zu beschreiben. Die Applikation der Substanzen führt je nach Rezeptorspezifität zu östrogenen Effekten wie Gewichtszunahme, Erhöhung der Epithelhöhe, Proliferation und Veränderungen der Expression verschiedener Rezeptoren. Durch die morphologischen und molekularbiologischen Veränderungen im Organ kann die Wirksamkeit des applizierten Liganden und damit die Bedeutung des entsprechenden Östrogenrezeptors für den Uterus festgestellt werden. Die gewählten Dosen der 17β -Östradiolapplikation von 0.02, 0.2 und $2\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ wurden nach Erfahrungen aus Dosis-Wirkungs-Versuchen mit 17β -Östradiol bestimmt und liegen im unteren bis oberen Wirkungsbereich [124]. Die Applikationsdosen der $ER\alpha$ und $ER\beta$ Agonisten wurden unter Beachtung des Dissoziationsverhaltens der Substanzen am Rezeptor so gewählt, dass die Wirksamkeit sicher zu erwarten war.

Das Uterusfeuchtgewicht und die histomorphometrische Messung der Endometrium-epithelhöhe sind etablierte und zuverlässige Parameter, um östrogene Eigenschaften der verwendeten Substanzen beschreiben zu können [118]. Die Epithelhöhe dient hier als

sensibelster Untersuchungsseckpunkt, um den Versuchsubstanzen eine 17 β -Östradiol ähnliche Wirkung auf das Organ einzuräumen.

1.3 Klassifikation des Follikelwachstums

Zur Beobachtung von Follikelwachstum wurde das Tiermodell mit Mäusen oder Ratten gewählt, da in dieser polyovulatorischen Spezies die postnatale Entwicklung der Follikel eine Beeinflussung der Follikelreifung vereinfacht [12, 144]. Die quantitative Beurteilung vorhandener Follikel und deren Klassifizierung liefert Informationen über das Wachstums- und Differenzierungsverhalten im Ovar eines Versuchstieres. Die ansonsten übliche Einteilung der Follikelstadien in Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel, Tertiärfollikel und präovulatorischer Follikel (Graaf Follikel) wurde nicht verwendet, da hier vor allem dem Stadium des Sekundärfollikels Rechnung getragen werden sollte. Dieses Stadium wird von vielen Regulationsprozessen beeinflusst und über Weiterentwicklung oder Atresie der Follikel entschieden. Hier kann das Ergebnis einer gesteigerten Induktion des frühen Follikelwachstums beurteilt werden. Die von Pederson et al. [137] beschriebene Klassifikation orientiert sich an der Anzahl der Granulosazellen pro Follikel und deren Wachstumsrate und bietet eine Einteilung in 8 Follikeltypen (siehe Abb. 11, Kapitel B.3.1.3). Sie eignet sich als Klassifikation, um Follikelwachstum detailliert zu beschreiben. In dieser Arbeit wurden Follikel mit einschichtigen Granulosazellen (Typ 3a/b), mit zwei Granulosazellschichten (Typ 4), präantrale (Typ 5a/b) und antrale Follikel (Typ 6 bis 8) unterschieden, wobei in der Deskription „kleine präantrale Follikel“ dem Typ 5a, „große präantrale Follikel“ dem Typ 5b und „kleine antrale Follikel“ dem Typ 6 entsprechen.

Im Blickpunkt dieser Untersuchung stand die Initiation des frühen Follikelwachstums, sowie die weitere Entwicklung der Follikel. Um feststellen zu können, ob es durch die Applikation der eingesetzten Substanzen zu einem verstärkten Follikelwachstum kam, ist zunächst zu erläutern, was ein ruhendes und was ein wachsendes Follikel ist.

Die Initiation des Primordialfollikelwachstums ist durch drei Veränderungen charakterisiert: a) platte Granulosazellen werden kubisch, b) die Anzahl der Granulosazellen steigt und c) der Durchmesser der Oozyte wächst [54]. Pederson et al. [137] untersuchte die Follikelreifung an immaturren Mäusen, wobei durch Markierung von proliferierenden Granulosazellen festgestellt werden konnte, dass alle Follikel vom Typ 3a wachsen. Der Markierungs-Index war sehr gering, was für eine geringe Wachstumsrate spricht, aber kein Follikel dieses Typs

befand sich in einem ruhenden Stadium. Höher entwickelte Follikel wachsen alle, wobei die Wachstumsraten steigen, je größer ein Follikel ist.

Voraussetzung für Follikelwachstum nach der Hypophysektomie von Versuchstieren ist eine adäquate Substitution mit Östrogenen. Ist eine weitere Versorgung der Follikel mit Hormon gewährleistet, führt dies zu einer anhaltenden und weiterführenden Entwicklung, der sich bereits im Wachstum befindlichen Follikel und einer Initiation des frühen Follikelwachstums.

1.4 Semiquantitative Auswertungen

Die Problematik der semiquantitativen Auswertung liegt in der Zuverlässigkeit der Daten und - obwohl semiquantitative Daten aus der Forschung nicht wegzudenken sind - stellen sie doch immer wieder ein Risiko für die Validität der Ergebnisse dar. So ist es wenig überraschend, dass verschiedene Methoden benutzt werden, um die Daten möglichst realitätsnah und signifikant wiederzugeben und eventuelle Fehler des Untersuchers auszuschließen. Zur Quantifizierung wurde in dieser Arbeit die Färbeintensität und Anzahl der positiv markierten Zellen semiquantitativ beurteilt (Score: negativ -, leicht +, deutlich ++, stark +++), wobei mindestens drei Gewebeschnitte pro Organ ausgewertet wurden (bei Serienschnitten ein Vielfaches davon). Präsentiert wurde diese Bewertung anhand von Abbildungen repräsentativer Organschnitte, zusätzlich zu einer Deskription der Beobachtungen und verschiedenen Graphiken. Um die Qualität und Zuverlässigkeit der eigenen Beurteilung zu überprüfen, wurden die Objekte „blind“ und randomisiert ausgewertet, stichprobenartig ausgewählte Objekte nachgeprüft, sowie von einem zweiten Begutachter „blind“ kontrolliert. Durch diese Vorgehensweise sollte gewährleistet werden, dass die Ergebnisse so valide wie möglich sind.

2 Diskussion der Ergebnisse - Ovar

Durch den Einsatz von ER α und ER β selektiven Agonisten konnte die biologische Rolle des ER α und ER β im Ovar unabhängig voneinander gezeigt werden. Darüber hinaus war es möglich, Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen und so Informationen über Regulationsmechanismen zu erlangen.

In hypophysektomierten Ratten und GnRH Antagonist behandelten Mäusen verursachten der ER β Agonist und die Referenzsubstanz 17 β -Östradiol eine Stimulation des frühen Follikelwachstums, eine Reduktion der follikulären Atresie (Apoptose) sowie eine spezifische Regulation ovarieller Genexpression. Der ER β Agonist verursachte in den durchgeführten Versuchen die gleichen Effekte wie 17 β -Östradiol und hatte eine ähnliche Potenz. Die Applikation des ER α Agonisten führte zu geringeren oder keinen Effekten auf die untersuchten Parameter. Die histologische Evaluation der Ovarien lässt vermuten, dass die Stimulation des follikulären Wachstums, induziert durch den ER β Agonisten, auf eine Erhöhung der Anzahl präantraler Follikel (frühe Follikulogenese) und Erniedrigung der follikulären Atresie zurückzuführen ist. Einhergehend mit einer verstärkten Expression von ER β in Granulosazellen in wachsenden Follikeln und der Regulation von Granulosazellmarkern, sowie die konträre Wirkungsweise des ER α Agonisten, führt zu der Schlußfolgerung, dass dem ER β eine Schlüsselrolle während des frühen Follikelwachstums zukommt und die direkten östrogenen Effekte im Ovar über diesen vermittelt werden.

2.1 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf Morphologie, Follikelentwicklung, Proliferation, und Apoptose

Die Morphologie der Ovarien und die Entwicklung der Follikel basiert ganz entscheidend auf Proliferation und Apoptose der verschiedenen follikulären Zellen. Erst das Ungleichgewicht dieser beider Faktoren, ausgelöst durch die Applikation der verschiedenen Testsubstanzen führt im Ovar zu Induktion des Follikelwachstums oder aber zu vermehrter Atresie.

Ovarien von hypophysektomierten Ratten, die mit 17 β -Östradiol oder ER β Agonisten behandelt werden, präsentieren sich in einem Bild, charakteristischer Weise bestehend aus gesunden, vorwiegend soliden, präantralen Follikeln, die dicht an dicht gepackt sind und das Interstitium weitestgehend verdrängen [143, 146]. Gleichzeitig ist die verminderte Atresie und die erhöhte Wachstumsrate, sowie eine gesteigerte Proliferation der Granulosazellen ursächlich an der Steigerung des Ovargewichts beteiligt [37, 38, 42, 143]. In Dosis-Wirkungs-Versuchen konnte schon in frühen Jahren festgestellt werden, dass die Substitution von

Östradiol-benzoate in hypophysektomierten immaturren Ratten zu einer Steigerung des Ovargewichts führt. Dabei kann ein erster noch nicht signifikanter Anstieg bei einer Dosis von 10µg/Tier/Tag Östradiol-benzoate gesehen werden und ein signifikanter Effekt bei einer applizierten Dosis von 100µg/Tier/Tag erreicht werden [142]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten bei einer Dosis von 100µg/Tier/Tag 17β-Östradiol signifikante Ovargewichtszuwächse beobachtet werden. Die für 17β-Östradiol charakteristische Morphologie des Ovars konnte auch durch die Applikation des ERβ Agonisten gesehen werden, bei dem es besonders zu erhöhter Anzahl großer präantraler und antraler Follikel als Zeichen von gesteigertem Follikelwachstum und dessen Induktion kam. Die Hypophysektomie ohne entsprechende Substitution, wie in der Kontrollgruppe, mündet in weitgehender Arretierung des Follikelwachstums, vermehrter Follikelatresie und einem signifikant niedrigeren Organgewicht im Vergleich zu 17β-Östradiol. Auffällig ist, dass die Follikelentwicklung in der Kontrollgruppe nicht vollständig blockiert ist und es vereinzelt zur Ausbildung weiterentwickelter Follikel kommt. Kim et al. [149] fand in hypophysektomierten immaturren Ratten auch ohne Substitution noch nach 4 Tagen wenige gesunde antrale Follikel, was konsistent ist mit den Ergebnissen quantitativer Studien über die Follikelentwicklung in unbehandelten hypophysektomierten Ratten [142]. Der ERα scheint in der Substitutionstherapie bei Hypophysektomie keine Rolle zu spielen, denn auch durch die Applikation des ERα Agonisten konnte, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine entscheidend differente Situation geschaffen werden.

Durch den immunhistochemischen Nachweis des PCNA konnte gezeigt werden, dass über den ERβ eine verstärkte Proliferation der Granulosazellen reguliert wird. Die bekannte proliferative Wirkung von 17β-Östradiol [35] konnte nur mit Hilfe des ERβ Agonisten, nicht aber ERα Agonisten erreicht werden. Dies stimmt mit Beobachtungen in ERα knockout Mäusen überein, die auf Superovulationsbehandlung [150] mit einer Stimulation der Follikulogenese reagieren (siehe Kapitel D.2.2). Die genetische Depletion des ERβ führt in βERKO Mäusen zu vermehrt frühatretischen Follikeln und nur kleinen antralen Follikeln [31].

Die Hypophysektomie führt zu einem Verlust wachsender Follikel, begründet in gesteigerter Apoptose. Durch die Applikation von 17β-Östradiol kann Apoptose in Granulosazellen inhibiert werden [37, 41, 42, 57, 151], was in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der TUNEL Färbung nachgewiesen werden konnte. Eine antiapoptotische Wirkung ist auch durch den ERβ Agonisten, dagegen nicht durch den ERα Agonisten zu sehen. Zusammenfassend bedeutet dies, dass gesteigerte Granulosazellproliferation und Induktion von

Follikelwachstum sowie eine verminderte Zellapoptose in Granulosazellen und Follikelatresie über den ER β reguliert werden. Dies deutet darauf hin, dass die über Jahrzehnte gesammelten Erkenntnisse über die Wirkung von Östrogenen im Ovar ER β vermittelte Effekte sind.

2.2 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von ER α und ER β

Der Nachweis des ER α in den Thekazellen des Ovars konnte zeigen, dass es unter Behandlung mit ER α Agonist bzw. 17 β -Östradiol zu einer Hemmung der ER α Expression kommt. Fehlende Substitution wie in der Vehikelgruppe führte zu einer maximalen Expression des ER α und auch die Applikation des ER β Agonisten lässt die Expression des ER α in den Thekazellen zu. Die Expression des ER α im Ovar scheint daher über eine negative Rückkopplung des eigenen Rezeptors reguliert zu sein. Verschiedene Untersuchungen über die Expression des ER α im Ovar führten zu dem Schluss, dass dieser Rezeptor nicht der dominierende im Ovar ist und überwiegend in Thekazellen und im Stroma vorkommt [13, 152, 153].

Eine Funktion des ER α in den Granulosazellen ist bisher nicht ausreichend untersucht, obwohl die Expression des ER α in Granulosazellen in verschiedenen Versuchen nachgewiesen werden konnte [1, 12, 18, 19, 154, 155]. Palter et al. [12] zeigten, dass der ER α in Granulosazellen durch die Gabe von 17 β -Östradiol vermindert exprimiert wird. Ein Effekt, der durch den LH Anstieg im Zyklus noch ausgeprägter ist. In dieser Arbeit führte sowohl das 17 β -Östradiol, als auch der ER β Agonist zu Expression des ER α in vereinzelten Granulosazellen. Die Verwendung der ER α und ER β Agonisten gab noch keine Hinweise auf eine mögliche Funktion des ER α in Granulosazellen und auch die Erkenntnisse aus den unterschiedlichen knockout Mäusen tragen nicht zum weiteren Verständnis bei. Zukünftige Untersuchungen müssen hier auf mögliche Interaktionen des ER α mit anderen Regulationswegen in Granulosazellen eingehen.

Eine der Aufgaben der Thekazellen im Ovar besteht darin, Androgene zu produzieren, die in den Granulosazellen zu Östrogenen verstoffwechselt werden können [35, 156, 157]. Durch die Lokalisation des ER α überwiegend in Thekazellen [19, 158] könnte ein Zusammenhang zwischen der Androgenproduktion und der Expression des ER α bestehen. Die eigene negative Rückkopplung des ER α könnte einen Regulationmechanismus der follikeleigenen Östrogenproduktion darstellen. 17 β -Östradiol führt im Ovar zu verminderter Expression des ER α in Thekazellen, woraus über eine verminderte Produktion von Androgenen, eine

reduzierte follikel-eigene Östradiolproduktion resultieren könnte. Gleichzeitig wird die Sensibilität der Granulosazellen für Androgene vermindert, indem die Expression des Androgenrezeptors (AR) durch den ER β herunterreguliert wird [159]. Die verminderte Produktion von Androgenen wirkt antiatretisch in antralen Follikeln, was sich positiv auf das Follikelwachstum auswirkt [144]. Die Funktion der Androgene für die Follikulogenese wird in der Literatur verschieden diskutiert. Cheng et al. [159] proklamieren, dass die initiale Rekrutierung des Follikelwachstums nicht unbedingt abhängig ist von der Östrogenpräsenz, sondern ein Androgen dominierter Ablauf ist. Erst in den antralen Phasen der Follikelentwicklung ist das follikelinterne Milieu Östrogen dominiert [39, 159]. Der Effekt des 17 β -Östradiol auf die frühe Follikulogenese konnte in dieser Arbeit allerdings gezeigt werden. Dies steht nicht zwangsläufig im Widerspruch zur Hypothese der Androgendominanz während des frühen Follikelwachstums. Durch die externe Applikation von 17 β -Östradiol und ER β Agonist könnte nämlich eine Milieuänderung in den Follikeln von „Androgen dominiert“ zu „Östrogen dominiert“ bewirken. Die Östrogenpräsenz wäre somit im System der Follikelreifung nicht essentiell, doch aber ein starker Stimulus für vermehrtes Follikelwachstum.

Dieser Hypothese folgend müsste die Applikation von 17 β -Östradiol, bzw. ER α Agonist zu verminderter Androgenproduktion in den Thekazellen und im weiteren Schritt zu reduzierter Östrogenproduktion in Granulosazellen führen. So könnte der Follikel, bei bereits bestehendem Östrogen dominiertem Milieu, vor weiterer Östrogenproduktion geschützt werden.

Die Regulation des ER β durch den Einsatz von ER α und ER β Agonisten konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit beschrieben werden. Dabei erhöht 17 β -Östradiol [37] und der ER β Agonist die Expression des eigenen Rezeptors, was mit stimulierter Zellproliferation, gesteigertem Follikelwachstum und erhöhtem Ovargewicht einhergeht. Der ER β ist vorwiegend in den Granulosazellen von wachsenden kleinen, präantralen und antralen Follikeln [1, 19, 39, 160], aber auch in Thekazellen lokalisiert [13, 18, 160]. Mit der Expression des ER β gehen Effekte einher, wie Einfluss auf die ER α Expression in Thekazellen, verminderter Expression von AMH und Prostazyklin Synthase und verstärkter Expression von Inhibin α Untereinheit und CRABP II.

Wenn es gilt, Effekte von Überproduktion oder Mangel eines bestimmten Genproduktes, wie z.B. der Östrogenrezeptoren zu untersuchen, sind knockout Mäuse das Tiermodell der Wahl. Vor der Entwicklung der ER α und ER β Agonisten war dies auch das Tiermodell, mit dem

erste Erkenntnisse über die jeweiligen Östrogenrezeptoren gesammelt wurden. Dieses Tiermodell stößt jedoch an seine Grenzen, da die Mäuse genetisch verändert sind und so die Erkenntnisse nicht kritiklos auf Wildtypen übertragbar sind. Die differenzierte Justierung von Applikationsdosen, wie bei den hier eingesetzten Liganden, ist nicht möglich. Dennoch eignet sich die knockout Maus für Untersuchungen von Maximaleffekten.

Die α ERKO Maus war die erste Möglichkeit das Fehlen des ER α und dadurch die Wirkung des ER β zu untersuchen [25]. α ERKO Mäuse entwickeln einen normalen Reproduktionstrakt und Ovarien mit vorhandenen Primordialfollikeln. Jungtiere (23 Tage alt) haben Follikel jeden Entwicklungsstadiums und vermehrt große antrale Follikel. Mature Tiere sind infertil und haben eine normale Lebensdauer. Es können Follikel jeder Klasse gefunden werden, wobei ausgebildete Corpora lutea fehlen und vermehrt zystische, blutgefüllte Follikel prominent sind. Dies ist vermutlich auf die Unfähigkeit zur Ovulation (trapped follicles) zurückzuführen. [26, 145]. Superovulation führt in α ERKO Mäusen zur Bildung einer Vielzahl präovulatorischer Follikel, von denen nur die wenigsten ovulieren (37% der Ovulationen in WT) [145, 150, 161].

Die β ERKO Mäuse [31] entwickeln einen gesunden Reproduktionstrakt und das Ovar ist normal entwickelt. Jungtiere (23 Tage alt) haben Follikel jeden Entwicklungsstadiums, wobei antrale Follikel klein sind. Mature Tiere haben eine reduzierte Fertilität, was auf unregelmäßige und ineffiziente Ovulationen zurückzuführen ist. Das Ovar zeigt ebenfalls Follikel jeden Reifestadiums, allerdings sind diese vermehrt frühatretisch [31]. Aufgrund einer reduzierten Anzahl Follikel, die die Follikulogenese abschließen, gibt es wenig Corpora lutea. Dies könnte die observierte Subfertilität der β ERKO Mäuse erklären. Superovulation führt in diesen Tieren nur in wenigen Fällen zu gesteigerter Bildung präovulatorischer Follikel und selten zu Ovulationen (15% der Ovulationen von WT) [145, 150, 161]. Die Hypothese, dass der Verlust des ER β eine Veränderung der Expression und/oder Funktion von Genprodukten zur Folge hat, die auf die Follikulogenese wirken [10], konnte in dieser Arbeit durch den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen gezeigt werden.

Sowohl in α ERKO als auch in β ERKO Mäusen bleiben die Entwicklung der Ovarien und des Reproduktionstraktes ungestört, was darauf hinweist, dass keiner der beiden ER für die Bildung von Keimzellen und die Entwicklung des Reproduktionstraktes essentiell ist [10]. Weiterhin kann vermutet werden, dass die einzelnen Rezeptoren zu einem gewissen Grad Funktionen des jeweils anderen Rezeptors kompensieren können. Jedoch ist diese Kompensation eventuell zellautonom [158] und involviert parakrine Interaktionen zwischen

Granulosa- und Thekazellen [162]. Die intraovarielle Aktivität der ERs scheint demnach weder für die Follikelrekrutierung und frühes Follikelwachstum, noch für die Ovulation obligatorisch, doch aber erleichternd und fördernd zu sein. Auf die im Rahmen der Superovulation durchgeführte Stimulation des Follikelwachstums reagieren die Ovarien der α ERKO sensibel mit Follikelwachstum, was in β ERKO nicht der Fall ist. Während der ER α als fehlender Rezeptor in der α ERKO Maus für die Ovulation selbst unverzichtbar ist, spielt der ER β eine wichtige Rolle beim Vermitteln von östrogenen Effekten [12] und ist dominant bei der Regulation des Follikelwachstums. Die in α ERKO Mäusen beobachteten zystisch, hämorrhagischen Follikel können auf den Mangel an ER α in der Hypophyse zurückgeführt werden. Die über den ER α vermittelte negative Rückkopplung, welche zu sinkender LH Synthese führt, bleibt aus und es kommt zu erhöhter LH Expression [163]. Die Verabreichung eines GnRH Antagonisten blockiert den erhöhten LH Spiegel in α ERKO und verhindert die Bildung dieser Zysten [145]. Die verabreichten ER α und ER β selektiven Agonisten führten in dieser Arbeit nicht zur Zystenbildung in den Ovarien, was die Hypothese stützt, dass nicht im Ovar lokalisierte ER α oder ER β für eine entsprechende Pathologie der Zystenbildung verantwortlich ist, sondern das eben angesprochene hypophysäre LH.

Die $\alpha\beta$ ERKO [33, 150] wie auch die ArKO Mäuse [150] ermöglichen es den Organismus ohne Östradiolwirkung zu examinieren. Die Erkenntnisse aus diesen Tiermodellen zeigen, dass nicht die Entwicklung des Reproduktionstraktes gestört ist, wohl aber die Fertilität und der Phänotyp des Ovars im weiteren Verlauf des Lebens. Die Tiere sind aufgrund der inkompletten Follikulogenese infertil und es kommt zur Bildung von Sertoli ähnlichen Zellen im Ovar [145]. Die Follikulogenese ist arretiert im Stadium der antralen Follikel, welche zumeist atretisch oder vorzeitig luteinisiert sind. Dadurch wird einmal mehr deutlich, dass 17 β -Östradiol nicht essentiell für die frühe Follikulogenese, wohl aber stimulierend und apoptosehemmend ist. Der Vergleich mit α ERKO und β ERKO Mäusen bestätigt, dass der ER α oder ER β die Funktion des jeweils anderen Rezeptors teilweise kompensieren kann. Nur so kommt es zur Ausbildung von maturen Follikeln. Die Rezeptoren scheinen für die Entwicklung der Keimzellen nicht essentiell zu sein.

2.3 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von Inhibin α Untereinheit

Die Inhibin α Untereinheit ist sowohl als Baustein von Inhibin A und B, als auch in ihrer auto- und parakrin wirksamen freien Form ein wichtiger Bestandteil zur Ausbildung einer intakten Reproduktion [62, 80]. Inhibin ist der Hauptregulator der FSH Sekretion aus der Hypophyse, indem es die Sekretion über einen negativen Rückkopplungsmechanismus verhindert [62, 65, 72, 73, 79]. Zwar hat die Inhibin α Untereinheit keine vergleichbare Wirkung auf das FSH [73], trotzdem gilt sie in ihrer freien Form als ein eigenständiges aktives Protein [79] und als Marker für Follikelwachstum [89]. Die Inhibin α Untereinheit wird in hohem Maße in Granulosazellen des Ovars synthetisiert [62, 65, 66, 72, 78, 79, 164-168] und kommt primär in präantralen und antralen Follikeln vor, die keine Zeichen von Atresie zeigen. In dieser Arbeit maximierte sich die Expression der Inhibin α Untereinheit in den präantralen und kleinen antralen Follikeln (Typ 5 und 6), obwohl zudem auch vereinzelte Granulosazellen in Follikeln niedrigerer Entwicklungsstufe nachgewiesen werden konnten. Herath et al [72] beschreibt das Vorkommen der Inhibin α Untereinheit im Zusammenhang mit dem Alter von weiblichen Ratten und stellt fest, dass bis zum Lebensalter von 25 Tagen in jedem Entwicklungsstadium der Follikel Inhibin α Untereinheit exprimiert wird. Erst in adulten Tieren beschränkt sich die Expression auf große antrale Follikel. Die inhomogene Lokalisation der Inhibin α Untereinheit kann demnach durchaus auf das Alter der Versuchstiere zurückzuführen sein und die Expression auch in wenig entwickelten Follikeln erklären. Die Hypophysektomie führt zu verminderter Expression der Inhibin Untereinheiten mRNA [71] als Ausdruck der arretierten Follikulogenese, was durch die Behandlung der Versuchstiere mit Vehikelsubstanz bestätigt werden konnte. *In vivo* [71, 169] und *in vitro* [70, 71, 73] Versuche beschreiben einen positiven Einfluss auf die Inhibin α Untereinheit Synthese, bzw. Inhibin Sekretion durch die Substitution von 17 β -Östradiol. Der Einsatz der ER α und β Agonisten sollte nun Aufschluss geben über die Rolle der Östrogenrezeptoren in der Regulation der Inhibin α Untereinheit. Die Applikation von ER α Agonist ließ erkennen, dass die Inhibin α Untereinheit etwas stärker exprimiert wird als in der Kontrollgruppe. Die zu Wachstum angeregten Follikel waren allerdings in ihrer Größe deutlich kleiner, als z.B. in der 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist Gruppe. Der aktivierte ER β (durch die Behandlung mit 17 β -Östradiol oder ER β Agonist) führte zu ausgeprägter Expression der Inhibin α Untereinheit und folglich zu einer erkennbaren Induktion des Follikelwachstums.

In Metallothionein-I Gen Promoter (MT α) transgenen Mäusen, welche eine Überproduktion der Inhibin α Untereinheit haben, kommt es zu verminderter Reproduktivität, ursächlich in

einer reduzierten Anzahl an Ovulationen pro Zyklus und der Neigung zu Zystenbildung und polyovulären Follikeln [62, 80]. Ovarielle Zysten konnten in Follikeln mit gesteigerter Expression der Inhibin α Untereinheit allerdings nicht beobachtet werden, was folgendermaßen erklärt werden kann:

1. Die Bildung von Inhibin α Untereinheit wird über exogen applizierte Substanzen beeinflusst und nicht durch genetische Modulation, was eventuell zu niedrigeren Konzentrationen der Inhibin α Untereinheit führt als in transgenen Mäusen. Dadurch kommen die von Cho et al. [62] beobachteten Maximaleffekte nicht zur Ausprägung.
2. Das Ovar in transgenen Mäusen wird sehr viel länger der Wirkung der Inhibin α Untereinheit ausgesetzt, als in den drei Tagen Behandlungsdauer der hier vorliegenden Versuche.
3. Durch die Applikation von 17β -Östradiol, bzw. ER β Agonist könnte ein gesteigertes Follikelwachstum initiiert worden sein, einhergehend mit einer verstärkten Bildung der Inhibin α Untereinheit in den Granulosazellen, die sich aber, der veränderten Situation angepasst, im physiologischen Bereich befindet und somit keine Pathologien verursacht.

Der gesteigerte immunhistochemische Nachweis der Inhibin α Untereinheit deutet auf eine Induktion der Follikulogenese bei Substitution von 17β -Östradiol, bzw. ER β Agonist in weiblichen hypophysektomierten Ratten hin. Dies lässt vermuten, dass der bekannte Einfluss von 17β -Östradiol auf die Expression der Inhibin α Untereinheit [70, 71, 73] ER β vermittelt ist. Auch die positive Korrelation zwischen Inhibin A und 17β -Östradiol [75, 170, 171] scheint demnach ER β vermittelt zu sein. Um zu klären, ob diese Regulation direkt oder indirekt über eine Induktion des Follikelwachstums stattfindet, muss im Rahmen weiterer Versuche untersucht werden. Fraglich ist, wieso es durch die Behandlung mit dem ER α Agonisten ebenfalls zu, wenn auch geringer ausgeprägten, Expression der Inhibin α Untereinheit kommt. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass die Hypophysektomie nicht zur kompletten Inhibition des Follikelwachstums führt [142, 149] und so die wenigen Follikel, die sich dennoch weiterentwickeln, Inhibin α Untereinheit exprimieren. Möglicherweise beeinflusste der ER α Agonist andere Mechanismen, die zu leicht erhöhter Expression der Inhibin α Untereinheit führten. Im physiologisch normalen Organismus (Nager) wirkt Inhibin auf die Thekazellen sensibilisierend für LH, was wiederum zu einer Androgenproduktion dieser Zellen führt [79, 172]. Die Androgene werden dann von den

Granulosazellen in follikuläre Östrogene umgewandelt, der essentiellen Voraussetzung für Follikelwachstum.

Die Inhibin α Untereinheit ist als Marker für Follikelwachstum [89] ein Baustein, um die Effekte der ER α und ER β Agonisten zu charakterisieren und stärkt die Bedeutung des ER β in der Follikulogenese und dessen spezifische Aktivierung durch den ER β Agonisten.

2.4 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von Anti-Müllerian Hormon (AMH)

Die Applikation von ER α , bzw. ER β Agonisten ermöglichte es, die unterschiedlichen Effekte auf die AMH Expression zu untersuchen und einen Einblick zu gewinnen, wie AMH durch 17 β -Östradiol und die verschiedenen ER selektiven Agonisten beeinflusst wird. In der Gruppe der Vehikelsubstanz, bzw. ER α Agonist applizierten Tiere kam es zu gleichen Ergebnissen. Die starke Expression des AMH in Granulosazellen von Follikeln des Typs 3a/b und Typ 4 und z.T. auch in präantralen und antralen Follikeln ist konform mit der Lokalisation des AMH anderer Versuche [87, 88] und deutet auf eine Inhibierung des Follikelwachstums hin. Innerhalb dieser Follikel ist die Expression des Hormons nicht zwingend homogen, sondern kann in manchen Follikeln maximal in Granulosazellen nahe der Oozyte sein [87, 89, 91, 92, 99, 173]. AMH ist ein dominanter Regulator des frühen Follikelwachstums [89, 96] und führt bei Anwesenheit zu geringerem Wachstum der Granulosazellen und dadurch auch des Follikels [89, 94, 95, 174]. Zusätzlich werden FSH vermittelte Effekte über eine Reduzierung der FSH Sensitivität gemindert [88, 96]. Die hohe Expression des AMH inhibiert das Follikelwachstum parakrin [99] und autokrin, und führt weiterentwickelte Follikel in die Atresie [90]. Durlinger et al. [90] vermutet, dass eine hohe AMH Expression die Follikel in die Atresie führt, während gemäßigte Konzentrationen an AMH die Follikel präovulatorisch werden lässt. Maximal AMH exprimierende Follikel, wie sie nach Behandlung mit ER α Agonist oder in der Kontrollgruppe zu sehen waren, könnten also präatretisch sein, was in den Ergebnissen der Apoptose Färbung (TUNEL) und des Follikelstagings Bestätigung findet. Mit fortschreitender Atresie sinkt auch die AMH Expression in den betroffenen Follikeln [87, 88, 90-92]. Primordialfollikel sind AMH negativ und große antrale Follikel, sowie Corpora lutea exprimieren wenig oder kein AMH [87, 88, 90-92]. In den Ovarien der Tiere dieser Versuchsgruppen (Vehikel, ER α Agonist) sind weiterhin viele atretische Follikel zu finden, die bereits AMH negativ sind und optisch einen Kontrast zu den stark markierten Follikeln darstellen. Zwischen AMH und Inhibin α Untereinheit besteht eine negative Korrelation,

sodass in Ovarien, die mit AMH kultiviert werden der Marker für Follikelwachstum vermindert nachgewiesen werden kann [89, 100]. Es kann also vermutet werden, dass der durch die Hypophysektomie verursachten Atrophie der Follikel und des Ovars durch die Substitution mit dem ER α Agonist nicht entgegengewirkt werden kann. Die Expression des AMH und dessen inhibierende Wirkung auf Wachstum und Rekrutierung der Primordialfollikel konnte bestätigt werden. Je nach Ausprägung der Expression könnte AMH auch Zeichen oder sogar Auslöser bevorstehender Follikelatresie sein.

Nach Applikation von 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist zeichnet sich der immunhistochemische Nachweis des AMH durch gemäßigte Färbeintensität der meisten Follikel aus. Viele große präantrale und antrale Follikel weisen eine gemäßigte bis schwache Färbeintensität auf. Nach der Hypothese Durlingers et al [90] bedeutet dies, dass die Follikel präovulatorisch werden. Baarends et al. [88] machte die Beobachtung, dass die AMH Expression in einigen aber nicht allen präantralen und antralen Follikeln inhibiert wird, wenn Ratten mit GnRH Antagonist und 17 β -Östradiol behandelt werden [88]. Da antrale Follikel selbst beginnen 17 β -Östradiol zu synthetisieren, könnten hierdurch auch die Beobachtungen erklärt werden, dass AMH nur bis zum Stadium der kleinen antralen Follikel nachgewiesen werden kann. Die Ähnlichkeit eines Promoter Gens für AMH mit dem ERE könnte eine direkte Inhibition der AMH Synthese durch E₂ erklären [93]. Die in $\alpha\beta$ ERKO Mäusen beschriebene AMH Erhöhung [33] unterstützt die Überlegung, dass Östrogene und AMH negativ korreliert sind und E₂ eine regulative Eigenschaft zukommt. Diese kann jedoch nicht essentiell sein, da $\alpha\beta$ ERKO Tiere einen normalen Reproduktionstrakt ausbilden [100]. Die gemäßigte Expression der AMH in den größeren Follikeln dieser Ovarien kann demnach darauf zurückzuführen sein, dass erstens die Aktivität am ER β durch Applikation von E₂, bzw. ER β Agonist zu einer reduzierten AMH Expression führt, zweitens die Follikel präovulatorisch werden und/oder drittens, dass es zur Induktion des Follikelwachstums mit einhergehender, erniedrigter AMH Synthese kommt.

Eine in der semiquantitativen Auswertung ähnliche Bewertung der vier Behandlungsgruppen ist durch verschiedene Aspekte erklärbar. In der Gruppe der Vehikelsubstanz, bzw. ER α Agonist behandelten Tiere kommt es zu vermehrtem Auftreten bereits atretischer Follikel, die kein AMH exprimieren. Mehr Follikel sind im Begriff atretisch zu werden, was zu sinkender AMH Expression führt. Das Vorkommen hochgradig positiv gefärbter Follikel ist dennoch sehr ausgeprägt. Bei Behandlung der Versuchstiere mit 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist, findet man kaum atretische Follikel, die AMH negativ sind. Dadurch kommen Ansammlungen atretischer Follikel, ohne Anfärbung nicht vor und die Kontrastbildung

zwischen sehr positiven und negativen Follikeln ist nicht zu beobachten. Das Ovar wird gebildet von dicht an dicht gepackten, großen, mäßig AMH exprimierenden Follikeln und nur wenigen Follikeln, die stärker AMH positiv sind. Es stellt sich somit ein homogener Eindruck der AMH Expression im Ovar ein, der durch eine größere Follikelanzahl, die in die semiquantitative Auswertung einfließen, nicht allzu große Unterschiede zulässt. In der Deskription werden große Unterschiede bei Funktion und Qualität der Follikel deutlich. Zieht man den Vergleich zu Ergebnissen der Apoptose und dem Follikelstaging, finden die Erklärungen zusätzlich Bestärkung.

Entgegen der *in vivo* [96] und *in vitro* [94, 175] nachgewiesenen inhibitorischen Effekte des AMH, berichtete McGee et al. [176], dass AMH zu Follikelwachstum in präantralen Follikeln führt. AMH wird vor allem in Follikeln exprimiert, die sich im Wachstum befinden und bei welchen die Granulosazellen mitotisch aktiv sind. Granulosazellen, die sich nicht mehr teilen, wie z.B. Granulosazellen nahe der Basalmembran, bzw. atretisch werdende Follikel, exprimieren kein AMH. Mitotisch aktive Granulosazellen hingegen, wie die Cumuluszellen oder der Oozyte nahe Granulosazellen, exprimieren länger AMH. Hieraus könnte eine Wachstum initiiierende Wirkung, bzw. Konkordanz zwischen Wachstum und mitotischer Aktivität der Granulosazellen abgeleitet werden. Allerdings wurde in Versuchen mit transgenen Mäusen die Funktion und Bedeutung des AMH weiter aufgeschlüsselt. So konnte in Tieren, die kein AMH synthetisieren (AMHKO) beobachtet werden, dass die Tiere fertil sind, jedoch ein Verlust der Primordialfollikel aus dem Pool zu beobachten ist. Dies wird durch erhöhte Rekrutierung der Primordialfollikel erklärt [100], was zu erhöhten Wachstumsraten und vermehrter Anzahl wachsender Follikel führt. Ovariell AMH scheint direkt oder indirekt Primordialfollikel davon abzuhalten, in den Pool der wachsenden Follikel einzutreten [89]. Gesteigerte Ovargewichte sind das Ergebnis einer gesteigerten Follikulogenese [96, 100]. Da diese Entwicklungen im Organismus von AMH defizienten Tieren gemacht wurden, scheint die wachstumshemmende Eigenschaft des Hormons wahrscheinlicher und sind Differenzen eher mit einem Speziesunterschied und An- oder Abwesenheit von Serum (dies bedeutet auch unterschiedliche Wachstumsfaktoren) zu erklären [99]. Eine negative Korrelation, die sich bei Applikation von AMH in reduzierter Expression der Inhibin α Untereinheit widerspiegelt [88, 89], zeigt auf, dass frühes Follikelwachstum inhibiert wird. Die Funktion und direkten, bzw. indirekten Effekte des AMH auf die Follikulogenese ist bis heute nicht eindeutig geklärt und weitere Versuche sind nötig, um vor allem Regulationsmechanismen aufzuklären.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es über die Stimulation des ER β durch 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist neben gesteigerter Follikulogenese, verringerter Apoptose und Atresie zu reduzierter AMH Expression kommt. Das bedeutet, dass der ER β an der Regulation des Follikelwachstums und der Expression des AMH direkt oder indirekt beteiligt ist. Zudem war zu beobachten, dass eine überhöhte Expression des AMH in einem Follikel, wie bei ER α Agonist und Vehikelgruppe zu beobachten war, eher zu Atresie, als Wachstum führt. Das Ausmaß der AMH Expression lässt möglicherweise Aussagen über die Zukunft eines Follikels zu.

2.5 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von zytosolischem Retinsäure bindendem Protein II (CRABP II)

Zytosolische Retinsäure bindende Proteine (CRABPs) werden allgemein als Transportproteine ihrer hydrophoben Liganden bezeichnet. Sie blockieren wegen der strikten Lokalisation im Zytoplasma [177] den Zugang der Retinsäure zum Nukleus und damit zu den Zielgenen. Der Metabolismus des Liganden kann dadurch kontrolliert werden [177]. Neuere Untersuchungen ergaben, dass Retinsäure produzierende Zellen verstärkt CRABP II bilden [178], während Zellen, die kein CRABP II synthetisieren, auch keine Retinsäure produzieren können [108]. Die Befähigung von Zellen dieses Protein zu synthetisieren, scheint demnach eine Voraussetzung für die Produktion von Retinsäure zu sein. Folglich ist CRABP II in Sekretion und/ oder Produktion der Retinsäure involviert und kann als Marker für Retinsäure produzierende Zellen gesehen werden [108]. Dies führt zu der Hypothese, dass CRABP II diese Zellen durch eine Zugangsbeschränkung der Retinsäure zum Nukleus schützt. CRABP hingegen hat protektive Eigenschaften für Zellen, die mit der synthetisierten Retinsäure parakrin in Kontakt kommen, aber nicht die eigentlichen Zielzellen der Retinsäure sind [178]. Da im Embryo in manchen Bereichen Retinsäure synthetisiert wird, ohne dass CRABP II vorhanden ist, kann es jedoch nicht essentiell für die Bildung von Retinsäure sein. Erklärt wird dies durch 2 Systeme der Retinsäureproduktion: 1. für autokrine Effekte im Embryo und 2. für parakrine Effekte in Uterus und Ovar [108]. CRABP II könnte demnach für die Synthese von größeren Mengen Retinsäure, wie sie parakrin benötigt werden, von Bedeutung sein. Im Ovar wird CRABP II überwiegend in reifen Follikeln und frühen Corpora Lutea nachgewiesen [179]. Durch die Applikation von 17 β -Östradiol, bzw. ER β Agonist konnte eine gesteigerte CRABP II Expression beobachtet und somit bestätigt werden, dass der ER β der dominante Rezeptor für die Regulation dieses Proteins ist.

Die physiologische Aufgabe des CRABP II, bzw. der Retinsäure im Ovar ist bisher nicht eindeutig geklärt. Bekannte Effekte der Retinsäure bei Differenzierung und Proliferation von Epithelzellen könnten auch im Ovar postovulatorisch im Rahmen der Umwandlung der Granulosazellen zu Lutealzellen eine Rolle spielen. Mit steigender Östradiolproduktion des reifen Follikels, bzw. des Corpus Luteum wird verstärkt CRABP II exprimiert, was wiederum auf eine gesteigerte Retinsäureproduktion - wichtig für Differenzierung und Proliferation der Granulosazellen - hindeutet. Diese erhöhten Östradiolkonzentrationen wurden nun durch die Substitution erreicht und entsprechende Effekte über den ER β verursacht. Xing et al. [180] untersuchten die Wirkung der Retinsäure auf die Expression des FSH Rezeptors (FSHR) in Granulosazellen und beschreibt, dass Retinsäure und seine Rezeptoren direkt bei der Suppression der FSHR Expression involviert sind. Gesteigerte CRABP II Expression, einhergehend mit erhöhter Retinsäureproduktion, könnte demnach parakrin auf Nachbarfollikel wirken, damit diese weniger FSH sensibel sind und im Wachstum gehemmt werden. Derartige Vorgänge spielen eine Rolle bei der Selektion von dominanten Follikeln, die bis zur Ovulation heranreifen, während die Entwicklung von subdominanten Follikeln im normalen Zyklus unterdrückt wird.

2.6 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf die Expression von Prostazyklin Synthase (PGIS)

Prostazyklin ist ein Produkt der Prostazyklin Synthase und relaxiert als potenter Vasodilatator glatte Muskelzellen [113]. In physiologischen Situationen, die mit erhöhter Durchblutung einhergehen, wie z.B. Schwangerschaft oder der follikulären Phase des ovariellen Zyklus, kommt es zu erhöhter Prostazyklin Synthase Expression und verstärkter Mikrovaskularisierung. Bei Untersuchungen von Gefäßen verschiedener Lokalisation konnte beobachtet werden, dass Östrogen zu verstärkter Bildung des Prostazyklins und der Prostazyklin Synthase führt [181]. Durch den Einsatz von selektiven und nicht selektiven ER β Antagonisten konnte die 17 β -Östradiol verursachte PGI₂ Produktion inhibiert werden, was auf eine Dominanz des ER β bei der Regulation der Prostazyklin Synthase hindeutet [182]. Auf der anderen Seite wird beobachtet, dass Östrogen die Cyclooxygenase I (COX-1) in zerebralen Gefäßen von Wildtyp Mäusen erhöht, was in ER α knockout Mäusen nicht erreicht werden kann. Diese Beobachtung lässt wiederum erahnen, dass der ER α bei der Regulation der endothelialen COX-1 und damit auch der Prostazyklin Synthase eine Rolle spielt, da sie als Schlüsselenzym in der Prostaglandin Biosynthese der PGIS vorgeschaltet ist [183]. In

dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Expression der Prostazyklin Synthase auf das Zytosol der Granulosazellen beschränkt ist und bei Applikation von 17β -Östradiol, $ER\alpha$, bzw. $ER\beta$ Agonist deutlich reduziert wird. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Die Angiogenese ist während der follikulären Phase des ovariellen Zyklus ein streng kontrollierter Vorgang. Die erhöhte Permeabilität, welche durch das Prostazyklin ausgelöst wird, führt zu vermehrter Transsudation von Flüssigkeit aus den Gefäßen in die follikuläre Flüssigkeit und verhindert so ein Kollabieren des präovulatorischen Follikels. Bis zur Ovulation steigt der Druck der follikulären Flüssigkeit an, bis es zur Ruptur kommt [184]. Die reduzierte Expression der Prostazyklin Synthase könnte demnach ein Schutz des heranreifenden Follikels vor Transsudation sein. Ebenso könnte auch verhindert werden, dass Faktoren in die Follikelflüssigkeit penetrieren, die Zellen schädigen oder Effekte verursachen, die zum Zeitpunkt der Follikelreifung verfrüht wären. Ein weiterer unerwünschter Effekt des Prostazyklins bei zu frühem Auftreten, ist die Mikrovaskularisierung des Follikels, die durch die Reduzierung der Expression verhindert werden soll. LH führt zu gesteigerter Synthese der PGI_2 [116] und könnte darauf hindeuten, dass der LH-Peak die durch Östrogen verursachte Unterdrückung der PGIS beendet. Prostazyklin Synthase wird verstärkt in Lutealzellen nachgewiesen, und verursacht oder unterstützt im Corpus Luteum die Vaskularisierung.

Die Versuchstiere dieser Arbeit wiesen weder Corpora lutea noch präovulatorische Follikel auf. Auf Grund der fehlenden Hypophysenhormone konnte es nicht zu einem LH Peak kommen und demnach auch nicht auf diesem Wege die Expression initiiert werden. Eine hohe Expression der PGIS mit erhöhter Synthese der PGI_2 und nachfolgender Mikrovaskularisierung der Follikel wäre in dem Stadium der präsenten Follikel physiologisch nicht sinnvoll. Dennoch fehlen momentan ausreichende Kenntnisse, um die Rolle der Prostazyklin Synthase im Ovar und der Follikulogenese aufzuklären. Die Beteiligung sowohl von $ER\alpha$, als auch $ER\beta$ an der Expression der Prostazyklin Synthase im Ovar scheint deutlich, wenn auch die Rezeptoren auf verschiedenen Ebenen der Biosynthese regulierend Einfluss nehmen.

3 Diskussion der Ergebnisse - Uterus

Durch den Einsatz von ER α und ER β selektiven Agonisten war es möglich, die Dominanz des ER α bei der Vermittlung östrogenen Effekte im Uterus zu bestätigen. Ohne die Hilfe von ER knockout Mäusen konnte beschrieben werden, dass der ER α verantwortlich ist für die Vermittlung östrogenen Effekte, wie Steigerung des Uterusgewichts und erhöhte Proliferationsindices im luminalen und glandulären Endometriumepithel, einhergehend mit einer Zunahme der Epithelhöhe. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des ER α und PR im Uterus über den ER α gewebespezifisch und dosisabhängig reguliert wird. Potentielle Funktionen des ER β wurden anhand der Effekte des ER β Agonisten definiert und bestätigten die untergeordnete Rolle dieses Rezeptors im Uterus.

3.1 Einfluss von ER α und ER β Agonisten auf Morphologie und Proliferation des Uterus

Die bekannten und vielseitig beschriebenen östrogenen Effekte auf den Uterus, können durch die Bewertung verschiedener, simpler Parameter eruiert werden und so Aufschluss über das Wirkungsprofil von verabreichtem 17 β -Östradiol oder anderen Substanzen geben. Das Uterusgewicht und die Epithelhöhe sind sensible morphologische Größen, die bei östrogenen Effekten erhöht werden [10, 37, 185] und geeignet sind, den Einfluss einer östrogenen Substanz dosisabhängig zu beschreiben. Velardo et al. [124] untersuchte die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen 17 β -Östradiols auf das Uterusfeuchtgewicht von adulten ovariectomierten Ratten und erstellte Dosis-Wirkungskurven, an denen sich die Dosisfindung in dieser Arbeit orientierte. Die Wirkdynamik von 17 β -Östradiol und ER α Agonist war analog und die dosisabhängige Steigerung des Uterusgewichts übereinstimmend. Dies bestätigte die Zuverlässigkeit des Tiermodells und die Wirksamkeit dieser beiden Substanzen. Das Uterusepithel ist unter verschiedenen hormonellen Einflüssen ein gutes System, um biochemische Situationen, die mit Zellwachstum, DNA Synthese und Zellteilung einhergehen, zu identifizieren. 17 β -Östradiol stimuliert die Zellen eine synchronisierte Welle aus DNA Synthese und Zellteilung zu beginnen [15, 186]. Morphometrische Untersuchungen des Uterus trugen zu grundlegenden Erkenntnissen der 17 β -Östradiol induzierten Differenzierung des Endometriums und des antiöstrogenen Einflusses von Progesteron bei [118]. Eine sehr einfache und zuverlässige Methode ist dabei die Messung der Epithelhöhe des Uterusepithels. Um die Effekte aber nicht nur morphologisch zu bestimmen, führte der

immunhistochemische Nachweis der PCNA [51, 53] zu weiterer Klärung, wie östrogene Effekte vermittelt werden.

Dosisabhängig konnten ab einer Substanzmenge von 0.2µg/Tier/Tag 17β-Östradiol steigende Effekte auf das Uterusfeuchtgewicht, die Epithelhöhe und den Proliferationsindex festgestellt werden. 17β-Östradiol führte zu hochprismatischem Zylinderepithel mit basal liegendem Nukleus und vakuolenreichem Zytoplasma. Diese Effekte werden offensichtlich über den ERα vermittelt, denn durch Applikation des ERα Agonisten wurden gleichgerichtete Ergebnisse mit Steigerung des Uterusgewichts, der Epithelhöhe und der Proliferation beobachtet. Wie in verschiedenen Versuchen mit βERKO Mäusen beschrieben wurde, sind Uteri, die keinen ERβ synthetisieren nicht in der Funktion gestört und nehmen an zyklischen Veränderungen teil [10, 187]. Hosie et al. [188] beschreiben Epithelhöhen in ovariectomierten Ratten nach dreitägiger Behandlung mit 0.5µg 17β-Östradiol, welche die Ergebnisse dieser Arbeit exakt bestätigen. Interessanter Weise war die Mitoserate, nachgewiesen in der immunhistochemischen PCNA Färbung, bei maximaler Dosis von E₂ und ERα Agonist auf Werte der Kontrollgruppe reduziert. Da die epitheliale Proliferation des Endometriums abhängig ist von stromalem ERα [14, 15], musste dieser Rezeptor vermindert exprimiert und die verminderte Proliferation des Epithels eine Folge dessen sein. Durch den Einsatz des ERα Agonisten und den immunhistochemischen Nachweis des ERα, konnte dieser Regulationsmechanismus der Proliferation über den ERα bestätigt werden. Das deutet auf eine selbstlimitierte Regulation des ERα als Schutz des Organs vor zu ausgeprägten östrogenen Effekten hin. Aufgrund der Trägheit der morphologischen Reaktion sind das Uterusgewicht und die Epithelhöhe noch signifikant gesteigert, während die weitere physiologisch nicht sinnvolle Proliferation des Epithels unterdrückt wird. Eine unterschiedliche biologische Antwort auf 17β-Östradiol von neonatalen und muren Nagern ist bekannt und beschränkt sich in muren Tieren auf die Proliferation der Endometriumepithelien. Bei immaturen Tieren proliferieren hingegen alle Gewebe des Uterus [10].

Der ERβ Agonist vermochte keine Änderungen der untersuchten Größen zu bewirken. Unabhängig von der applizierten Dosis glich das Uterusgewicht, die Morphologie der Endometriumepithelzellen und der Proliferationsindex den Ergebnissen der Vehikelgruppe. Dabei änderte die Substanz nicht die für unbehandelte ovariectomierte Ratten und αERKO Mäuse typische Morphologie mit flachen, kubischen Epithelzellen, die einen zentral liegenden Nukleus und wenig Zytoplasma ohne Vakuolen haben [10]. In der αERKO Maus

ist der gesamte Uterus hypoplastisch und wiegt ca. die Hälfte der Uteri in Wildtyp Tieren [10, 150, 161]. Die beschriebene untergeordnete Rolle des ER β konnte dadurch bestätigt werden.

Die ER α Dominanz im Uterus der ovariectomierten Ratte wurde deutlich, indem die Untersuchungsendpunkte nur bei ER α Aktivität beeinflussbar waren. Die definitive Rolle des ER α im Hinblick auf uterotrophe Effekte wurde bereits in α ERKO Mäusen deutlich. Während diese auf Östrogenbehandlung nicht adäquat reagierten und Anomalitäten im Reproduktionstrakt aufwiesen, bildeten die β ERKO Mäuse einen morphologisch normalen und auf Östrogene reagiblen Uterus aus [20, 25, 30, 31, 189, 190]. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Wirkungsweise der eingesetzten Agonisten sind konform mit den Wirkungen ER selektiver Liganden, wie sie von Frasor et al. [23] erstmals eingesetzt wurden.

3.2 Einfluss der ER α und ER β Agonisten auf die Regulation von ER α und PR im Uterus

In dieser Arbeit konnte beschrieben werden, wie der Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) in den einzelnen Gewebekompartimenten des Uterus der Ratte exprimiert und reguliert werden. Dabei trägt der Einsatz der selektiven ER α und ER β Agonisten einen entscheidenden Beitrag zum weiteren Verständnis bei und verdeutlicht erneut die unterschiedliche gewebespezifische Regulation. Zum ersten Mal wurde die Wirkung der ER α und ER β Agonisten auf die jeweiligen Gewebekompartimente des Uterus (luminales und glanduläres Epithel, subepitheliales und peripheres Stroma, Myometrium) untersucht.

Die Regulation des ER α , auch in Verbindung mit 17 β -Östradiol Applikation, wurde bereits vielseitig exploriert und ein direkter Vergleich der Ergebnisse kann nicht bedenkenlos vollzogen werden. Die Gegenüberstellung der z.T. widersprüchlichen Ergebnisse wird durch die Vielzahl der Auswertungsmethoden, der unterschiedlichen Tiermodelle und der Versuchskonzepte erschwert. Die Expression des ER α ist abhängig von dem zur Verfügung stehenden Hormonangebot, dem untersuchten Gewebekompartiment und der Dauer der Hormonapplikation. Der biphasische Regulationsmechanismus führt zu einem raschen Abfall des ER α kurz nach der 17 β -Östradiol Gabe, mit anschließender Neusynthese des Rezeptors [187, 191-193]. Hierdurch kommt dem Zeitpunkt der Autopsie und der Dauer der Behandlung große Bedeutung zu. Untersuchungen der ER α Expression, bzw. des PR, sind vor allem dann problematisch, wenn das gesamte Organ, z.B. als Homogenat untersucht wird. Eine aufgegliederte Beurteilung der Gewebekompartimente ist so nicht mehr möglich. Eine

gewebespezifische Regulation innerhalb des selben Organs [125] kann so nicht erkannt werden und verfälscht die Ergebnisse und Hypothesen über die Regulation. Verschiedene Studien haben sich mit der Expression der Rezeptoren in den verschiedenen Gewebekompartimenten des Uterus von immaturen [24, 194, 195] und adulten Tieren [22, 125-127, 152, 196, 197] befasst.

Die Regulation des ER α ist dosisabhängig und innerhalb des gleichen Organs je nach Gewebekompartiment unterschiedlich. Die Ovariectomie führte ohne hormonelle Substitution zu stark ausgeprägter Expression des ER α im luminalen und glandulären Endometriumepithel [24, 191, 194, 196] und mäßiger Expression im subepithelialen Stroma. 17 β -Östradiol inhibierte bei einer Dosis von 0.2 μ g/Tier/Tag die Expression des ER α im luminalen und glandulären Endometriumepithel und stimulierte diese im Stroma und Myometrium. Gleichartige Ergebnisse in gleichem Tiermodell wurden bereits beschrieben [196, 197]. In immaturen Ratten inhibiert 17-Ethinyl-Östradiol die ER α Expression in allen Gewebekompartimenten des Uterus [24, 194]. Das Alter der Versuchstiere scheint also einen Einfluß auf die Regulation des ER α im Stroma und Myometrium zu haben, was bereits für die Zellproliferation beschrieben wurde. Die Funktion von Stroma und Myometrium scheint sich während der Entwicklung der Nager zu wandeln. Die Inhibition der ER α Expression im gesamten Organ wird in der Literatur unter supraphysiologischen Dosen E₂ [198] [192, 193, 198-202] diskutiert und konnte hier bei der höchsten Dosis 17 β -Östradiol (2 μ g/Tier/Tag) beobachtet werden. Die niedrigste Dosis (0.02 μ g/Tier/Tag) übte keinen Effekt auf den ER α aus. Auch der ER α Agonist vermochte den eigenen Rezeptor in gleicher Weise zu regulieren, wie dies 17 β -Östradiol tat. Die mittlere Dosis stimulierte die ER α Synthese im Stroma und Myometrium, während der inhibierende Effekt auf den ER α im luminalen und glandulären Endometriumepithel erst bei der höchsten Dosis (2 μ g/Tier/Tag) einsetzte. Die Regulation scheint demnach dosisabhängig zu sein und führt zunächst zu einer Verlagerung des ER α in die Peripherie und bei steigendem Angebot des Liganden, zur Inhibition des ER α in allen Geweben des Uterus.

Der Progesteronrezeptor ist nach der Ovariectomie und ausbleibender hormoneller Substitution stark in luminalem und glandulärem Endometriumepithel, sowie im subepithelialen Stroma exprimiert. Peripheres Stroma und Myometrium exprimieren nur gering den PR [125, 127]. Die Substitution mit 17 β -Östradiol führt zu einer Verlagerung der PR Expression in Richtung Peripherie, so dass die Epithelien (luminales und glanduläres) vermindert, Stroma und Myometrium verstärkt den PR exprimieren [121, 125, 127, 195]. Der Progesteronrezeptor wird in verschiedenen Spezies unterschiedlich reguliert. 17 β -Östradiol

steigert die Expression des PR im uterinen Gewebe von Primaten auch im Epithel [203, 204], während das Hormon im Nager zu einer Reduktion des PR im Epithel führt [125, 127, 195, 197]. Die 17β -Östradiol induzierte Regulation des Progesteronrezeptors war in der vorliegenden Arbeit dosisabhängig, wobei die niedrigste Dosis von $0.02\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ noch keinen Effekt zeigte und unbehandelten Tieren glich. Parczyk et al. [127] beobachtete eine Verschiebung der PR Expression bei einer Dosis von $0.1\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$ 17β -Östradiol, was einen Dosis-Wirkungs-Beginn zwischen diesen beiden Konzentrationen wahrscheinlich macht. Die vergleichbaren Ergebnisse durch Behandlung der Versuchstiere mit dem ER α Agonist ab einer Dosis $0.2\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{Tag}$, spricht für eine Regulation dieses Gens über den ER α [25, 190]. Rekombinationen von Stroma und Epithel zwischen α ERKO und Wildtyp Tieren zeigten, dass die epitheliale Expression des PR abhängig ist von der Präsenz des ER α im Stroma. Ist kein ER α vorhanden, wie dies in α ERKO der Fall ist, kann der PR im Epithel parakrin nicht inhibiert werden [121]. Die Wirkungsweise des ER α Agonisten bestätigte dies, denn die Präsenz stromaler ER α geht einher mit verminderter epithelialer PR Expression. Die Ergebnisse sind konform mit den Untersuchungen von Frasor et al. [23], die erstmalig einen selektiven ER α Liganden einsetzten und unter dessen Wirkung es ebenfalls zu verminderter PR Expression im Epithel kam [23].

Bisher konnte die Regulation der untersuchten Rezeptoren im Uterus nicht vollständig geklärt werden. Einigkeit herrscht darüber, dass der ER α der dominante Rezeptor im Uterus ist und die klassischen östrogene Effekte vermittelt. Diese können unterteilt werden in frühe Effekte, wie RNA Transkription, Hyperämie und Wassereinlagerung und späte Effekte, wie gesteigerte DNA Synthese und Mitose der epithelialen Zellen [187]. Anhand der α ERKO Maus wurde deutlich, dass ohne diesen Rezeptor die Funktionalität des Uterus eingeschränkt ist und dies zur Infertilität führt. Die Abwesenheit des ER β in der β ERKO Maus ließ hingegen keine pathologische Morphologie oder Funktionalität erkennen. Bekannt ist, dass die epitheliale Proliferation stromalen ER α benötigt und auch der dort lokalisierte Rezeptor für die Inhibierung des epithelialen PR verantwortlich ist. Wenn nun aber, wie in dieser Arbeit gezeigt, die ER α Aktivität zu einer verminderten Expression des ER α im luminalen und glandulären Epithel führt, kann dies nur bedeuten, dass östrogene Effekte, bereits ein morphologisches Korrelat bewirkt haben und die Hemmung des ER α ein selbstlimitierender Faktor ist. Zu Zeiten des Hormonmangels, wie z.B. nach der Ovariectomie, sind die ER α Konzentrationen im Epithel und subepithelialen Stroma erhöht [191] [24, 194, 196]. Dies könnte eine prophylaktische Maßnahme sein, um auf Östrogene schnellstmöglich reagieren zu können. Auch der PR ist erhöht, da trotz hoher ER α Konzentrationen die Aktivierung über

Liganden und damit der Einfluss auf die Expression des PR, ausbleibt. Bei dauerhafter Hormonpräsenz wird selbstregulierend der ER α vermindert exprimiert, was den Organismus vor Überreaktion auf Östrogene schützen soll. Vermehrter ER α im peripheren Stroma und Myometrium könnte für parakrine Mechanismen von Bedeutung sein. Dies wird bei der Interaktion mit dem Progesteronrezeptor deutlich. Eine Inhibition des ER α bei zu großem Hormonangebot, könnte auch in diesen Gewebekompartimenten eine Schutzfunktion gegen zu ausgeprägte östrogene Effekte darstellen. Der Progesteronrezeptor wird dagegen durch 17 β -Östradiol im Stroma und Myometrium stimuliert und bietet dem Organ einen zusätzlichen Schutz. Stromaler PR ist für parakrine Mechanismen von Bedeutung und antagonisiert östrogene Effekte [126]. Fehlt der Progesteronrezeptor im Organismus, wie in PRKO Mäusen, führt dies zu anormaler Reproduktivität durch gestörte Ovulation, uterine Hyperplasie, Entzündungszeichen im Gewebe, verminderte Brustdrüsenentwicklung und gestörtem Sexualverhalten [123].

Der ER β Agonist führte in keiner der eingesetzten Konzentrationen zu Wirkungen auf die Verteilung des ER α oder PR im Uterus und die Gewebe zeigten das gleiche Expressionsmuster wie die Kontrollgruppe. Mögliche ER β vermittelte Effekte können daher nur eine untergeordnete Rolle spielen. In der β ERKO Maus erscheint der Uterus normal und vollzieht zyklische Veränderungen. 17 β -Östradiol führt zu bekannten uterotrophen Effekten. [161]. Der fehlende ER β scheint keine, für die Funktionalität des Organs, essentielle Aufgabe zu haben. Diskutiert wird ein positiver Einfluß von ER β auf die PR Expression im Stroma, was in α ERKO Mäusen durch die Applikation von 17 β -Östradiol (0.125 μ g/Tier/Tag) für 3 Tage erreicht wurde [22]. Dieser Effekt konnte mit dem ER β Agonisten nicht bestätigt werden und auch eine einmalige 17 β -Östradiol Applikation in α ERKO Mäusen zog keine Induktion des PR im Stroma nach sich [190]. Es wird spekuliert, der ER β könnte modulierende Eigenschaften auf die ER α Aktivität haben [23] oder als negativer Regulator der ER α Aktivität wirken [46]. Dann aber wären unterschiedliche Effekte zwischen dem 17 β -Östradiol und ER α Agonist zu erwarten, was nicht der Fall ist. In Untersuchungen zur physiologischen biphasischen Antwort des Uterus auf 17 β -Östradiol wurde die Aktivierung von Genen während früher Effekte (2-6h) und später Effekte (10-16h) nach E₂ Applikation untersucht [187]. Dabei werden in den beiden Phasen unterschiedliche Gengruppen aktiviert, während manche Gene durchgehend aktiv sind. Interessant ist dabei, dass in β ERKO Mäusen kein Unterschied zu Wildtyp Tieren beobachtet wurde und die α ERKO Maus nur sehr geringe Änderungen der Genexpression auf 17 β -Östradiol zeigte [187]. Deutlich wird hierdurch, dass dem fehlenden ER β keine Pathologie folgt, dieser Rezeptor aber in geringem Maße uterine

Gene beeinflussen kann, wenn kein ER α vorhanden ist. Dies könnte Effekte des ER β in α ERKO Mäusen nach E₂ Applikation erklären [22]. Natürlich muss man sich fragen, ob nicht höhere Konzentrationen des ER β Agonisten als die eingesetzten Dosierungen nötig gewesen wären, um die diskutierten Hypothesen bestätigen zu können. Das Wirkprofil der Substanz spricht allerdings gegen eine Unwirksamkeit in diesen Konzentrationen (Kapitel B.1.2). Auf der anderen Seite führte der ER β Agonist zu geringfügiger Beeinflussung der ER α Expression im Ovar. Dadurch wären Mechanismen denkbar, die eine Beeinflussung des ER α durch den ER β Agonisten im Uterus ermöglichen könnten, auch, wenn in dieser Arbeit keine Unterstützung aktueller Hypothesen gefunden werden konnte.

Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die beiden untersuchten Rezeptoren ER α und PR im Uterus der Ratte reguliert werden. Sowohl der ER α , als auch der PR wird im luminalen und glandulären Endometriumepithel, sowie im subepithelialen Stroma durch den ER α inhibiert. Die gewebespezifische Regulation der beiden Rezeptoren führt im peripheren Stroma und Myometrium zu gesteigerter Expression. Der ER α wird in seiner Expression bei großem Hormonangebot, anders als der PR, im gesamten Uterus herunter reguliert. Der ER β Agonist vermochte keinen der Rezeptoren zu regulieren, was in Verbindung mit der normalen Funktionalität des Uterus in β ERKO Tieren, eine essentielle Funktion des ER β ausschließt. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche Funktion der ER β im Uterus hat.

4 Abschließende Überlegungen

Mit der Entwicklung neuer selektiver Östrogenrezeptor Agonisten wurde ein neues Kapitel der Pharmakotherapie aufgeschlagen. Getragen von der Phantasie, Organe und Gewebe gezielt beeinflussen und zusätzlich Nebenwirkungen minimieren zu können, hat die Forschung auf dem Gebiet der Östrogenrezeptoren neuen Aufwind bekommen. Die Frage nach einer möglichen Indikationsstellung neu entwickelter Substanzen kann zum heutigen Zeitpunkt nicht sicher beantwortet werden. Zum aktuellen Zeitpunkt sind die Funktionen der Östrogenrezeptoren und deren spezifische Regulation in unterschiedlichen Geweben noch zu undefiniert und auf den Menschen übertragbares Wissen zu rar, um bereits neue Pharmazeutika zu erwarten. Dennoch konnte mit dieser Arbeit ein großer Fortschritt erreicht werden und erste Wirkprofile einer neuen Gruppe synthetischer Östrogene definiert werden.

Den Ergebnissen dieser Arbeit nach, kann dem ER β Agonisten ein großes Potential im Bereich der Fertilitätssteigerung bei sub- oder infertilen Frauen eingeräumt werden. Die gesteigerte Follikelentwicklung ohne die proliferativen Effekte auf den Uterus, stellen eine Optimalkombination dar. Allerdings darf nicht erwartet werden, dass die Ergebnisse kompromisslos auf den Menschen übertragbar sind. Des weiteren verlangt die Beeinflussung der Follikulogenese den Einsatz höherer Dosen, als sie hier am Uterus getestet wurden. Die am Uterus eingesetzten niedrigeren Konzentrationen der Testsubstanzen dienten vormerklich der Bestimmung der Wirksamkeit an der Grenze zum wirksamen Bereich. Weiterhin offen bleibt die Frage nach der Qualität der Oozyten und den Embryos, was in kommenden Untersuchungen geklärt werden muss.

Betrachtet man die Verteilung des ER α im Organismus, fällt im Gegensatz zu der relativ niedrigen Präsenz des Rezeptors im Ovar eine hohe Expression in der Hypophyse auf. Der ER α Agonist könnte aufgrund dieser Verteilung als Ovulationsinhibitor mit Wirkung auf die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse wirken.

Weitere mögliche Indikationen könnten die Behandlung der Osteoporose, Endometriose, Substitutionstherapie nach Hysterektomie und klimakterischer Beschwerden sein, die bereits Gegenstand aktueller Forschung sind. Wirkungsbereiche der Östrogene im gesamten Organismus machen aber auch vielfältige andere Indikationen denkbar. So werden z.B. positive Effekte bei der Therapie der Demenz erhofft.

Sicherlich wird das Forschungsfeld der selektiven Beeinflussung von Östrogenrezeptoren noch viele Neuerungen bringen und gespannt werde ich diese erwarten.

E Zusammenfassung

Der weibliche Reproduktionstrakt als Ziel östrogenen Effekte ist seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Doch erst die Entwicklungen Mitte der Neunziger Jahre, die geprägt waren von der Entdeckung eines zweiten Östrogenrezeptors und der Züchtung von Östrogenrezeptor knockout Mäusen (ERKO), führten zu einer Flut neuer Erkenntnisse. Zunächst stand die unterschiedliche gewebespezifische Lokalisation der Östrogenrezeptoren im Vordergrund, später die Definition der physiologischen Funktionen der jeweiligen Rezeptoren. Letzteres wurde in α ERKO, β ERKO, $\alpha\beta$ ERKO und ARKO Mäusen untersucht und anhand der Unterschiede zu Wildtyp Mäusen, die Funktion von ER α und ER β definiert. Bereits durch dieses Tiermodell wurde deutlich, dass der ER α der dominante Rezeptor im Uterus ist und der ER β im Ovar dominiert. Mit der Entwicklung der ER selektiven Agonisten wurde die nächste Ebene der Forschung erreicht, in der nun die selektive Beeinflussung von ER α und ER β in Wildtyp Tieren vorgenommen werden konnte und durch die Verabreichung verschiedener Substanzkonzentrationen eine dosisabhängige Intervention erreicht wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war 1. die eigenen Ergebnisse an den in der Literatur vielseitig diskutierten Erkenntnissen über die Östrogenrezeptoren zu messen und zu vergleichen und durch den Einsatz der ER α und ER β Agonisten zum weiteren Verständnis der Östrogenrezeptoren beizutragen. 2. sollte die Beeinflussung des Organismus durch die eingesetzten ER α und ER β Agonisten, hier in Ovar und Uterus, untersucht und daraus potenzielle Indikationen abgeleitet werden. 3. galt es, die Wirkungsweise der ER α und ER β Agonisten zu charakterisieren. Um diese Ziele zu erreichen, wurden die Effekte der ER α und ER β Agonisten auf den folgenden verschiedenen Ebenen getestet. Als Endprodukt östrogenen Effekte wurden die Organgewichte von Ovar und Uterus herangezogen, sowie die für Veränderungen des Gewichts verantwortliche Morphologie der Organe. Um diese Veränderungen zu verstehen und Ursachen für diese zu finden, wurden tiefere Ebenen untersucht. Zur Beurteilung der Morphologie waren Zeichen der Proliferation und verminderten Atresie sowie das histologische Bild die Indikatoren für östrogene Wirkungen. Als Mediator dieser Effekte war im Bereich der Proteinsynthese die Regulation der Östrogenrezeptoren von Bedeutung und auf der letzten Ebene die über die Östrogenrezeptoren beeinflussten Parameter, wie der Progesteronrezeptor, die Inhibin α Untereinheit, das AMH, das CRABP II und die Prosatzyklin Synthese.

Durch den Einsatz des ER α Agonisten konnte im Ovar keine bedeutungsvolle Funktion für den ER α entdeckt werden. Der ER α nimmt nicht Teil an der Vermittlung von östrogenen

Effekten wie Gewichtserhöhung, Proliferationssteigerung, Atresieverminderung und Induktion von Follikulogenese. Bei Funktionen auf der Proteinebene kann dem ER α ein negativer Einfluss auf die Expression des eigenen Rezeptors und die Prostazyklin Synthese eingeräumt werden. Wirkungen auf andere Regulatoren endokriner Prozesse, wie die Inhibin α Untereinheit, das AMH und CRABP II konnten nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der ER α im Ovar eine untergeordnete Rolle spielt und dieses Organ für pharmokotherapeutische Interventionen mit dem ER α Agonisten kaum Raum für Indikationen bietet.

Der Uterus ist bekannt dafür, dass der ER α für die Vermittlung von trophischen Effekten verantwortlich ist. Das Wirkprofil des ER α Agonisten ist dosisabhängig und führte zu einem signifikanten Gewichtsanstieg. Aufgrund der Ausbildung von sekretorisch aktiven, hochprismatischen Epithelzellen im Endometrium kam es zu einer gesteigerten Epithelhöhe. Eine mittlere Dosis führt zur Steigerung der Proliferation im Endometriumepithel und zur Verlagerung von ER α und PR in die Peripherie (Stroma und Myometrium). Gleichzeitig ist die Expression dieser beiden Rezeptoren in den Epithelien vermindert. Ein überhöhtes Hormonangebot am ER α mündet 1. in Inhibition der Epithelzellproliferation und 2. einer fast in allen Gewebekompartimenten des Uterus nicht mehr nachweisbaren ER α Expression. Neben der Dominanz des ER α bei der Regulation der untersuchten Parameter im Uterus, konnte gezeigt werden, dass der PR und ER α gewebespezifisch reguliert sind. Supraphysiologische Hormonkonzentrationen scheinen durch vermindert exprimierten ER α selbstregulierend auf denselbigen zu wirken und so vor fortschreitenden östrogenen Effekten zu schützen.

Durch den Einsatz des ER β Agonisten wurde deutlich, dass dieser im Ovar der dominante Rezeptor ist und eine verstärkte Expression mit gesteigerter Follikelreifung einhergeht. Dabei beginnen mehr Follikel mit dem Wachstum, es erreichen mehr Follikel spätere Reifestadien und es werden weniger atretisch. Resultierend daraus ist der ER β verantwortlich für ein gesteigertes Ovargewicht, eine größere Anzahl proliferierender Zellen und weniger Anzeichen von Apoptose. Die Inhibin α Untereinheit wird als Marker für Granulosazellwachstum durch den ER β positiv reguliert. Das Anti-Müllerian Hormon, bekannt als Inhibitor von Follikelwachstum, wird vor allem in präantralen und antralen Follikeln geringer exprimiert. Das CRABP II als Marker für Retinsäure produzierende Zellen wurde durch den ER β Agonisten verstärkt gebildet, was auf eine Stimulation der Retinsäureproduktion hindeutet. Die Inhibition der Prostazyklin Synthese durch beide

Östrogenrezeptoren kann auf unterschiedliche Angriffspunkte der Regulation hindeuten. Die physiologische Rolle der Prostaglandin Synthase im Ovar gilt es in Zukunft weiter aufzuklären.

Im Uterus konnte durch den ER β kein östrogenen Effekt vermittelt werden. Die Morphologie des Uterus und die Expression von Proliferationsmarkern und Rezeptoren wurde durch den ER β Agonisten nicht beeinflusst. In der aktuellen Literatur diskutierte Hypothesen über mögliche Interaktionen zwischen dem ER β und anderen Rezeptoren konnten hier nicht bestätigt werden.

Sicherlich stellt die Auswahl, der hier untersuchten ER β regulierten Gene nur eine kleine Auswahl derer dar, die an dem Prozess der ovariellen Follikelreifung bis hin zur Ovulation beteiligt sind. Unabhängig hiervon konnte an vielen Eckpunkten die Regulation über den ER β , mit einhergehender Stimulation der Follikelreifung erreicht werden. Die untergeordnete Bedeutung des ER α für das Ovar und der große Einfluss des ER β , prädestiniert dieses Organ als potentiell Ziel für ER β selektive Pharmazeutika.

F Literaturverzeichnis

1. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
2. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
3. Parker, M.G., *Structure and function of estrogen receptors*. Vitam Horm, 1995. **51**: p. 267-87.
4. Murdoch, F.E. and J. Gorski, *The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression*. Mol Cell Endocrinol, 1991. **78**(3): p. C103-8.
5. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett, 1996. **392**(1): p. 49-53.
6. Kuiper, G.G.J.M., et al., *Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors {alpha} and {beta}*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-870.
7. Webb, P., et al., *Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 443-56.
8. Sukovich, D.A., R. Mukherjee, and P.A. Benfield, *A novel, cell-type-specific mechanism for estrogen receptor-mediated gene activation in the absence of an estrogen-responsive element*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7134-43.
9. Weigel, N.L. and Y. Zhang, *Ligand-independent activation of steroid hormone receptors*. J Mol Med, 1998. **76**(7): p. 469-79.
10. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
11. Fitzpatrick SL, F.J., Sindoni DM, Stevis PE, Deecher DC, Babat AR, Merchenthaler I, Frail DE, *Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary*. Endocrinology, 1999. **140**: p. 2581-2591.
12. Palter, S.F., et al., *Are estrogens of import to primate/human ovarian folliculogenesis?* Endocr Rev, 2001. **22**(3): p. 389-424.
13. Mowa, C.N. and T. Iwanaga, *Developmental changes of the oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of the rat--an analysis by in situ hybridization*. J Endocrinol, 2000. **167**(3): p. 363-9.
14. Cooke, P.S., et al., *Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6535-40.
15. Buchanan, D.L., et al., *Tissue compartment-specific estrogen receptor-alpha participation in the mouse uterine epithelial secretory response*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 484-91.
16. Sar, M. and F. Welsch, *Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary*. Endocrinology, 1999. **140**(2): p. 963-71.
17. Hiroi, H., et al., *Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus*. J Mol Endocrinol, 1999. **22**(1): p. 37-44.
18. Shughrue, P.J., et al., *Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract*. Steroids, 1998. **63**(10): p. 498-504.
19. Byers, M., et al., *Estrogen Receptor-{beta} mRNA Expression in Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(2): p. 172-182.
20. Couse, J.F., et al., *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in*

- the wild-type and ERalpha-knockout mouse*. Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4613-21.
21. Saunders, P.T., et al., *Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry*. J Endocrinol, 1997. **154**(3): p. R13-6.
 22. Kurita, T., et al., *Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. Biol Reprod, 2001. **64**(1): p. 272-83.
 23. Frasor, J., et al., *Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus*. Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3159-66.
 24. Kang, J.S., et al., *Expression of estrogen receptor alpha and beta in the uterus and vagina of immature rats treated with 17-ethinyl estradiol*. J Vet Med Sci, 2003. **65**(12): p. 1293-7.
 25. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11162-6.
 26. Enmark, E. and J.A. Gustafsson, *Oestrogen receptors - an overview*. J Intern Med, 1999. **246**(2): p. 133-8.
 27. Ogawa, S., et al., *Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene*. Neuroendocrinology, 1996. **64**(6): p. 467-70.
 28. Bocchinfuso, W.P., et al., *Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice*. Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2982-94.
 29. Iafrati, M.D., et al., *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice*. Nat Med, 1997. **3**(5): p. 545-8.
 30. Korach, K.S., et al., *Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes*. Recent Prog Horm Res, 1996. **51**: p. 159-86; discussion 186-8.
 31. Kregge, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15677-82.
 32. Gustafsson, J.A., *Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action*. J Endocrinol, 1999. **163**(3): p. 379-83.
 33. Couse, J.F., et al., *Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta*. Science, 1999. **286**(5448): p. 2328-31.
 34. Fisher, C.R., et al., *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene*. PNAS, 1998. **95**(12): p. 6965-6970.
 35. Findlay, J.K., et al., *The road to ovulation: the role of oestrogens*. Reprod Fertil Dev, 2001. **13**(7-8): p. 543-7.
 36. Saiduddin, S. and H.P. Zassenhaus, *Estradiol-17beta receptors in the immature rat ovary*. Steroids, 1977. **29**(2): p. 197-213.
 37. Richards, J.S., *Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins*. Endocrinology, 1975. **97**(5): p. 1174-84.
 38. Goldenberg, R.L., J.L. Vaitukaitis, and G.T. Ross, *Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats*. Endocrinology, 1972. **90**(6): p. 1492-8.
 39. Drummond, A.E. and J.K. Findlay, *The role of estrogen in folliculogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **151**(1-2): p. 57-64.
 40. Rao, M.C., A.R. Midgley, Jr., and J.S. Richards, *Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation*. Cell, 1978. **14**(1): p. 71-8.
 41. Kaipia, A. and A.J. Hsueh, *Regulation of ovarian follicle atresia*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 349-63.

42. Billig, H., I. Furuta, and A.J. Hsueh, *Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis*. Endocrinology, 1993. **133**(5): p. 2204-12.
43. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 200-14.
44. Lintern-Moore, S. and G.P. Moore, *The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary*. Biol Reprod, 1979. **20**(4): p. 773-8.
45. Peters, H., *The development of the mouse ovary from birth to maturity*. Acta Endocrinologica, 1969. **62**: p. 98-116.
46. Weihua, Z., et al., *Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5936-41.
47. Slayden, O.D., J.J. Hirst, and R.M. Brenner, *Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogesterin treatment*. Endocrinology, 1993. **132**(4): p. 1845-56.
48. Gerdes, J., *Ki-67: mehr als nur ein immunhistologisch einsetzbarer Proliferationsmarker*. Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie, 1997. **1**: p. 18-21.
49. Gerlach, C., et al., *Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat*. Lab Invest, 1997. **77**(6): p. 697-8.
50. Waseem, N.H. and D.P. Lane, *Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form*. J Cell Sci, 1990. **96**(Pt 1): p. 121-9.
51. Rumpel, E., H. Michna, and W. Kuhnel, *PCNA-immunoreactivity in the uterus of rats after treatment with the antiestrogen tamoxifen*. Anat Anz, 1995. **177**(2): p. 133-8.
52. Li, S., *Relationship between cellular DNA synthesis, PCNA expression and sex steroid hormone receptor status in the developing mouse ovary, uterus and oviduct*. Histochemistry, 1994. **102**(5): p. 405-13.
53. Lai, M.D., et al., *Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus*. J Endocrinol, 2000. **166**(1): p. 87-93.
54. Lundy, T., *Populations of granulosa cells in a small follicles of the sheep ovary*. Journal of Reproduction and Fertility, 1999. **115**: p. 251-262.
55. Byskov, A.G., *Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary*. J Reprod Fertil, 1974. **37**(2): p. 277-85.
56. Osman, P., *Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat*. J Reprod Fertil, 1985. **73**(1): p. 261-70.
57. Hsueh, A.J., H. Billig, and A. Tsafiri, *Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process*. Endocr Rev, 1994. **15**(6): p. 707-24.
58. Tilly, J.L., *Apoptosis and ovarian function*. Rev Reprod, 1996. **1**(3): p. 162-72.
59. Tajima, K., et al., *Effects of Ovarian Theca Cells on Apoptosis and Proliferation of Granulosa Cells: Changes During Bovine Follicular Maturation*. Biol Reprod, 2002. **66**(6): p. 1635-1639.
60. Svensson, E.C., et al., *Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1457-64.
61. Asselin, E., et al., *Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis*. Biol Signals Recept, 2000. **9**(2): p. 87-95.
62. Cho, B.N., et al., *Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit gene*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4994-5004.
63. Ling, N., et al., *Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7217-21.
64. Robertson, D.M., et al., *Isolation of inhibin from bovine follicular fluid*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **126**(1): p. 220-6.

65. Fahy, P.A., et al., *Changes in inhibin-A (alpha-beta A dimer) and total alpha inhibin in the peripheral circulation and ovaries of rats after gonadotrophin-induced follicular development and during the normal oestrous cycle*. J Endocrinol, 1995. **147**(2): p. 271-83.
66. Woodruff, T.K., et al., *Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle*. Science, 1988. **239**(4845): p. 1296-9.
67. Woodruff, T.K., et al., *Rat inhibin: molecular cloning of alpha- and beta-subunit complementary deoxyribonucleic acids and expression in the ovary*. Mol Endocrinol, 1987. **1**(8): p. 561-8.
68. Roberts, V., et al., *Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types*. Endocrinology, 1989. **125**(5): p. 2350-9.
69. Crawford, R.J., et al., *Alpha-inhibin gene expression occurs in the ovine adrenal cortex, and is regulated by adrenocorticotropin*. Mol Endocrinol, 1987. **1**(10): p. 699-706.
70. Turner, I.M., et al., *Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells*. Endocrinology, 1989. **125**(5): p. 2790-2.
71. Aloï, J.A., et al., *Ovarian inhibin subunit gene expression: regulation by gonadotropins and estradiol*. Endocrinology, 1995. **136**(3): p. 1227-32.
72. Herath, C.B., et al., *Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat*. Biol Reprod, 2001. **65**(6): p. 1623-33.
73. Lanuza, G.M., et al., *Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells*. Endocrinology, 1999. **140**(6): p. 2549-54.
74. De Jong, F.H., *Inhibin*. Physiol Rev, 1988. **68**(2): p. 555-607.
75. Ying, S.Y., *Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone*. Endocr Rev, 1988. **9**(2): p. 267-93.
76. Baird, D.T. and K.B. Smith, *Inhibin and related peptides in the regulation of reproduction*. Oxf Rev Reprod Biol, 1993. **15**: p. 191-232.
77. Schwartz, N.B. and C.P. Channing, *Evidence for ovarian "inhibin": suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by injection of porcine follicular fluid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5721-4.
78. Rivier, C., J. Rivier, and W. Vale, *Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat*. Science, 1986. **234**(4773): p. 205-8.
79. Knight, P.G. and C. Glister, *Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary*. Reproduction, 2001. **121**(4): p. 503-12.
80. McMullen, M.L., et al., *Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 5005-14.
81. Silva, C.C., N.P. Groome, and P.G. Knight, *Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes*. J Reprod Fertil, 1999. **115**(2): p. 381-8.
82. Matzuk, M.M., et al., *Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 313-9.
83. Munsterberg, A. and R. Lovell-Badge, *Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation*. Development, 1991. **113**(2): p. 613-24.
84. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
85. Pepinsky, R.B., et al., *Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment*. J Biol Chem, 1988. **263**(35): p. 18961-4.

86. Wilson, C.A., et al., *Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(2): p. 247-57.
87. Hirobe, S., et al., *Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity*. Endocrinology, 1992. **131**(2): p. 854-62.
88. Baarends, W.M., et al., *Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth*. Endocrinology, 1995. **136**(11): p. 4951-62.
89. Durlinger, A.L.L., et al., *Anti-Mullerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 1076-1084.
90. Durlinger, A.L., et al., *Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre-ovulatory follicles in the rat*. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2504-11.
91. Ueno, S., et al., *Mullerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle*. Endocrinology, 1989. **125**(2): p. 1060-6.
92. Hirobe, S., et al., *Mullerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection*. Biol Reprod, 1994. **50**(6): p. 1238-43.
93. Guerrier, D., et al., *Expression of the gene for anti-Mullerian hormone*. J Reprod Fertil, 1990. **88**(2): p. 695-706.
94. Kim, J.H., et al., *The inhibitory effects of mullerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(3): p. 911-7.
95. Seifer, D.B., et al., *Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid mullerian-inhibiting substance and androgen content*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(3): p. 711-4.
96. Durlinger, A.L., et al., *Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4891-9.
97. Behringer, R.R., et al., *Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance*. Nature, 1990. **345**(6271): p. 167-70.
98. Behringer, R.R., M.J. Finegold, and R.L. Cate, *Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development*. Cell, 1994. **79**(3): p. 415-25.
99. Durlinger, A.L., J.A. Visser, and A.P. Themmen, *Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone*. Reproduction, 2002. **124**(5): p. 601-9.
100. Durlinger, A.L., et al., *Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5789-96.
101. Thompson, J.N., *Vitamin A and Reproduction in rats*. Proc R Soc London, 1964. **B159**: p. 510-535.
102. Laurence, P.A., *Changes in serum vitamin A level during the human menstrual cycle*. Journal of Clinical Endocrinology, 1953. **13**: p. 1192-1199.
103. Ragins, A., *Variation of vitamin A fluorescence in the cyclic changes of the ovary*. Arch Pathol, 1942. **34**: p. 647-654.
104. Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. Faseb J, 1996. **10**(9): p. 940-54.
105. Zhuang, Y.H., et al., *Immunolocalization of retinoic acid receptors in rat, mouse and human ovary and uterus*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1994. **48**(1): p. 61-8.
106. Bass, N.M., *Cellular binding proteins for fatty acids and retinoids: similar or specialized functions?* Mol Cell Biochem, 1993. **123**(1-2): p. 191-202.

107. Ong, D.E., *Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins*. Nutr Rev, 1994. **52**(2 Pt 2): p. S24-31.
108. Zheng, W.L., et al., *Synthesis of retinoic acid by rat ovarian cells that express cellular retinoic acid-binding protein-II*. Biol Reprod, 1999. **60**(1): p. 110-4.
109. Zheng, W.L., et al., *Retinoic acid synthesis and expression of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein type II are concurrent with decidualization of rat uterine stromal cells*. Endocrinology, 2000. **141**(2): p. 802-8.
110. Wang, L.H. and L. Chen, *Organization of the gene encoding human prostacyclin synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(3): p. 631-7.
111. Miyata, A., et al., *Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(3): p. 1728-34.
112. Tone, Y., et al., *The regional distribution and cellular localization of mRNA encoding rat prostacyclin synthase*. Eur J Cell Biol, 1997. **72**(3): p. 268-77.
113. Magness, R.R., et al., *Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. V. Effects of ovariectomy, the ovarian cycle, and pregnancy on prostacyclin synthase expression*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **60**(4-6): p. 103-18.
114. Lim, H. and S.K. Dey, *A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors*. Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3207-10.
115. Hara, S., et al., *Overexpression of prostacyclin synthase inhibits growth of vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(3): p. 862-7.
116. Veldhuis, J.D., *Interactions among endocrine control systems in the regulation of ovarian function*. Clin Biochem, 1981. **14**(5): p. 252-7.
117. Rupnow, H.L., et al., *Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VIII. Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1, and PGIS protein expression*. Biol Reprod, 2002. **66**(2): p. 468-74.
118. Ljungkvist, I., *Attachment reaction of rat uterine luminal epithelium. 3. The effect of estradiol, estrone and estriol on the morphology of the luminal epithelium of the spayed, virgin rat*. Acta Soc Med Ups, 1971. **76**(3-4): p. 139-57.
119. Stein, B. and B. Kramer, *The effect of exogenous gonadotropic hormones on the endometrium of the rat*. J Anat, 1989. **164**: p. 123-30.
120. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Physiological action of progesterone in target tissues*. Endocr Rev, 1997. **18**(4): p. 502-19.
121. Kurita, T., et al., *Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract*. Biol Reprod, 2000. **62**(4): p. 821-30.
122. Kraus, W.L., M.M. Montano, and B.S. Katzenellenbogen, *Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(12): p. 1603-16.
123. Lydon, J.P., et al., *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev, 1995. **9**(18): p. 2266-78.
124. Velardo, J., *Steroid Hormones And Uterine Growth*. Ann New York Acad Science, 1958. **57**: p. 441-460.
125. Tibbetts, T.A., et al., *Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus*. Biol Reprod, 1998. **59**(5): p. 1143-52.
126. Kurita, T., et al., *Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus*. Biol Reprod, 2000. **62**(4): p. 831-8.
127. Parczyk, K., et al., *Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. **63**(4-6): p. 309-16.
128. Horvath, J.E., et al., *Effects of long-term treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist Decapeptyl and the LHRH antagonist Cetrorelix*

- on the levels of pituitary LHRH receptors and their mRNA expression in rats. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 15048-53. Epub 2002 Oct 30.
129. Halmos, G. and A.V. Schally, *Changes in subcellular distribution of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) after treatment with the LH-RH antagonist cetrorelix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 961-5.
130. Hegele-Hartung, C., et al., *Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5129-34. Epub 2004 Mar 22.
131. Peters, O., et al., Eur. Patent 01/04290, 2000.
132. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. J Histochem Cytochem, 1981. **29**(4): p. 577-80.
133. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies*. Am J Clin Pathol, 1981. **75**(5): p. 734-8.
134. Traish, A.M. and H.H. Wotiz, *Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide-(533-547) recognize a specific site in unactivated (8S) and activated (4S) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptors*. Endocrinology, 1990. **127**(3): p. 1167-75.
135. Groome, N., et al., *Monoclonal and polyclonal antibodies reactive with the 1-32 amino terminal sequence of the alpha subunit of human 32K inhibin*. Hybridoma, 1990. **9**(1): p. 31-42.
136. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
137. Pederson, T., *Proposal for a Classification of Oocytes and Follicles in the Mouse Ovary*. Journal of Reproduction and Fertility, 1968. **17**: p. 555-557.
138. Dunnett, C.W. and R. Crisafio, *The operating characteristics of some official weight variation tests for tablets*. J Pharm Pharmacol, 1955. **7**(5): p. 314-27.
139. Karow, L. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2003: p. 541-544.
140. Vandenbroucke, J.P., et al., *Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis*. N Engl J Med, 2001. **344**(20): p. 1527-35.
141. Kent, J., *Some effects of steroids on the immature mouse ovary in vitro*. J Reprod Fertil, 1973. **34**(2): p. 297-303.
142. Paesi, F.J., *The effect of small doses of oestrogen on the ovary of the immature rat*. Acta Endocrinol (Copenh), 1952. **11**(3): p. 251-68.
143. Williams, P.C., *Effect of Stilbestrol on the Ovaries of Hypophysectomized Rats*. Nature, 1940. **145**: p. 388-389.
144. Lunenfeld, B., Z. Kraiem, and A. Eshkol, *The function of the growing follicle*. J Reprod Fertil, 1975. **45**(3): p. 567-74.
145. Couse, J.F., et al., *Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5855-65.
146. Pencharz, R., *Effects of Estrogens and Androgens alone and in Combination with Chorionic Gonadotrophin on the Ovary of the hypophysectomized rats*. Science, 1940. **91**: p. 554-555.
147. Verpoest, W.M., et al., *Relationship between midcycle luteinizing hormone surge quality and oocyte fertilization*. Fertil Steril, 2000. **73**(1): p. 75-7.

148. Fritzemeier, K. and C. Hegele-Hartung, *In Vitro and In Vivo Models to characterise Estrogens and Antiestrogens*. Handbook of Experimental Pharmacology, Estrogens and Antiestrogens II, Springer Verlag, Berlin, 1999. **135/II**: p. 1-94.
149. Kim, I., C. Shaha, and G.S. Greenwald, *A species difference between hamster and rat in the effect of oestrogens on growth of large preantral follicles*. J Reprod Fertil, 1984. **72**(1): p. 179-85.
150. Dupont, S., et al., *Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes*. Development, 2000. **127**(19): p. 4277-91.
151. Ingram, D., *The Effect of Gonadotrophins and Estrogen on Ovarian Atresia in the Immature Rat*. J Endocrinol, 1959. **19**: p. 117 -122.
152. Mowa, C.N. and T. Iwanaga, *Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization*. J Endocrinol, 2000. **165**(1): p. 59-66.
153. Pelletier, G., C. Labrie, and F. Labrie, *Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs*. J Endocrinol, 2000. **165**(2): p. 359-70.
154. Wang, H., H. Eriksson, and L. Sahlin, *Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1331-40.
155. Drummond, A.E., A.J. Baillie, and J.K. Findlay, *Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **149**(1-2): p. 153-61.
156. Falck, B., *Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants*. Acta Physiol Scand, 1959. **47**(Suppl 163): p. 1-101.
157. Short, R.V., *Ovarian Steroid Synthesis and Secretion in Vivo*. Recent Prog Horm Res, 1964. **20**: p. 303-40.
158. Tetsuka, M., M. Milne, and S.G. Hillier, *Expression of oestrogen receptor isoforms in relation to enzymes of oestrogen synthesis in rat ovary*. Mol Cell Endocrinol, 1998. **141**(1-2): p. 29-35.
159. Cheng, G., et al., *A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary*. Biol Reprod, 2002. **66**(1): p. 77-84.
160. Bao, B., et al., *Estrogen receptor-beta expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles*. Biol Reprod, 2000. **63**(6): p. 1747-55.
161. Couse, J.F., S. Curtis Hewitt, and K.S. Korach, *Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 287-96.
162. Schomberg, D.W., et al., *Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult*. Endocrinology, 1999. **140**(6): p. 2733-44.
163. Hewitt, S.C. and K.S. Korach, *Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues*. Reproduction, 2003. **125**(2): p. 143-9.
164. Meunier, H., et al., *Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(1): p. 247-51.
165. Merchenthaler, I., et al., *Immunocytochemical localization of inhibin in rat and human reproductive tissues*. Mol Cell Endocrinol, 1987. **54**(2-3): p. 239-43.
166. Woodruff, T.K. and K.E. Mayo, *Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary*. Annu Rev Physiol, 1990. **52**: p. 807-21.

167. Schwall, R.H., et al., *Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary*. Mol Endocrinol, 1990. **4**(1): p. 75-9.
168. Jaatinen, T.A., et al., *Expression of inhibin alpha, beta A and beta B messenger ribonucleic acids in the normal human ovary and in polycystic ovarian syndrome*. J Endocrinol, 1994. **143**(1): p. 127-37.
169. Rivier, C. and W. Vale, *Immunoreactive inhibin secretion by the hypophysectomized female rat: demonstration of the modulating effect of gonadotropin-releasing hormone and estrogen through a direct ovarian site of action*. Endocrinology, 1989. **124**(1): p. 195-8.
170. Smitz, J. and R. Cortvrindt, *Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture*. Hum Reprod, 1998. **13**(4): p. 927-35.
171. Kaneko, H., et al., *Alterations in Peripheral Concentrations of Inhibin A in Cattle Studied Using a Time-Resolved Immunofluorometric Assay: Relationship with Estradiol and Follicle-Stimulating Hormone in Various Reproductive Conditions*. Biol Reprod, 2002. **67**(1): p. 38-45.
172. Smyth, C.D., et al., *Effect of inhibin immunoneutralization on steroidogenesis in rat ovarian follicles in vitro*. J Endocrinol, 1994. **140**(3): p. 437-43.
173. Albertazzi, P. and D.W. Purdie, *The life and times of the estrogen receptors: an interim report*. Climacteric, 2001. **4**(3): p. 194-202.
174. Dutertre, M., et al., *Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Mullerian hormone in transgenic mice*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 4040-6.
175. di Clemente, N., et al., *Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(8): p. 1006-20.
176. McGee, E.A., et al., *Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles*. Biol Reprod, 2001. **64**(1): p. 293-8.
177. Bucco, R.A., et al., *Inducible expression of cellular retinoic acid-binding protein II in rat ovary: gonadotropin regulation during luteal development*. Endocrinology, 1995. **136**(6): p. 2730-40.
178. Bucco, R.A., et al., *Cellular retinoic acid-binding protein(II) presence in rat uterine epithelial cells correlates with their synthesis of retinoic acid*. Biochemistry, 1997. **36**(13): p. 4009-14.
179. Wardlaw, S.A., et al., *Variable expression of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding proteins in the rat uterus and ovary during the estrous cycle*. Biol Reprod, 1997. **56**(1): p. 125-32.
180. Xing, W. and M.R. Sairam, *Retinoic Acid Mediates Transcriptional Repression of Ovine Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene via a Pleiotropic Nuclear Receptor Response Element*. Biol Reprod, 2002. **67**(1): p. 204-211.
181. Ospina, J.A., D.N. Krause, and S.P. Duckles, *17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase*. Stroke, 2002. **33**(2): p. 600-5.
182. Sherman, T.S., et al., *Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 610-6.
183. Tostes, R.C., et al., *Effects of estrogen on the vascular system*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(9): p. 1143-58.
184. Lofman, C.O., et al., *Ovulation in the isolated perfused rat ovary as documented by intravital microscopy*. Steroids, 1989. **54**(5): p. 481-90.
185. Koseki, Y., et al., *Progesterone interaction with estrogen and antiestrogen in the rat uterus--receptor effects*. Steroids, 1977. **30**(2): p. 169-77.

186. Cheng, S.V., et al., *Cell growth and cell proliferation may be dissociated in the mouse uterine luminal epithelium treated with female sex steroids*. Exp Cell Res, 1985. **160**(2): p. 459-70.
187. Hewitt, S.C., et al., *Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(10): p. 2070-83. Epub 2003 Jul 31.
188. Hosie, M.J. and C.R. Murphy, *A scanning and light microscope study comparing the effects of clomiphene citrate, estradiol 17-beta and progesterone on the structure of uterine luminal epithelial cells*. Eur J Morphol, 1995. **33**(1): p. 39-50.
189. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Contrasting phenotypes in reproductive tissues of female estrogen receptor null mice*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **948**: p. 1-8.
190. Couse, J.F., et al., *Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(11): p. 1441-54.
191. Nephew, K.P., et al., *Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types*. Biol Reprod, 2000. **62**(1): p. 168-77.
192. Zhou, Y., et al., *Regulation of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid by estradiol and progesterone in rat uterus*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **46**(6): p. 687-98.
193. Rosser, M., et al., *Changes in rat uterine estrogen receptor messenger ribonucleic acid levels during estrogen- and progesterone-induced estrogen receptor depletion and subsequent replenishment*. Biol Reprod, 1993. **48**(1): p. 89-98.
194. Freyberger, A., et al., *Differential response of immature rat uterine tissue to ethinylestradiol and the red wine constituent resveratrol*. Arch Toxicol, 2001. **74**(11): p. 709-15.
195. Murakami, R., et al., *Distribution of progestin-binding cells in estrogen-treated and untreated neonatal mouse uterus and oviduct: autoradiographic study with [125I]progestin*. Histochemistry, 1990. **94**(2): p. 155-9.
196. Carthew, P., et al., *Compartmentalized uterotrophic effects of tamoxifen, toremifene, and estradiol in the ovariectomized Wistar (Han) rat*. Toxicol Sci, 1999. **48**(2): p. 197-205.
197. Ohta, Y., T. Sato, and T. Iguchi, *Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats*. Biol Reprod, 1993. **48**(1): p. 205-13.
198. Medlock, K.L., et al., *Estradiol down-regulation of the rat uterine estrogen receptor*. Proc Soc Exp Biol Med, 1991. **196**(3): p. 293-300.
199. Cidlowski, J.A. and T.G. Muldoon, *The dynamics of intracellular estrogen receptor regulation as influenced by 17beta-estradiol*. Biol Reprod, 1978. **18**(2): p. 234-46.
200. Cidlowski, J.A. and T.G. Muldoon, *Estrogenic regulation of cytoplasmic receptor populations in estrogen-responsive tissues of the rat*. Endocrinology, 1974. **95**(6): p. 1621-9.
201. Copland, J.A., E.J. Smanik, and T.G. Muldoon, *Discrete early changes in cellular subpopulations of rat uterine and anterior pituitary estrogen receptors in response to acute exposure to exogenous estradiol*. J Steroid Biochem, 1987. **26**(6): p. 723-31.
202. Shupnik, M.A., M.S. Gordon, and W.W. Chin, *Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(4): p. 660-5.
203. Okulicz, W.C., et al., *Immunofluorescent analysis of estrogen induction of progesterone receptor in the rhesus uterus*. Endocrinology, 1989. **125**(2): p. 930-4.
204. Ing, N.H. and M.B. Tornesi, *Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells*. Biol Reprod, 1997. **56**(5): p. 1205-15.

Danksagung

Frau **Prof. C.Hegele-Hartung** danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung, welche durch zahlreiche effiziente Diskussionen mein wissenschaftliches Denken geformt hat und gleichzeitig viel Freiraum für eigenständiges Denken und Handeln zuliess. Nachdrücklich möchte ich mich bei ihr für die rege Anteilnahme an Studium und Werdegang bedanken, der durch konstruktive Ratschläge positiv beeinflusst wurde.

Herr **Dr. K.H. Fritzemeier** ermöglichte mir die weiterführende Bearbeitung interessanter Versuche. Hierfür und für die Übertragung von Kompetenzen in der Histologie danke ich ihm sehr.

Frau **Lucienne Eichbauer** möchte ich an dieser Stelle in ganz besonderer Weise meinen Dank aussprechen, denn sie hat mir durch ihr unermüdliches Engagement und ihre Hilfsbereitschaft die Methoden der Histologie und Immunhistochemie nahe gebracht, sowie sorgfältige Anleitung und Anweisung bei meinen ersten Tierversuchen gegeben. Die stets präsente Ansprechbarkeit und Anteilnahme an Doktorarbeit, Studium und Privatem sorgten im gemeinsamen Labor für eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und viele positive Erinnerungen.

Frau **Andrea Seipp** danke ich herzlich für die geduldige Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Methoden.

Frau **Angelika Esch** und Frau **Natascha Manovski** danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente.

Allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen danke ich für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt auch der Schering Aktiengesellschaft, welche diese Arbeit durch ein Doktorandenstipendium ermöglichte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Philip Siebel
Geburtsdatum:	09.03.1977
Geburtsort:	Berlin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

Apr. 2005	Anstellung als Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie im Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
Okt. 2004	Anstellung als Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin im Marien Krankenhaus Schwerte, Deutschland
Mai 2004	Ärztliche Prüfung
2000 – 2002	Werksdoktorand bei der Schering AG Berlin zur Bearbeitung der Dissertation mit dem Thema „Die Wirkung von selektiven Östrogenrezeptor α und β Agonisten auf Ovar und Uterus am Nagetier“
Apr. 1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Jun. 1996	Abitur
1994 – 1996	Beethoven Gymnasium, Berlin
1993 – 1994	Schulbesuch mit Diplom in Oklahoma, USA
1989 – 1993	Beethoven Gymnasium, Berlin
1987 – 1989	Grundschule am Königsgraben, Berlin
1983 – 1987	Alt-Lankwitzer Grundschule, Berlin