

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung der Expression ausgesuchter Kandidatengene in  
Uterus und Plazenta des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)**

–

**ein Modell für feto-maternale Interaktionen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Susanne Lier, geb. Püttmann  
Tierärztin aus Essen

Berlin 2011  
Journal-Nr.: 3495

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier  
Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Almuth Einspanier  
Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Callithrix jacchus, nitric-oxide synthase, insulin-like growth factor, estrogen receptors, uterus, placenta, mRNA, FSH, hCG

Tag der Promotion: 01.09.2011

Alle wesentlichen Dinge sind einfach, wenn man sie erst einmal begriffen hat.  
Schwierig ist nur der Weg, den man bis dahin gehen muss.

Hans Bemann, Stein und Flöte



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Der Uterus . . . . .	3
2.1.1	Anatomie und Histologie . . . . .	3
2.1.2	Veränderungen im Zyklusverlauf . . . . .	4
2.2	Die Plazenta . . . . .	6
2.2.1	Funktion . . . . .	6
2.2.2	Anatomie und Histologie . . . . .	8
2.2.3	Entstehung und Entwicklung während Gravidität und Geburt . . . . .	9
2.3	Follikel-stimulierendes Hormon - FSH . . . . .	10
2.4	Humanes Choriongonadotropin - hCG . . . . .	10
2.5	Untersuchte Faktoren . . . . .	11
2.5.1	Housekeeping-Gene . . . . .	11
2.5.1.1	18 S-rRNA . . . . .	11
2.5.1.2	Ubiquitin . . . . .	12
2.5.2	Östrogen-Rezeptoren . . . . .	12
2.5.2.1	Östrogen-Rezeptor-alpha - ER- $\alpha$ . . . . .	13
2.5.2.2	Östrogen-Rezeptor-beta - ER- $\beta$ . . . . .	14
2.5.3	Stickstoffmonoxid-Synthasen - (NO-Synthasen) . . . . .	14
2.5.3.1	eNOS (NOS3) . . . . .	16
2.5.3.2	iNOS (NOS2) . . . . .	17
2.5.4	Insulin-like growth factor-System (IGF-System) . . . . .	17
2.5.4.1	Liganden: IGF-1 und -2 . . . . .	18
2.5.4.2	IGF-Rezeptor: IGF1-R . . . . .	19
2.5.4.3	Bindungsproteine: IGFBP-1 bis -6 . . . . .	20
2.6	Tiermodell <i>Callithrix jacchus</i> (Weißbüschelaffe) . . . . .	22
2.6.1	Allgemeines zu Callithrichiden . . . . .	23
2.6.2	Weißbüschelaffen als Modelltiere in der reproduktionsbiologischen Forschung . . . . .	24

<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
3.1	Gewebe . . . . .	28
3.2	Reagenzien . . . . .	30
3.3	Lösungen . . . . .	31
3.4	Kits . . . . .	32
3.5	Enzyme . . . . .	32
3.6	Antikörper . . . . .	33
3.7	Marker . . . . .	33
3.8	Hormone . . . . .	33
3.9	Primer . . . . .	33
3.10	Verbrauchsmaterialien . . . . .	36
3.11	Geräte . . . . .	37
 <b>4</b>	 <b>Methoden</b>	 <b>38</b>
4.1	Zykluskontrolle der Tiere . . . . .	38
4.1.1	Hormonbehandlung der Tiere vor Organentnahme . . . . .	39
4.2	Organgewinnung . . . . .	39
4.3	Histologie und Immunhistochemie . . . . .	39
4.3.1	Organpräparation für Histologie und Immunhistochemie . . . . .	39
4.3.2	Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin . . . . .	40
4.3.3	Immunhistochemie . . . . .	40
4.3.3.1	Immunhistochemische Färbung von ER- $\alpha$ . . . . .	40
4.3.3.2	Immunhistochemische Färbung von eNOS und iNOS . . . . .	41
4.4	Molekularbiologie . . . . .	42
4.4.1	RNA-Extraktion . . . . .	42
4.4.2	Quantifizierung der gewonnenen RNA . . . . .	43
4.4.3	Denaturierendes RNA-Agarose-Gel . . . . .	43
4.4.4	Untersuchung der RNA-Qualität mit Hilfe des Bioanalyzers . . . . .	45
4.4.5	Reverse Transkription . . . . .	46
4.4.6	Polymerase-Kettenreaktion (konventionelle PCR) . . . . .	47
4.4.7	Auswahl primerspezifischer Temperatur-Optima mit Hilfe der Gradienten-PCR . . . . .	48
4.4.8	DNA-Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	48
4.4.9	Aufreinigung und Gewinnung der PCR-Produkte . . . . .	49
4.4.10	Sequenzierung der PCR-Produkte . . . . .	50
4.4.11	Real-Time-PCR mittels SYBR Green . . . . .	51
4.4.12	Etablierung der Primer . . . . .	52
4.4.13	Normalisierung der Ergebnisse . . . . .	53

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
5.1	Housekeeping-Gene . . . . .	57
5.1.1	18 S-rRNA . . . . .	57
5.1.2	Ubiquitin . . . . .	58
5.2	Östrogen-Rezeptoren . . . . .	59
5.2.1	ER- $\alpha$ . . . . .	59
5.2.2	ER- $\beta$ . . . . .	61
5.3	NO-Synthasen . . . . .	62
5.3.1	eNOS (NOS3) . . . . .	62
5.3.2	iNOS (NOS2) . . . . .	64
5.4	Insulin-like growth factor-System (IGF-System) . . . . .	66
5.4.1	Liganden: IGF-1 und IGF-2 . . . . .	66
5.4.1.1	IGF-1 . . . . .	66
5.4.1.2	IGF-2 . . . . .	67
5.4.2	Rezeptoren: IGF1-R . . . . .	68
5.4.3	Bindungs-Proteine: IGFBP-1 und IGFBP-2 . . . . .	69
5.4.3.1	IGFBP-1 . . . . .	69
5.4.3.2	IGFBP-2 . . . . .	70
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
6.1	Gewebe und Methodik . . . . .	72
6.1.1	Zur Normalisierung: Vorteile und Tücken . . . . .	73
6.2	Östrogen-Rezeptoren . . . . .	74
6.2.1	Östrogen-Rezeptor-alpha - ER- $\alpha$ . . . . .	75
6.2.2	Östrogen-Rezeptor-beta - ER- $\beta$ . . . . .	77
6.3	NO-Synthasen . . . . .	80
6.3.1	eNOS (NOS3) . . . . .	80
6.3.2	iNOS (NOS2) . . . . .	82
6.4	Insulin-like growth factor-System (IGF-System) . . . . .	84
6.4.1	Liganden: IGF-1 und IGF-2 . . . . .	84
6.4.1.1	IGF-1 . . . . .	84
6.4.1.2	IGF-2 . . . . .	87
6.4.2	Rezeptor: IGF1-R . . . . .	88
6.4.3	Bindungsproteine: IGFBP-1 und IGFBP-2 . . . . .	89
6.4.3.1	IGFBP-1 . . . . .	89
6.4.3.2	IGFBP-2 . . . . .	91
6.5	Ausblick . . . . .	92

<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>8 Summary</b>	<b>96</b>
<b>Literatur</b>	<b>98</b>
<b>A Anhang</b>	<b>A.1</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Verschiedene Uterusformen . . . . .	4
2	Histologischer Aufbau der humanen Plazenta . . . . .	7
3	Callithrichide Plazenta, histologischer Querschnitt . . . . .	8
4	Strukturformel von Estran (13 $\beta$ -Methyl-gonan) . . . . .	12
5	<i>Callithrix jacchus</i> . . . . .	22
6	Reproduktionstrakt des <i>Callithrix jacchus</i> . . . . .	24
7	Sexualzyklus: peripher messbare Östrogen- und Progesteronkonzentrationen von Mensch (A) und <i>Callithrix jacchus</i> (B) . . . . .	25
8	Gravidität: peripher messbare Östrogen- und Progesteronkonzentrationen von Mensch (A) und <i>Callithrix jacchus</i> (B) . . . . .	25
9	RNA-Gel-Proben der untersuchten Reproduktionsorgane . . . . .	45
10	18 S rRNA-Expression . . . . .	57
11	Ubiquitin mRNA-Expression . . . . .	58
12	Relative ER- $\alpha$ mRNA-Expression . . . . .	59
13	ER- $\alpha$ : Immunhistologische Färbung des Endometriums, gravid (links) und nicht gravid (rechts) . . . . .	60
14	Relative ER- $\beta$ mRNA-Expression . . . . .	61
15	Relative eNOS mRNA-Expression . . . . .	62
16	eNOS: Immunhistologische Färbung des Endometriums, gravid (links) und nicht gravid (rechts) . . . . .	63
17	Relative iNOS mRNA-Expression . . . . .	64
18	iNOS: Immunhistologische Färbung des Endometriums, gravid (links) und nicht gravid (rechts) . . . . .	65
19	Relative IGF-1 mRNA-Expression . . . . .	66
20	Relative IGF-2 mRNA-Expression . . . . .	67
21	Relative IGF1-R mRNA-Expression . . . . .	68
22	Relative IGFBP-1 mRNA-Expression . . . . .	69
23	Relative IGFBP-2 mRNA-Expression . . . . .	70

**Tabellenverzeichnis**

1	Vergleich der unterschiedlichen NO-Synthasen (Mensch) . . . . .	15
2	Reproduktions-Eckdaten, weiblich: Callithrix - Rhesusaffe - Pavian - Mensch	27
3	Proben des Reproduktionstrakts von <i>Callithrix jacchus</i> . . . . .	29
4	Verwendete Primer . . . . .	34
5	Annealingtemperaturen und Zykluszahlen der einzelnen Primer . . . . .	49
6	Cycling Programm der Real-Time-PCR . . . . .	52
7	Spezifische Schmelztemperaturen der einzelnen PCR-Produkte . . . . .	53
8	Für die Expressionsanalyse verwendete Gewebeproben aus dem Reproduktionstrakt von <i>Callithrix jacchus</i> . . . . .	56
9	Übersichtsdarstellung der relativen Transkriptmengen in Organen des Reproduktionstraktes von <i>Callithrix jacchus</i> . . . . .	71

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropin (Adrenocorticotropes Hormon)
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin, auch Sapropterin
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
Ca <sup>2+</sup>	Calcium, dt. Kalzium-Ionen
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary DNA, dt. komplementäre DNS
cGMP	cyclic guanosine monophosphate, dt. zyklisches Guanosinmonophosphat
CL	Corpus luteum, dt. Gelbkörper
CRH	Corticotropin-releasing-hormone, dt. Corticoliberin
CSF-1	Colony-stimulating factor-1, dt. koloniestimulierender Faktor-1
C <sub>T</sub>	Cycle Threshold, dt. Schwellenwert-Zyklus
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H <sub>2</sub> O	DEPC-behandeltes Wasser, RNase-freies Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid, dt. Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum Göttingen
dsDNA	doppelsträngige DNA
dt.	deutsch
Dtld.	Deutschland
EGF	epidermal growth factor, dt. epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS	endothelial nitric oxide synthase, dt. endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Estrogen-receptor, dt. Östrogen-Rezeptor
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGF	Fibroblast growth factor, dt. Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FMN	Flavinmononucleotid

for	forward, dt. vorwärts (RNA/DNA-Leserichtung)
FP	Follikelphase
FSH	Follicle stimulating hormone, dt. follikelstimulierendes Hormon
GH	Growth Hormone, dt. Wachstumshormon
GIT	Gastrointestinaltrakt
GnRH	Gonadotropin releasing hormone, dt. Gonadoliberin
grav.	gravid
hCG	humanes Choriongonadotropin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Horseradish-Peroxidase, dt. Meerrettich-Peroxidase
ICM	Inner Cell Mass, dt. innere Zellmasse, Embryoblast
IFN	Interferon
IGF	insulin-like growth factor, dt. insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein, dt. IGF-Bindungsprotein
IGF1/2-R	insulin-like growth factor one/two receptor, dt. IGF1/2-Rezeptor
IL-1	Interleukin-1
iNOS	inducible nitric oxide synthase, dt. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KGF	Keratinocyte growth factor, dt. Keratinozyten-Wachstumsfaktor (Synonym FGF-7)
Lfd.Nr.	laufende Nummer
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia inhibitory factor, dt. Leukämie inhibierender Faktor
Lig.	Ligamentum, dt. Band
LP	Lutealphase
LPS	Lipopolysaccharide
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
M-MuLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase, dt. Moloney Mausleukämie-Virus Reverse Transkriptase
monocl.	monoclonal, dt. monoklonal
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure (Puffer-Lösung)

---

$M_r$	relative Molekülmasse in kDa
mRNA	messenger RNA, dt. Boten-RNS
NADP	Nicotinamid adenin dinukleotid phosphat, dt. Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von NADP
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
nNOS	neuronal nitric oxide synthase, dt. neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NR3I	nuclear receptor subfamily 3, group I, dt. Kernrezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOHLA	$N^{\omega}$ -hydroxy-L-arginine
PBS	Phosphate buffered Saline, dt. Phosphat gepufferte Salzlösung
p.c.	post conceptionem, dt. nach der Empfängnis/Befruchtung
PCR	Polymerase Chain Reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank ( <a href="http://www.pdb.org">www.pdb.org</a> )
PDGF	Platelet-derived growth factor, dt. von Blutplättchen freigesetzter Wachstumsfaktor
$PGE_2$	Prostaglandin $E_2$
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
p.ov.	post ovulationem, dt. nach dem Eisprung
polycl.	polyclonal, dt. polyklonal
PR	Progesteron Receptor, dt. Progesteronrezeptor
rev	reverse, dt. rückwärts (RNA/DNA Leserichtung)
RIN	RNA Integrity Number, Wert zwischen 1 und 10, der die Integrität der RNA über die RNA-Kettenlängen berechnet
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonucleic acid, dt. Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion
SH	Schleimhaut

---

SHBG	Sex hormone-binding globulin, dt. sexualhormonbindendes Globulin
TGF	Transforming growth factor, dt. transformierender Wachstumsfaktor
TNF <sub>α</sub>	Tumornekrosefaktor-α
TRH	Thyreotropin releasing hormone, dt. auch Thyreoliberin
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon, dt. auch Thyreotropin
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor, dt. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
d	Tag
Da	Dalton, entspricht $1,6601 \times 10^{-27}$ kg
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
IE	Internationale Einheiten
kb	Kilobase
l	Liter
M	Molar, mol/l
m	Meter
min	Minuten
S	Svedberg
s	Sekunden
T	Temperatur
U/min	Drehzahl, Umdrehungen pro Minute engl. Rotations/Revolutions per Minute, rpm
V	Volt

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Gebärmutter (Uterus) und der Mutterkuchen (Plazenta) aller Säugetiere spielen als zentrale Organe der Entwicklung neuen Lebens eine herausragende Rolle. Aus diesem Grund sind diese Organe seit jeher im Blickpunkt der Reproduktionsforschung.

Das intakte und fein abgestimmte Zusammenspiel von mütterlichem Organismus und dem Fremdorganismus des Konzeptus ist von essentieller Bedeutung bei Entstehung, Aufrechterhaltung und erfolgreichem Abschluss einer Trächtigkeit und damit der wichtigen Aufgabe des Fortbestehens der eigenen Art. Schon die erfolgreiche Implantation, bei der der Konzeptus sich zunächst an das maternale Endometrium anlagert, um dann in dieses einzudringen, erfordert einen Umbau des Stromas, seine Dezidualisierung sowie Angiogenese und die Modulation des Immunsystems [47]. Die von beiden Seiten zu erbringenden metabolischen- und immunologischen Leistungen sind enorm und gehen mit ausgeprägten Gewebe-, Hormon- und Sekretionsveränderungen einher. Die ablaufenden Prozesse stehen unter besonderer endokriner Kontrolle und setzen die Expression spezifischer Faktoren voraus. Imbalancen der Genexpression sind damit eine mögliche Ursache für die Beeinträchtigung einer Trächtigkeit oder sogar deren Abbruch. Gerade bei der Spezies Mensch sieht sich die Forschung mit der insgesamt sehr schnell wachsenden Weltbevölkerung einerseits und den individuellen Infertilitätsproblemen einzelner Paare andererseits konfrontiert [59, 123, 124]. Die Möglichkeit der In-Vitro-Fertilisation ist heute zur Schlüsselmethode in der Behandlung von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch geworden. Auch wenn die Rate der initial erfolgreichen Befruchtungen relativ hoch ist, ist die Zahl der tatsächlich erfolgreichen Konzeptionen, welche in einer Schwangerschaft und einem ausgetragenen Kind enden, noch immer relativ niedrig [7, 124]. Obwohl die hormonelle Regulation der Fortpflanzung und die sexuelle Differenzierung der Gewebe seit Jahrzehnten bekannt und weitgehend erforscht sind, sind evolutionäre und molekulare Mechanismen häufig kaum geklärt. Untersuchungen zur Genexpression bestimmter Faktoren und ihr Einfluss auf die Implantation und den Verlauf einer Trächtigkeit wurden und werden vorrangig an Nagern und Schweinen untersucht, da auf der Ebene der humanen Reproduktionsbiologie sowohl Gewebeproben als auch Probanden aus ethischen Gründen in nur sehr geringer Zahl oder gar nicht zur Verfügung stehen. Häufig können mit der Erforschung der üblicherweise genutzten Spezies die Fragen nach den molekularen Mechanismen beim Menschen jedoch nur unzureichend beantwortet werden - dafür ist das reproduktive System von Mensch und etwa Nagetier zu unterschiedlich. Die Untersuchung des Fortpflanzungssystems des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) hat bereits in der Vergangenheit das wissenschaftliche Verständnis um die Reproduktion des Menschen erweitert, da diese Tiere dem Menschen phylogenetisch deutlich näher stehen als die oben genannten Versuchstiere. Beim Weißbüschelaffen handelt es sich um einen ursprünglich in Südamerika beheimateten,

vergleichsweise kleinen Neuweltaffen, der eine relativ kurze Fortpflanzungsdauer hat und einfach zu halten ist, was ihn für diverse Felder der biomedizinischen Forschung besonders interessant macht [123]. Diese Affen sind aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit im Zyklus- und Hormonprofil in der reproduktionsbiologischen Forschung für den Menschen als Modell anerkannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Machbarkeitsstudie zur Untersuchung der Genexpression ausgewählter Faktoren in an der Reproduktion beteiligten Organen im Weißbüschelaffen. Es soll untersucht werden, ob diese Faktoren an der fetal-maternalen Interaktion eine Rolle spielen könnten, inwiefern sich die Expression im Verlauf eines Zyklus/der Trächtigkeit verändert und welche Gewebe sich zu einer genaueren Analyse eignen. Die mRNA-Expression bestimmter Faktoren soll an Uteri in toto und an Endometriums-Stanzen in bestimmten Zyklus- oder Trächtigkeitsphasen sowie in Plazenten untersucht werden. Dazu sollen neben den relativ konstant transkribierten Housekeeping-Genen 18 S-rRNA (Svedberg) und Ubiquitin die folgenden Faktoren untersucht werden: 1.) ER- $\alpha$  und - $\beta$  (Estrogen-Rezeptor), welche Rezeptoren für 17- $\beta$ -Östradiol (Östrogen) darstellen und Genexpressionen kontrollieren bzw. initiieren, 2.) die Stickstoffmonoxid-produzierenden Enzyme eNOS (endothelial Nitric Oxid Synthase) und iNOS (inducible NOS) sowie 3.) Faktoren der Insulin-like-growth-factor-Achse, für die bereits in vielen anderen Zusammenhängen ein Einfluss auf Wachstum und Differenzierung von Geweben nachgewiesen wurde: IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), IGF-2, IGFBP-1 (IGF-Binding Protein), IGFBP-2 sowie IGF1-R (IGF1-Rezeptor). Die Transkript-Konzentrationen werden mittels Real-Time-PCR (Polymerase Chain Reaction) quantifiziert und mit Hilfe der Housekeeping-Gene normalisiert. Zur Verifikation der gemessenen mRNA-Konzentrationen und zur genaueren Lokalisation der Faktoren ER- $\alpha$ , eNOS und iNOS werden zusätzlich immunhistologische Färbungen angefertigt. Für den Nachweis eines kurzfristigen Einflusses von Sexualsteroiden sind einige der Tiere vor der Organentnahme mit humanem Choriongonadotropin (hCG) oder Follikelstimulierendem Hormon (FSH) behandelt worden. Zusätzlich wurden Sequenz-Vergleiche zu vorliegenden humanen und callithrichiden Genabschnitten gezogen und deren Homologie bestimmt.

Durch die in dieser Arbeit ermittelten Expressionsdaten der verschiedenen Faktoren soll ein erster Einblick in die Genexpression potentiell wichtiger Proteine der Fortpflanzung des Weißbüschelaffen in Uterus und Plazenta gewonnen werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Uterus

Der Uterus (Gebärmutter) ist das weibliche Geschlechtsorgan, in dem sich die befruchteten Eizellen zum geburtsreifen Fetus entwickeln [109]. Alle weiblichen Säugetiere (Mammalia) besitzen eine Gebärmutter. Sie dient dem Schutz und der Entwicklung der Frucht und am Ende der Trächtigkeit der Austreibung derselben. Die Implantation des Konzeptus setzt einen adäquat entwickelten Keimling und ein rezeptives Endometrium voraus, welches durch endo- und parakrine Faktoren vorbereitet wurde [46]. Sofern nicht besonders bezeichnet, werden im Folgenden zunächst die menschlichen Verhältnisse dargelegt.

#### 2.1.1 Anatomie und Histologie

Die Entwicklung des Embryo ist zunächst bei beiden genetischen Geschlechtern gleich, das Geschlechtssystem bisexuell angelegt [40, 74]. Die primitiven Gonozyten (Primordialkeimzellen) aus dem Dottersack wandern in die Genitalleiste (Keimleiste/Crista gonadalis) ein, die zur Keimfalte wird und aus der eine paarige Keimdrüsenanlage entsteht. Die weiblichen Geschlechtsorgane entstehen aus den Müllerschen Gängen (Paramesonephrische Gänge). Bei höheren Säugetieren kommt es zu einer schrittweisen Verschmelzung und Differenzierung der paarigen paramesonephrischen Gänge von kaudal nach kranial [135]. Je nach Aufbau und Form wird die Gebärmutter wie folgt benannt (siehe Abbildung 1): Uterus duplex (z.B. Kaninchen), bicornis (z.B. Fleischfresser) oder simplex (z.B. Mensch, Callithrichiden) [10, 173]. Der Uterus simplex ist dadurch charakterisiert, dass die Fusion der Uterushörner direkt am Übergang zum Eileiter stattgefunden hat, sodass faktisch keine Hörner mehr sichtbar sind [160, 167]. Größe, Form, Lage und Struktur des Uterus variiert in Abhängigkeit von Alter, Trächtigkeit, Gesundheits- und Zykluszustand eines Lebewesens [74].

Der Uterus des geschlechtsreifen Menschen ist ein komplexes, etwa birnenförmiges muskuläres Organ, dessen schmales Ende nach kaudo-dorsal gerichtet ist [17, 26, 74, 109, 186]. Das nichtgravide Cavum uteri ist spaltförmig, etwa dreieckig und 6-8 cm lang [26, 50, 74, 109]. Am Uterus des Menschen werden makroskopisch folgende Abschnitte unterschieden: Corpus mit Fundus und Isthmus als eigentlicher Uterus sowie die Zervix (der Gebärmutterhals) [17, 21, 109, 135]. Die Zervix stellt den Übergang zur Vagina und den Abschluß des Uterus nach außen dar [74].

Histologisch gesehen ist der Uterus wie alle Hohlorgane aus drei Schichten aufgebaut [74]: Die äußere Oberfläche des Uterus wird von einer Serosa bedeckt, während seine Innenseite aus glandulärem Gewebe und Epithel (Endometrium) aufgebaut ist. Zwischen beiden

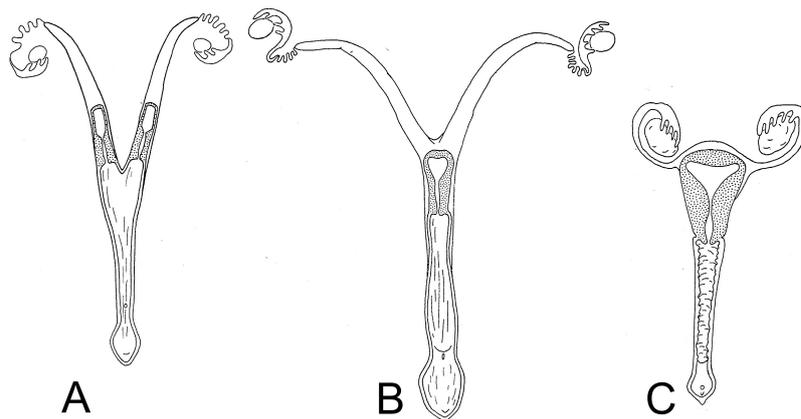


Abbildung 1: **Verschiedene Uterusformen** [modifiziert aus 160]

A: Uterus duplex, Vagina simplex; B: Uterus bicornis; C: Uterus simplex

Schichten befindet sich ausgeprägtes Muskelgewebe (Myometrium) [17, 109]. Das Endometrium besteht aus mehreren Schichten: Der Zona compacta aus eng gepacktem Stroma, Epithel und Drüsenhälsen und der Zona spongiosa, welche ein eher lockeres Stroma zwischen den Drüsenkörpern aufweist. Sie bilden gemeinsam die bei der Frau etwa 8 mm dicke Zona functionalis, die zyklusabhängigen Veränderungen unterliegt [10, 157]. Unter der Zona functionalis befindet sich die Zona basalis (etwa 1 mm) [10, 69, 157]. Diese konstant vorhandene Zone liegt mit ihren eng gepackten Stromazellen wiederum dem Myometrium auf und dient der Regeneration der darüberliegenden Schichten [10].

### 2.1.2 Veränderungen im Zyklusverlauf

Uterus und Zervix sind als eine relative Einheit zu verstehen und unterliegen beide den hormonellen Einflüssen des uterinen Zyklus [116]. Die zyklischen Veränderungen des Endometriums werden von der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse gesteuert [17]. Der menschliche Zyklus dauert im Durchschnitt etwa 28 Tage, wobei man beim Menschen den ersten Tag der Menstruation als ersten Zyklustag definiert [109]. Bei *Callithrix jacchus* wurde in unseren Untersuchungen der Tag der Prostaglandinabgabe als Tag 0 des Folgezyklus gewertet. Eine Unterteilung des menschlichen Zyklus kann wie folgt stattfinden:

In der **Desquamations-Regenerations-Phase** (Tag 1 bis 4) befindet sich der Gelbkörper (Corpus luteum, CL) des letzten Zyklus in Rückbildung und hat die Progesteron-Synthese eingestellt [109]. Das im vorherigen Zyklus aufgebaute luminale Gewebe (Zona functionalis) des Endometriums ist durch intermittierende Minderdurchblutung geschädigt und wird abgestoßen, so dass nur die Zona basalis zurückbleibt [17, 109]. Bei der Frau wird das geschädigte Gewebe mit der Menstruationsblutung ausgeschieden, während bei den meisten Haustieren

eine Resorption der im Ganzen nicht so stark proliferierten Schleimhaut zu beobachten ist [40]. Bereits in dieser Phase findet eine erste Regeneration des Gewebes, ausgehend von den Stromazellen der Zona basalis statt [17]. Das auf einen GnRH-Reiz (Gonadotropin Releasing Hormone) ansteigende hypophysäre Hormon FSH (Follikel stimulating hormone) bewirkt an den Granulosazellen des Ovars die Rekrutierung einer neuen Kohorte Follikel und stimuliert außerdem die Expression von LH-Rezeptoren (Luteinizing hormone) in der Plasmamembran der Follikelzellen [17, 40, 104]. Die im Ovar befindlichen Granulosazellen dieser neuen Follikel synthetisieren langsam ansteigende Mengen Östrogen [40].

Die sich anschließende **Proliferations-Phase** (Follikelphase) umfasst in etwa die Tage 5 bis 15 des menschlichen Zyklus und ist geprägt durch einen deutlichen Östrogen-Anstieg, welcher am Ende dieser Phase über einen positiven Feedbackmechanismus einen LH-Peak bewirkt, der die Ovulation auslöst [17]. Zunächst findet unter dem gegebenen dominierenden Östrogen-Einfluss eine proliferative Entwicklung des Endometriums (Zona functionalis) statt: Die zunächst gestreckten und verengten uterinen Drüsen werden zunehmend spiralig [116], die myometrialen Spiralarterien wachsen zum Teil in das Endometrium ein und das Bindegewebe zeigt seine Aktivierung in einer erhöhten Mitoserate sowie vermehrter Fibrillen- und Grundsubstanzbildung [109]. In dieser Phase kann auch eine vermehrte Östrogen-Rezeptor-Expression im Endometrium festgestellt werden, die jedoch nach der Ovulation in Abhängigkeit der Progesteron-Konzentration wieder abnimmt [17]. Etwa in der Mitte der Follikelphase wird in der Regel ein einzelner Follikel unabhängig von der FSH-Zufuhr und entkommt so der Regression, der die anderen Follikel anheimfallen [16, 17]. Dieser dominante Follikel synthetisiert schlussendlich solch hohe Mengen Östrogen, dass er einen plötzlichen LH-Anstieg auslöst welcher wiederum zur Ovulation führt [16].

Während der auf die Ovulation folgenden **Sekretionsphase** (Gestagene Phase, Tage 15 bis 28) transformieren sich die Granulosazellen des eröffneten Follikels in Progesteron sezernierende Lutealzellen [16]. Das sezernierte Progesteron führt am proliferierten Endometrium zu einer vermehrten Sekretion und zu einer Entspannung der Uterusmuskulatur [17, 40]. Das vom Endometrium abgegebene Sekret stellt die Grundlage für Implantation und Dezidualisierung sowie zur Ernährung des Konzepts dar und wird daher auch als Uterinmilch oder Embryotrophe bezeichnet [40, 116, 156]. Die neben der Uterinmilch sezernierten Substanzen wie z.B. Prolaktin, Relaxin, Renin, IGFs, TGFs (Transforming growth factor) beeinflussen das Wachstum und die Differenzierung des Epithels. Viele dieser Faktoren werden zusätzlich in Zellen des Myometriums exprimiert [74]. Die sekretorische Kapazität des Endometriums wird an den stark geknäuelten und gefüllten Drüsen zunehmend auch histologisch sichtbar [116]. Das Maximum an sekretorischer Aktivität wird um die Tage 20 bis 22 des Zyklus gemessen [17, 109]. Auch die Vaskularisation und die Dicke des Gewebes nehmen weiter zu [17]. Gegen Ende des Zyklus (Tag 25) wandeln sich die Bindegewebszellen

nahe der Schleimhautoberfläche in große Pseudodeciduazellen um: Die sogenannte Zona compacta entsteht [17]. Bei der Frau konnte außerdem eine ausgeprägte Östrogenbiosynthese nachgewiesen werden [40].

Sofern keine Konzeption und Implantation erfolgt, führt ein Abfall der FSH- und LH-Spiegel zusammen mit dem vom Endometrium gebildetem Prostaglandin- $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) zum graduellen Untergang des CL und damit zum Versiegen der Progesteron- und Östrogen-Synthese [17, 116]. Die niedrige Progesteron-Konzentration führt wieder zu einem Anstieg des FSH-Spiegels, die Zona spongiosa verliert an Flüssigkeit, was die prämenstruelle Schrumpfung der Schleimhaut einleitet [109]. Daneben kontrahieren sich die Blutgefäße, was eine ischämische Gewebeschädigung, eine Freisetzung proteolytischer Enzyme und eine Infiltration durch weiße Blutzellen zur Folge hat [109]. Die am Tag 28 stattfindende erneute Erweiterung der Blutgefäße führt letztendlich zu Blutungen in das geschädigte Gewebe und zur Desquamation des Stratum functionale (= Tag 1 des neuen Zyklus) [109]. Hat jedoch eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle stattgefunden, bildet der entstandene Embryo nun bereits Choriongonadotropine (hCG), welche das Fortbestehen des Gelbkörpers und damit die Schwangerschaft sichern [17, 109].

## **2.2 Die Plazenta**

Bei der Plazenta handelt es sich um ein Organ, welches aus embryonalem und mütterlichem Gewebe im Uterus entsteht. Sie kommt bei allen weiblichen höheren Säugetieren (Eutheria), einigen Beutelsäugetieren (Metatheria) und bei den lebendgebärenden Hammerhaien während der Gravidität vor.

### **2.2.1 Funktion**

Die Plazenta erfüllt in der Hauptsache zwei Funktionen: einerseits als hormonbildendes Organ, andererseits als Plazentaschranke, welche den mütterlichen und kindlichen Organismus trennt, jedoch den Übertritt von im Blut gelösten Substanzen zum Teil ermöglicht und damit die Versorgung des Konzeptus sicher stellt. Anders als alle anderen menschlichen Organe, die erst nach einer ausreichenden Entwicklungs- und Reifungsperiode ihre Funktion aufnehmen, muss die Plazenta nicht nur ihr eigenes Wachstum steuern und bereits parallel dazu ihre volle Funktionstüchtigkeit entwickeln, um den spezifischen Bedürfnissen des Fetus nachzukommen, sondern sie wird auch als einziges Organ während jeder Gravidität erneut gebildet [12, 153]. Die Plazenta wird kurz nach der Geburt der Frucht als Nachgeburt abgestoßen.

Die Plazenta dient der Versorgung des Embryos mit Nährstoffen, der Entsorgung von Stoffwechselprodukten und stellt den Gasaustausch sicher [12]. Zu diesem Zweck wächst

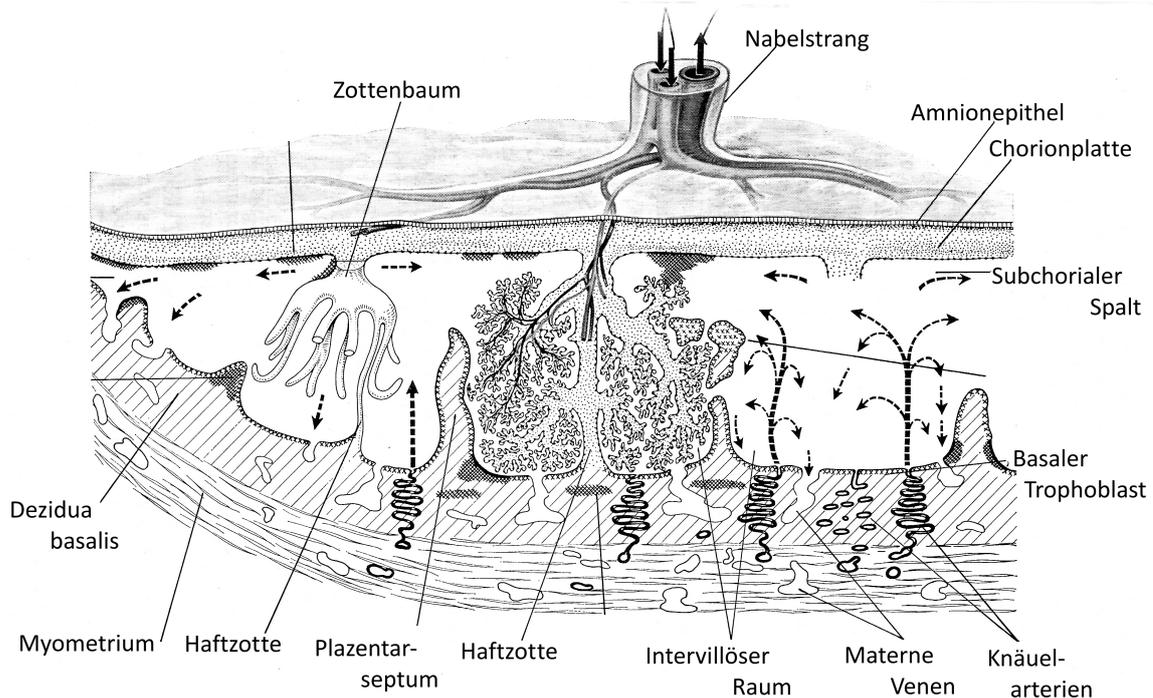


Abbildung 2: **Histologischer Aufbau der humanen Plazenta** [nach 109]

das embryonale Gewebe tierartsspezifisch unterschiedlich weit in die Schleimhaut des Uterus ein und nimmt einen engen Kontakt mit dem maternalen Zirkulationsgewebe auf. In der Plazenta des Menschen und der Affen wird auch die Wand der maternalen Kapillaren vom Chorionepithel abgebaut. Die Chorionzotten dieser sogenannten Placenta haemochorialis tauchen direkt in maternale Blutsinus ein [12, 154, 156]. Die hormonelle Aufgabe der Plazenta besteht zunächst in der Unterstützung, später der Übernahme der Aufgaben von Hypophyse und Ovar, indem sie Choriongonadotropine, Östrogene und Progesteron sowie auch Inhibin produziert [17, 83, 156]. Bereits 8 Wochen post conceptionem ist die Plazenta die Hauptquelle von Progesteron und Östrogenen [17, 221]. Etwa im vierten Schwangerschaftsmonat ist sie in der Lage, die hormonelle Sicherung der Gravidität allein zu übernehmen [109]. Die Plazenta ist jedoch ein imperfektes endokrines Organ, das für einige Schritte der Hormonsynthese auf die Syntheseleistung der fetalen Nebennierenrinde angewiesen ist [156, 221]. Diese beim Menschen und Primaten nachgewiesene wechselseitige Synthese führte zum Konzept der *Fetoplazentären Einheit*, welches jedoch nur bedingt auf andere Spezies übertragen werden kann [156].

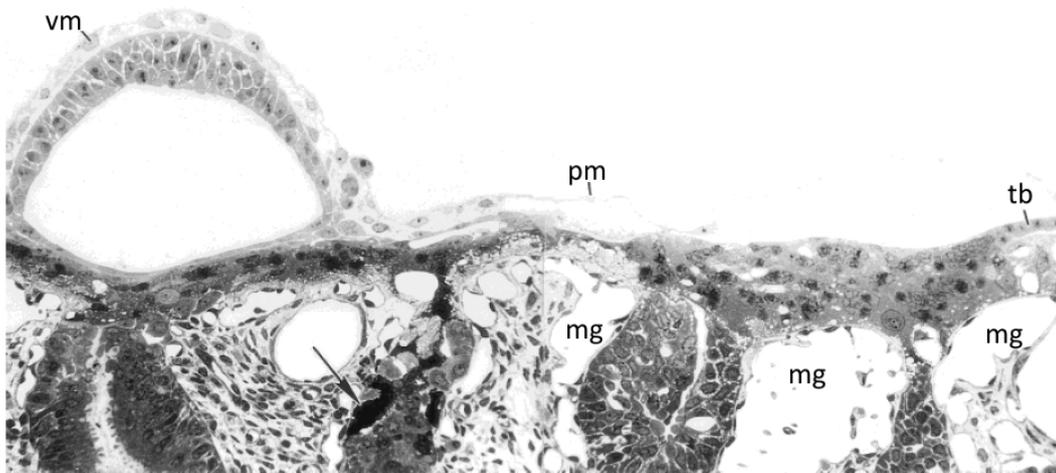


Abbildung 3: **Callithrichide Plazenta, histologischer Querschnitt**; 260-fache Vergrößerung, Implantationsstelle am Tag 13 der Trächtigkeit, Amnionhöhle am linken Bildrand, der Synzytiotrophoblast hat das uterine Epithel zu einem großen Teil aufgelöst/zerstört, die maternalen Blutgefäße sind erweitert. vm = viszerales Mesoderm, pm = parietales Mesoderm, tb = kapsulärer Trophoblast, mg = maternale Gefäße, [nach 51]

### 2.2.2 Anatomie und Histologie

Kommt es zur Befruchtung der Eizelle und damit zur Ausbildung einer Blastozyste, so setzen Mechanismen ein, um die Entwicklung des Embryos zu sichern. Während des ersten Trimesters führt das Drüsenepithel des Endometriums seine sekretorische Aktivität zunächst fort [17]. Die veränderte Uterusschleimhaut heißt jetzt Dezidua (lat. für *hinfallige Haut*), weil sie mit der Geburt des Konzeptus ebenfalls abgestoßen wird [109].

Der maternale Anteil der bei Mensch und Primat scheibenförmigen Plazenta wird von der Dezidua basalis gebildet. Sie bildet unter anderem halbhohe Septen in Richtung der fetalen Chorionplatte, was zur Bildung kleinerer Abschnitte, der sog. Plazentome führt. Das Chorion (äußere Fruchthöhle des Embryos) trägt eine basale, tellerförmige Zottenplatte, die den deutlich umfangreicheren fetalen Anteil der Plazenta ausmacht. Die Plazentazotten des fetalen Anteils tragen in ihrem Inneren fetale Blutgefäße und mesenchymales Bindegewebe. Der spaltförmige intervillöse Raum zwischen fetalem und maternalem Anteil ist mit mütterlichem Blut gefüllt. So liegen zwischen den vom Fetus gebildeten Kapillaren in den Chorionzotten und dem maternalen Blut nur wenige Zellschichten: der Synzytiotrophoblast samt seiner Basallamina, das Zottenstroma und das Endothel der fetalen Kapillare mit ihrer Basallamina (Plazentaschranke) [109]. Bei Menschen und Primaten besteht die Plazentaschranke also aus einem rein fetalen Anteil, daher auch die Bezeichnung der **Plazenta haemochorialis**: Die Chorionzotten flutieren direkt im maternalen Blut (siehe Abbildungen 2 und 3).

### 2.2.3 Entstehung und Entwicklung während Gravidität und Geburt

Bei Nagern und Primaten etabliert sich das Implantations-Fenster unter Östrogen-Einfluss in einem Endometrium, welches vorher unter Progesteron-Einfluss stand [95]. Hearn (1983) wies in seinen Forschungen nach, dass humanes Choriongonadotropin (hCG) ein essentielles Hormon für die Implantation ist [84]. Die Möglichkeit zur erfolgreichen Implantation besteht beim Menschen nur in einem effektiven Zeitraum von etwa 3-4 Tagen, je nach Autor an den Zyklustagen 16-19 [17] bzw. um den Tag 21 [109]. Dies bedeutet, dass die Implantation etwa am 5.-6. Tag p.c. mit dem Ende der Wanderung der Blastozyste im Uterus und dem Schlupf aus der Zona pellucida beginnt.

Die Blastozyste geht in mehreren Phasen eine enge Verbindung mit dem Endometrium ein: Während der **Apposition** nimmt die frisch geschlüpfte Blastozyste eine erste, lose Verbindung zum luminalen Uterusepithel auf, um dann in der **Adhäsions**-Phase an den Mikrovilli des Trophoblasten hängen zu bleiben [17]. Während der **Penetration** passiert die nun stationäre Blastozyste das Uterusepithel und dessen Basallamina, um endlich im Zuge der sogenannten **Invasion** das Stroma und die endometrialen Blutgefäße zu erreichen [17, 166]. Die gesunde Blastozyste differenziert sich in den Embryoblasten (innere Zellmasse, ICM), aus dem sich der eigentliche Embryo entwickelt, die Blastozystenhöhle und den Trophoblasten, der die Grundlage für das Chorion und die Plazenta fetalis darstellt [167]. Die Zellen des Trophoblasten wiederum proliferieren und teilen sich in einen inneren Zytotrophoblasten und äußeren Synzytiotrophoblasten [160]. Lange Ausstülpungen des Synzytiotrophoblasten wachsen zwischen den uterinen Zellen ein und trennen das mütterliche Gewebe unter anderem mit Hilfe von  $TNF_{\alpha}$  (Tumor necrosis factor) auf [17]. Während und nach der Implantation des Keimes verstärkt das Endometrium unter dem bleibenden Progesteron- und dem vom Konzeptus ausgehenden hCG-Einfluss die Vorgänge der Sekretionsphase. Es findet eine Umwandlung der Prädezidua-Zellen in große, glykogenreiche Deziduazellen statt [109]. Die Veränderungen am Endometrium dienen einerseits der erfolgreichen Implantation des Konzeptus, andererseits sollen sie das maternale Gewebe vor der massiven Invasivität desselben schützen [10]. Dezidua-Zellen sind endokrinologisch aktiv [10]. Menschen, Primaten und Nager gehören zum interstitiellen/invasiven Implantationstyp, bei dem der embryonale Synzytiotrophoblast ganz in das stark durchblutete mütterliche Bindegewebe eindringt [153]. Zu diesem Zweck schütten die Trophoblastzellen proteolytische Enzyme aus, welche Strukturproteine des Bindegewebes der Schleimhaut auflösen (z.B. Matrix degrading enzymes) [154]. Der Vorgang wird durch die Endometriumszellen aktiv unterstützt. Die Oberfläche des Trophoblasten bildet zum Zeitpunkt der Implantation rundum Zotten, die zunächst als Primärzotten rein epithelialer Natur sind, dann einen Mesenchymkern ausbilden und als Sekundärzotten bezeichnet werden [109]. Etwa 12-15 Tage p.c. dringen die ersten fingerarti-

gen Zotten des Synzytiotrophoblasten zunächst in das Endothel kleiner maternalen Venen ein [17]. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte der Austausch von Nährstoffen nur durch Diffusion [154]. Um den Tag 20 p.c. enthalten die Tertiärzotten fetale Blutgefäße [109], wenig später penetrieren sie auch die kleinen maternalen Spiralarterien [17]. Die Nährstoffversorgung des Konzeptus ist damit gesichert.

### 2.3 Follikel-stimulierendes Hormon - FSH

FSH, auch Follitropin genannt, ist ein sogenanntes Gonadotropin [8, 122]. Es wird von den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens (der Adenohypophyse) gebildet [8, 105]. FSH ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30-40 kDa [105, 122]. Strukturell besteht das heterodimere FSH aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit [122], welche beim Menschen aus jeweils 89, respektive 111 Aminosäuren zusammengesetzt sind [53]. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird identisch auch in weiteren Hormonen wie humanem Choriongonadotropin (hCG), luteinisierendem Hormon (LH) und Thyreotropin (TSH) der jeweiligen Spezies gefunden. Im Gegensatz dazu ist die Struktur der  $\beta$ -Untereinheit nicht nur spezies-, sondern auch hormonspezifisch [8]. Sie wird für die Hormonwirkung verantwortlich gemacht [122]. Obwohl es in der Hormonstruktur speziesspezifische Unterschiede gibt, trifft dies nicht auf die Wirkung des Hormons zu, so dass auch artfremd eingesetztes FSH eine typische Wirkung zeigt [8].

Wirkungsort dieses Hormons sind beim weiblichen Säugetier die Granulosazellen der Follikel, wo es Follikelwachstum und -reifung und die Induktion von LH-Rezeptoren hervorruft, während es bei männlichen Tieren die Spermatogenese anregt [8, 40, 105]. FSH wird nach Stimulation durch GnRH pulsatil sezerniert. Es wird nicht in der Hypophyse gespeichert, sondern sofort nach der Synthese in das Blut freigesetzt. Die FSH-Sekretion kann durch Inhibin und Östradiol selektiv gehemmt werden [8]. Weitere Wirkungen von FSH wurden bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

### 2.4 Humanes Choriongonadotropin - hCG

Auch bei hCG handelt es sich um ein Gonadotropin [8, 122]. Im Gegensatz zu FSH wird dieses Hormon jedoch nicht zyklisch durch die Adenohypophyse, sondern während einer Schwangerschaft durch die trophoblastischen Zellen des Chorions in der Plazenta gebildet und ist für die Erhaltung der Schwangerschaft verantwortlich [105, 122]. Die Fähigkeit zur Bildung von Choriongonadotropinen wurde bisher ausschließlich bei Primaten und Equiden nachgewiesen [8]. Das strukturell dem LH sehr ähnliche heterodimere Peptidhormon besteht aus einer hCG-spezifischen  $\beta$ -Untereinheit mit 145 Aminosäuren und einer weniger

spezifischen  $\alpha$ -Untereinheit aus 92 Aminosäuren, welche, wie bereits erwähnt, auch in den Hormonen FSH, LH und TSH vorkommt. Das intakte Molekül hat ein Molekulargewicht von 36,7 kDa [8].

Die Funktion des hCG wird in der Stimulation der Progesteron-Produktion durch das Corpus luteum [8] und der Vorbereitung des Uterus auf die Nidation der Blastozyste gesehen. Progesteron wiederum unterstützt die Proliferation der Uterusschleimhaut und unterdrückt über ein negatives Feedback auf die Hypophyse indirekt die Follikulogenese. In der Veterinärmedizin wird humanes Choriongonadotropin für ein breites Spektrum an Indikationen verwendet, unter anderem im Rahmen von Stimulationstests zum Nachweis hCG-responsiver Zellen/Organe, zur Brunstinduktion, zur Stärkung des Corpus luteum post inseminationem beim Rind oder auch zur Behandlung von Ovarialzysten [197]. Bei der Anwendung des Hormons bei Säugetieren überwiegt eine LH-ähnliche Wirkung neben einer geringen FSH-Wirkung, weshalb es häufig zur Ovulationsinduktion verwendet wird [8, 105, 122, 146]. Vgl. auch Kapitel 2.1.2.

## 2.5 Untersuchte Faktoren

### 2.5.1 Housekeeping-Gene

**2.5.1.1 18 S-rRNA** Die 18 S-rRNA ist ein essentieller Bestandteil der eukaryotischen Ribosomen. Ribosomen sind Komplexe aus Proteinen und rRNA, die im Zytoplasma und am rauhen Endoplasmatischen Retikulum aller Lebewesen zu finden sind. Die Aufgabe der Ribosomen besteht in der Translation von mRNA in Aminosäure-Sequenzen, welches ein zentraler Schritt in der Proteinbiosynthese der Zelle ist [15]. Ein Ribosom (80 S, relative Molekülmasse ( $M_r$ ) = ca. 4200 kDa) ist aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten (60 S und 40 S) zusammengesetzt [113]. Die 60 S-Untereinheit besteht ihrerseits aus der 28 S-, 5,8 S- und der 5 S-rRNA-Untereinheit sowie 49 Proteinen, während die 40 S-Untereinheit die 18 S-rRNA und weitere 33 Proteine enthält [15, 113]. Die Aufgabe der rRNA in den Ribosomen besteht in der Katalyse der ribosomalen Proteinbiosynthese durch die Knüpfung der Peptidbindungen. Der Bedarf einer Zelle an rRNA ist sehr hoch [113].

Da die 18 S-rRNA als Bestandteil der Ribosomen zur essentiellen Ausstattung einer jeden Zelle gehört, wird das entsprechende Gen auch als Housekeeping-Gen bezeichnet. Housekeeping-Gene werden v.a. in der Real-Time-PCR zur Normalisierung der gemessenen mRNA-Konzentrationen anderer Faktoren genutzt, auch wenn die Validität dieser Methode immer wieder diskutiert wird [193, 213]. Siehe hierzu auch Kapitel 4.4.13.

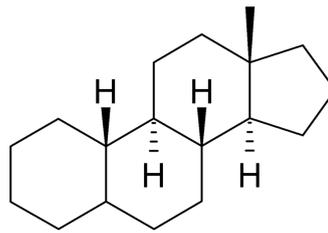


Abbildung 4: **Strukturformel von Estran (13 $\beta$ -Methyl-gonan)**

**2.5.1.2 Ubiquitin** Das Ubiquitin ist ein kleines Polypeptid aus 76 Aminosäuren mit einer relativen Molekülmasse von 8,5 kDa, welches bei allen Eukaryoten ubiquitär zu finden ist [15, 53, 113]. Es wurde erstmals 1975 während der Reinigung von Polypeptidhormonen aus dem Thymus isoliert [53]. Das Protein ist hochkonserviert: die Primärstruktur bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unterscheidet sich nur in 3 von 76 Aminosäuren von der des Menschen (96 % der DNA-Sequenz sind identisch) [15, 145]. Ubiquitin selbst hat kaum direkten Einfluss auf die Physiologie der Zelle. Die wohl bekannteste Aufgabe des Proteins ist die N-terminale Ubiquitinierung zur Kennzeichnung von beschädigten oder nicht mehr benötigten Proteinen, damit sie nachfolgend durch Proteasome abgebaut werden [15, 53, 113]. Neben der Markierung von Proteinen für den Abbau kann die posttranslationale Protein-Modifikation durch Ubiquitin aber auch andere Ziele zum Zweck haben, so z.B. eine veränderte Funktion oder Lokalisation in der Zelle, der Signaltransduktion oder der Halbwertszeit des Proteins [113].

Aus den genannten Aufgaben des Ubiquitins lässt sich, ähnlich wie bei der 18 S-rRNA, die Notwendigkeit der Anwesenheit des Proteins für die Lebensfähigkeit jeder Zelle ableiten, weshalb Ubiquitin ebenfalls als Housekeeping-Gen bezeichnet wird. Durch die quantitative Messung dieser mRNA besteht die Möglichkeit einer Normalisierung der gemessenen Konzentrationen anderer Faktoren, allerdings mit entsprechender Diskussion der Validität der Methode [193, 213]. Siehe hierzu auch Kapitel 4.4.13.

## 2.5.2 Östrogen-Rezeptoren

Östrogene gehören als Liganden der Östrogen-Rezeptoren zu den wichtigsten weiblichen Sexualhormonen aus der Klasse der Steroidhormone [221]. Ihr Grundgerüst ist Estran (13 $\beta$ -Methyl-gonan) (siehe Abbildung 4), ein Cyclopentanoperhydrophenanthren mit 18 Kohlenstoff-Atomen, welche drei 6er Ringe und einen 5er Ring bilden. Die Moleküle sind lipophil, können passiv durch Plasmamembranen diffundieren und haben eine hohe Affinität zu den zugehörigen intrazellulären Rezeptoren [15, 176, 219]. Bei der Frau werden drei verschiedene Östrogen-Derivate mit identischer biologischer Aktivität, aber unterschiedlich

ausgeprägter Potenz, unterschieden: Östradiol-17 $\beta$  (E2), Östron (E1) und Östriol (E3) [221]. Ihr Hauptproduktionsort liegt in den Granulosazellen der Ovarien und während der Gravidität in der Plazenta [113, 176, 219]. Die zentrale Aufgabe von Östrogen liegt in der Stimulation der zellulären Proliferation und des Wachstums von Organen des Reproduktionstraktes [17].

Östrogen-Rezeptoren (ER) gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren NR3I (nuclear receptor subfamily 3, group I) [17, 39, 176, 219]. Die Rezeptoren sind als Homodimer, also als ein Komplex aus zwei identischen Bestandteilen aktiv. In dieser Form translokieren die Rezeptoren nach erfolgreicher Ligandenbindung in den Zellkern, wo sie mit speziellen steroidresponsiven Elementen am Chromatin und den Promotor-Regionen interagieren und eine schnelle Transkription spezifischer Gene induzieren, so dass bereits wenige Stunden nach der Translokation eine vermehrte DNA-Synthese nachweisbar ist [17, 113]. Das heißt die wichtigste Funktion des Östrogen-Rezeptors ist die eines DNA-bindenden Transkriptionsfaktors, der die Genexpression von Zielgenen reguliert [112, 176]. Die Expression von Steroidrezeptoren ist insofern von besonderem Interesse, da sie den Schlüssel zur Fähigkeit des Endometriums darstellen, sich zyklusabhängig zu entwickeln. Diese Rezeptor-Expression variiert je nach Zyklusstand [189] und ist in der glandulären Zone des Endometriums anders als im Stroma: Makker und Singh wiesen bei fertilen Frauen Östrogen-Rezeptoren ausschließlich in Stroma-, nicht jedoch in den glandulären Epithelzellen nach [124]. Die ausgeprägteste ER-Expression kann bei der Frau in der proliferativen und frühen sekretorischen Phase nachgewiesen werden, während nach der Ovulation die Rezeptorkonzentration progesteronabhängig wieder sinkt [17, 36, 147]. Snijders et al. postulieren, dass die durch sie festgestellte vermehrte Östrogen-/Progesteron-Rezeptor Expression während der proliferativen Phase ggf. durch die lokal erhöhten Östrogen-Konzentrationen hervorgerufen werden [178]. Bis heute wurden zwei Östrogen-Rezeptoren, ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  entdeckt.

**2.5.2.1 Östrogen-Rezeptor-alpha - ER- $\alpha$**  Dieser „klassische“ Östradiolrezeptor- $\alpha$  besteht aus 595 Aminosäuren [113], sein kodierender Genabschnitt enthält 9 Exons [117]. Er ist auf dem Chromosom 6 kodiert [52]. Das entstehende Protein hat eine Größe von 65 kDa, welche sich auf 6 Domänen (A-F) verteilen [117]. Der Abschnitt E, welcher für die Bindung des Steroids zuständig ist, bildet eine hydrophobe Tasche mit hoher Affinität zu 17 $\beta$ -Östradiol [117]. Wichtige Lokalisationen der ER- $\alpha$ -Expression sind die uterinen Arterien, das Stroma des Myometriums, die epithelialen Zellen des Ovidukts und des Uterus [117]. Löffler beschreibt sie im Endometrium, in Mammatumorzellen und im Stroma der Ovarien [113].

Hewitt et al. konnten an ER- $\beta$ -Knockout-Mäusen feststellen, dass die durch 17 $\beta$ -Östradiol induzierten Genexpressionen bzw. Veränderungen im Uterus vorrangig durch ER- $\alpha$  verursacht werden [88]. Zuvor wurde demonstriert, dass ER- $\alpha$  notwendig für eine erfolgreiche Implantation sind [89].

**2.5.2.2 Östrogen-Rezeptor-beta - ER- $\beta$**  Auch wenn scheinbar die meisten Effekte von 17 $\beta$ -Östradiol durch ER- $\alpha$  vermittelt werden, so darf ein möglicher Effekt durch ER- $\beta$  nicht unterschätzt werden. Die grundsätzlichen molekularen Mechanismen, mit denen ER- $\beta$  seine biologischen Effekte erzielt, sind denen von ER- $\alpha$  sehr ähnlich [117]. Der prinzipielle Aufbau des Rezeptors gleicht dem von ER- $\alpha$  und zeigt die ausgeprägteste Homologie in den Abschnitten, welche für die Steroid-Bindung (etwa 55 % Übereinstimmung) und die Interaktion mit der DNA zuständig sind (etwa 96 % Übereinstimmung) [52, 176]. Der kodierende Genabschnitt für ER- $\beta$  befindet sich auf dem Chromosom 14 und besteht aus den sechs Domänen A-F, enthält jedoch nur 8 Exons [52]. Das entstehende Protein enthält 530 Aminosäuren [113]. Lindzey und Korach konnten nachweisen, dass ER- $\beta$  und ER- $\alpha$  auch Heterodimere bilden und in dieser Form funktionieren können [117].

ER- $\beta$ -Homologe wurden mittlerweile in vielen Spezies festgestellt, z.B. in Ratten [106], Mäusen [198], Menschen [52, 131] und Callithrichiden [64]. Noch im Jahre 2000 hielten Weihua et al. die genaue Funktion von ER- $\beta$  für unbekannt [210]. Die dazugehörige mRNA wurde bei der Frau zu jedem Zyklusstand überwiegend im Epithel der Drüsen, aber auch in den Stroma-Zellen und in der glatten Muskulatur gefunden [126, 178]. Löffler schreibt, dass ER- $\beta$  vorwiegend in den Follikelgranulosazellen, aber auch in den Nieren, der Darmmukosa, Knochenmark, Knochen, Gehirn, Endothelzellen und der Prostata zu finden ist [113].

### 2.5.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen - (NO-Synthasen)

Stickstoffmonoxid-Synthasen, kurz NO-Synthasen (NOS), sind Enzyme, die die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der essentiellen Aminosäure L-Arginin katalysieren [140, 171, 200, 202, 211]. NO ist im Organismus in Abhängigkeit von Zielstruktur und Konzentration an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge beteiligt [2]. NO-Synthasen wurden in Säugetieren, Fischen, Vögeln, Invertebraten, Pflanzen, aber auch in manchen Bakterien nachgewiesen [118]. Bei Säugetieren sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden (s. Tabelle 1) [140]:

- nNOS (NOS1): *neuronal* NO-Synthase
- iNOS (NOS2): *induzierbare* NO-Synthase

- eNOS (NOS3): *endotheliale* NO-Synthase

Die aus den Gensequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen der drei unterschiedlichen Isoenzyme sind innerhalb einer Spezies zu etwa 50-60 % homolog, während die Homologie desselben Isoenzym zwischen unterschiedlichen Spezies bei über 90 % liegt [209, 211]. Alle drei Isoformen haben eine hohe Sequenz-Homologie zur Cytochrom-P450-Reduktase [184, 212].

Parameter	nNOS (NOS1)	iNOS (NOS2)	eNOS (NOS3)
Ca <sup>2+</sup> -CaM-Abhängigkeit	abhängig	unabhängig	abhängig
Anzahl Exons	29	26	26
Anzahl Introns	28	25	25
Gen-Größe	>200 kbp	37 kbp	21-22 kbp
Chromosomale Lokalisation	12q24.2-12q24.3	17cen-q11.2	7q35-7q36
Aminosäuren	1434	1153	1203
Proteingröße	161 kDa	131 kDa	133 kDa
Vorkommen	konstitutiv, löslich, v.a. Zytosol	v.a. nach Induktion, löslich, v.a. Zytosol	konstitutiv, i.d.R. membran- assoziiert

Tabelle 1: **Vergleich der unterschiedlichen NO-Synthasen (Mensch)**  
nach [4, 5, 29, 41, 66, 78, 99, 125]

Die Enzyme sind nur als Homodimere aktiv [4, 143], wobei jedes Monomer aus zwei großen Domänen besteht, zwischen denen sich eine Bindungsstelle für Calmodulin (CaM) befindet. NO-Synthasen benötigen gleichzeitig fünf prostetische Gruppen/Co-Faktoren für ihre Enzymaktivität: Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN), Häm, Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und Ca<sup>2+</sup>-CaM [125, 169, 211]. Das gemeinsame Produkt der NO-Synthasen ist das farblose, gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) [151], welches eine chemische Verbindung aus Stickstoff und Sauerstoff darstellt. Bei dem Molekül handelt es sich um ein kleines, hochreaktives, kurzlebige Radikal [4, 183] mit einer Halbwertszeit von 3 bis 12 s [200]. Das elektrisch neutrale Molekül kann frei durch zytosolische und membranöse Kompartimente diffundieren [41]. Dixit und Parvizi und andere postulierten, dass Stickstoffmonoxid das einzig bisher bekannte Radikal ist, welches unter biologischen Bedingungen eine ausreichende Stabilität besitzt, um sowohl intra- als auch extrazellulär als Botenstoff zu fungieren [4, 41, 183]. Das in zahlreichen Organsystemen unter Vermittlung von NO-Synthasen

entstehende Molekül induziert in bestimmten Nerven Erregungsübertragung, in Immunzellen und Epithelien zytotoxische Reaktionen und Apoptose, Gewebe-Umbau, in Blutgefäßen Vasodilatation und damit auch eine Blutdrucksenkung und ist in der Lage, die Plättchen-Aggregation zu inhibieren [2, 171, 200]. Einige dieser Vorgänge treten auch während der Etablierung einer Schwangerschaft auf und die Beteiligung von NO an der Embryogenese und Trächtigkeit bei Säugetieren konnte bei vielen Labortierarten nachgewiesen werden [31, 141, 149]. Auch das Endometrium des Menschen exprimiert NO-Synthasen [103].

Bereits vor einigen Jahren wurden erste Untersuchungen über die Beteiligung von NOS am Reproduktionsgeschehen durchgeführt, so wurde z.B. nachgewiesen, dass eNOS und iNOS beim Menschen progesteronabhängig in den Blutgefäßen und in Stroma- und Dezidualzellen des Endometriums hochreguliert werden [22, 191, 200, 202, 220]. In den Implantationszonen von Mäusen und anderen Nagern konnte eine erhöhte Konzentration von eNOS und iNOS nachgewiesen werden [30, 72, 149]. Da die Implantation mit einer entzündungsähnlichen Reaktion verglichen werden kann, ist es möglich, dass NO das Verbindungsglied zwischen den vermehrt auftretenden Leukozyten, der Dezidualisierung und der erfolgreichen Implantation ist [171]. Einige Studien an Tieren stellten außerdem fest, dass NO während der Trächtigkeit sowohl im Myometrium als auch in der Plazenta vermehrt exprimiert wird. Daher vermuten die Autoren einen Zusammenhang mit der Ruhigstellung des Uterus während der Trächtigkeit und der Kontrolle des utero-feto-plazentären Blutflusses [22, 115]. Da nNOS ausschließlich im ZNS vorkommt, wurde in dieser Arbeit nur eNOS und iNOS untersucht.

**2.5.3.1 eNOS (NOS3)** eNOS wurden zunächst vorrangig in den Endothelzellen von Blutgefäßen nachgewiesen, was zu ihrer Namensgebung geführt hat [140]. Bei dieser Synthese handelt es sich um ein in der Regel membranständiges Enzym (zu etwa 90 %) [140], welches in Endothel- und in vielen anderen Zellen konstitutiv vorliegt [61, 200]. Durch ihr konstitutives Vorliegen in der Zelle sind die Enzyme in der Lage, sehr schnell auf veränderte Situationen zu reagieren [9, 120]. Unter anderem wurde sie in Lunge, Gehirn, Niere, Leber, Gastrointestinaltrakt und in Organen des Reproduktionstraktes (Hoden und Zervix) nachgewiesen [140]. eNOS werden im menschlichen Endometrium vorrangig in der Lutealphase in den Epithelzellen der Drüsen und der Gefäße festgestellt [30].

Die Enzyme werden vorrangig durch die reversibel an das Protein gebundene prostetische Gruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (welche zur Überführung des Enzym-Komplexes in die aktive Form nötig ist) [14, 200], aber auch durch diverse Lipidmodifikationen, Phosphorylierungen, Protein-Protein-Interaktionen sowie über ihre Lokalisation in der Zelle reguliert [61, 140]. Die Bioverfügbarkeit wird weiterhin durch das Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau bestimmt [140].

**2.5.3.2 iNOS (NOS2)** Die frei im Zytosol vorhandenen iNOS liegen eher selten konstitutiv vor. Ihre Aktivität ist nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM abhängig [14, 200] und wird vorrangig auf transkriptionaler Ebene reguliert [2]. Genau wie die anderen NO-Synthasen synthetisieren iNOS erst NO, nachdem sie Homodimere gebildet haben [121]. Im Gegensatz zu anderen NOS-Isoformen sind einmal gebildete iNOS-Dimere immer aktiv. Zwar bindet iNOS CaM, es ist aber unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [121, 211]. Die Synthese bindet CaM so eng, dass der Faktor eher als Protein-Untereinheit denn als prostetische Gruppe angesehen wird [41]. Die Aktivität der iNOS ist also kaum reguliert, so dass es nach Exprimierung zu einer schnellen, starken und langanhaltenden NO-Synthese kommt [14], welche bis zu 1000-fach höher sein kann, als durch die Aktivierung der konstitutiven Formen erreichbar wäre [218]. In dieser hohen Konzentration wirkt NO zytotoxisch gegen Bakterien und Parasiten, ist virostatisch, kann Apoptose auslösen und dient damit z.B. den Makrophagen zur Immunabwehr [218]. In ruhenden Immunzellen sind keine oder nur sehr geringe Konzentrationen der iNOS nachweisbar [119, 121]. Ausgelöst wird die iNOS-Expression meist durch Zytokine (z.B.  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , Interleukin- $1\beta$ ), sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), welche in der Lage sind, die iNOS-Dichte in Zellen des unspezifischen Immunsystems, aber auch in Epithel-, Endothel- und glatten Muskelzellen zu erhöhen [14, 121, 168, 183, 206]. LPS z.B. stimuliert eine iNOS-Transkription innerhalb von 2 bis 4 Stunden, nach 6 Stunden sind erste Translationen nachweisbar [41, 121].

Im menschlichen Uterus wurde iNOS im Epithel des Endometriums während der Menstruation, in immunkompetenten Zellen und in dezidualisierten Stromazellen nachgewiesen [30].

#### **2.5.4 Insulin-like growth factor-System (IGF-System)**

Bei dem System der insulin-like growth factors (IGFs) handelt es sich um ein komplexes endo- und parakrines Kommunikationssystem der Körperzellen untereinander. Beim Menschen wurden bisher zwei Liganden (IGF-1 und -2), zwei Rezeptoren (IGF1-R und IGF2-R) und mindestens sechs Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6) gefunden. Weiterhin gibt es einige Proteasen, die bevorzugt IGFs abbauen. IGFs sind Wachstumsfaktoren, deren Wirkung und die dafür notwendigen Rezeptoren in bisher fast allen Zellen des Körpers nachgewiesen werden konnten, im Uterus konnten die Komponenten des IGF-Systems in besonders reichlicher Menge nachgewiesen werden [79]. Die Aufgabe der IGFs ist die Vermittlung der östrogen- und progesteronabhängigen Entwicklung und Differenzierung der Reproduktionsorgane während des Fortpflanzungszyklus und die fetal-maternale Kommunikation während der Implantation [79].

**2.5.4.1 Liganden: IGF-1 und -2** Im komplexen System der IGF-Achse gibt es 2 Liganden, IGF-1 und -2, welche die Botenstoffe dieses verzweigten Kommunikationssystems sind. Bei ihnen handelt es sich um relativ einfache Polypeptide mit einer namensgebenden Sequenzhomologie zu Insulin (55 % Homologie zu Proinsulin), weiterhin zeigen sie etwa 70 % Homologie untereinander [79, 100]. Die im Blutserum messbaren IGF-Level werden vorrangig durch die Leber nach einer Stimulation durch GH (Growth Hormone) sezerniert [79]. Zusätzlich werden IGF-1 und -2 durch viele andere Zellen synthetisiert und lokal in das Interstitium abgegeben [32, 110]. Einfluss auf die lokale Wirkung der Botenstoffe hat einerseits die Expression von IGF-1 und -2, andererseits auch die Modulierung ihrer Bioverfügbarkeit durch IGF-BPs und Proteasen, sowie das Vorhandensein der nötigen Zellrezeptoren [79]. Den systemisch sezernierten IGFs wird eine Beteiligung an normaler Entwicklung und Wachstum zugeschrieben, während die auf para- und autokrinen Wege wirkenden IGFs unter anderem für die Embryogenese und die Regulierung des embryonalen Wachstums wichtig sein könnten [79, 110]. Sowohl IGF-1 als auch IGF-2 werden im Reproduktionszyklus erwachsener Tiere exprimiert. Während der Perimplantationsphase und der maternalen Erkennung der Trächtigkeit konnte eine organisierte Expression von IGF-1 und -2 sowohl im Endometrium als auch im Embryo nachgewiesen werden, das spezifische Expressions-Muster variierte jedoch deutlich zwischen den unterschiedlichen Spezies [79].

**Insulin-like growth factor 1 - IGF-1** Beim insulin-like growth factor 1 handelt es sich um ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 7,6 kDa. Das Protein besteht aus 70 Aminosäuren in einer einzelnen Kette mit drei Disulfid-Brücken und ist beim Menschen auf dem Chromosom 12 kodiert. IGF-1 entfaltet seine biologische Wirkung durch Bindung an den IGF1-R und den Insulinrezeptor, nicht jedoch am IGF2-R [53].

Als Hauptaufgabe wird IGF-1 die Regulation von physiologischen, aber auch pathologischen Zuständen zugeschrieben, vor allem in der Zellproliferation und in der Apoptosehemmung. Bei der messbaren Konzentration von IGF-1 im Blut von Menschen wurden unter anderem Abhängigkeiten von Tageszeit, Alter, Fitness, ethnischem Hintergrund, Body-Mass-Index (BMI) und Östrogen-Status nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Pubertät festgestellt, während sie während der Kleinkindphase und im hohen Alter minimal waren. Dies führte zu der Erkenntnis, dass IGF-1 vor allem für die Wachstumsmaximierung in dieser Phase verantwortlich ist [15]. Im Reproduktionstrakt scheint die Expression von IGF-1 vorrangig im Myometrium lokalisiert zu sein, ist aber auch im Endometrium vorhanden [79]. Das Auftreten von IGF-1 im Uterus ist stark abhängig von Östrogen; daher wird dieser Wachstumsfaktor als wichtiger Mediator von östrogenabhängigem Wachstum und Differenzierung während des Zyklus bezeichnet [79]. Die Relevanz des IGF-1 zeigt sich z.B. in Knockout-IGF-1-Mäusen: diese zeigen neben einer Hypoplasie des uterinen Myo-

metriums noch weitere pathophysiologische Veränderungen in der Reproduktion [79]. Strowitzki konnte in einer in vitro-Studie feststellen, dass Progesteron die IGF-1-Rezeptoren in Stromazellen indirekt durch eine erhöhte autokrine IGF-1-Sekretion herabreguliert. Dies wiederum führt zu einer verringerten IGF-1-Bindung, welche für den Dezidualisierungsprozess charakteristisch ist [182].

Eine in der Schwangerschaft des Menschen festgestellte Erhöhung der maternalen IGF-1-Konzentration hat keinen direkten Einfluss auf das Wachstum des Fetus, da IGF-1 die Plazentaschranke nicht überquert [83].

**Insulin-like growth factor 2 - IGF-2** Der insulin-like growth factor 2 hat eine Länge von 67 Aminosäuren und eine relative Molekülmasse von 7,5 kDa [53]. Auch er verfügt über drei intramolekulare Disulfidbrücken [53]. Während IGF-1 nur an den IGF1-R und den Insulinrezeptor bindet, bindet IGF-2 zusätzlich an den Rezeptor IGF2-R. IGF-2 wird, im Gegensatz zum proliferativen Faktor IGF-1, eine Rolle in der frühen Zellentwicklung des Nervensystems und der Knochen besonders in der Fetalphase zugeschrieben [53, 80, 82]. Seine Wirkung ist insgesamt spezifischer als die des IGF-1. Neben seinen Aufgaben in der frühen Entwicklung konnte festgestellt werden, dass IGF-2 ebenfalls essentiell für die Entwicklung und dauerhafte Funktion einiger Organe wie z.B. Gehirn, Leber oder Nieren verantwortlich ist. Weiterhin exprimiert das dezidualisierte Stroma vermehrt IGF-2 [69, 224]. Zygumt et al. konnten in ihren Studien eine Expression von IGF-2 in einigen menschlichen Zellenreihen fetalen Ursprungs nachweisen (Zytotrophoblast, Zotten, Mesoderm), nicht jedoch im Synzytiotrophoblasten [69, 80, 224]. Coulter und Han (1996) stellten fest, dass beim Rhesusaffen die IGF-2 Expression anders ausgeprägt ist: Er konnte mRNA im Synzytiotrophoblasten, nicht jedoch im Mesoderm des Chorions beobachten [35]. Dass die Relevanz des IGF-2 für die menschliche Reproduktion nicht an einem beliebigen Tiermodell erforscht werden kann, konnten Gray et al. bereits im Jahre 1987 feststellen, als sie in ihren Forschungen unter anderem nachwiesen, dass die IGF-2 Expression im Uterus des Menschen auch nach der Geburt noch hoch ist, bei der Ratte jedoch nicht [75].

Erste Forschungs-Ergebnisse über die Expression von IGF-2 in den Plazenten von *Calithrix jacchus* wurden 2009 durch Rutherford et al. publiziert und werden in Kapitel 6.4 diskutiert [162].

**2.5.4.2 IGF-Rezeptor: IGF1-R** Bei diesem Rezeptor handelt es sich um den physiologischen Rezeptor von IGF-1 und -2. Er ist der Rezeptor mit der höchsten Affinität zu den IGFs, kann aber auch Insulin binden. Seine relative Affinität zu den Liganden ist in absteigender Reihenfolge wie folgt: IGF-1 > IGF-2 > Insulin [188].

Dieser Rezeptor besteht aus einem tetrameren membranständigen Glykoprotein [73]. Er hat eine relative Molekülmasse von 400 kDa und ähnelt dem Insulinrezeptor mit der Struktur:  $\alpha_2\beta_2$  [24, 53, 79]. Die zwei  $\alpha$ -Untereinheiten liegen extrazellulär und dienen der Bindung der Liganden, die kleineren zwei  $\beta$ -Untereinheiten enthalten eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität [53, 73, 79]. Der Rezeptor zeigt nicht nur strukturell eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zum Insulinrezeptor, sondern weist auch sich partiell überschneidende Signalkaskaden mit diesem auf: Die Aktivierung von IGF1-R resultiert in einer Tyrosin-Autophosphorylierung der  $\beta$ -Kette des Rezeptors und benachbarter zytosolischer Proteine [79]. Dies führt zu einer anschließenden komplexen Kaskade von Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungs-Schritten, die einerseits zu einer Aktivierung von Enzymen und andererseits zu einer Transkription IGF-abhängiger Genabschnitte führt. In den meisten Geweben zeichnet IGF1-R verantwortlich für die Signaltransduktion von IGF-1 und -2 [79]. In Knockout-Studien konnte festgestellt werden, dass die Wirkung von IGF-1 und -2 auch in der Schwangerschaft vorrangig durch IGF1-R mediert wird. IGF1-Rezeptoren wurden vorrangig im Myometrium, aber auch in diversen Zelltypen des Endometriums und im Periimplantations-Embryo nachgewiesen [79]. Talavera et al. kamen in ihren Studien am Menschen zu dem Schluss, dass es in den endometrialen Membranen nur den IGF1-R gibt [188]. Eine erhöhte Östrogenzufuhr vermehrt die Zahl der IGF1-Rezeptoren im Myometrium [79], während eine Progesterondominanz bei in vitro-Studien zu einer Reduktion des IGF1-R führte [182].

**2.5.4.3 Bindungsproteine: IGFBP-1 bis -6** Bei den Bindungsproteinen handelt es sich um Proteine mit einer Größe zwischen 24 und 45 kDa und einer Aminosäurekette zwischen 216 und 289 Aminosäuren, die eine etwa 50-%ige Homologie untereinander aufweisen. Jedes Protein ist unter anderem durch eine unterschiedliche Affinität bei der Bindung von IGF-1 und IGF-2 charakterisiert. Diese Affinität kann durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Proteolyse der Bindungsproteine modifiziert werden [79].

Die Bildung von IGFBP-IGF-Komplexen führt zu einem instabilen Speicher potentiell biologisch aktiver IGFs im perizellulären Raum. Ein solches Reservoir ist in der Lage, die Wachstumsfaktoren ihrem Ziel, den Zellrezeptoren, in einer Art verzögertem endo- und parakrinen Mechanismus zuzuführen. Dieser Mechanismus kann die Aktivität der IGFs inhibieren oder potenzieren, indem die Bindungsproteine die IGFs entweder sequestrieren oder am Zielort freigeben [79]. Etwa 98 % des IGF-1 liegt immer gebunden vor, wobei IGFBP-3 hier die größte Rolle spielt [79]. Das Bindungsvermögen von IGFBP-3 zu IGF-1 ist jedoch geringer, als die Affinität von IGF-1 zu IGF1-R. Somit bedeutet eine Bindung an IGFBP-3 eine Zunahme der IGF-1 Aktivität.

Beim Menschen wurden mindestens sechs Bindungsproteine nachgewiesen, die allgegenwärtig vorhanden sind und im Überschuss zu den IGFs vorliegen. Sie verlängern die Halbwertszeit der niedrigmolekularen freien IGFs von Minuten zu Stunden und regulieren so die Bioverfügbarkeit und die Präsentation der IGFs an den Zielzellen [79]. Zygmunt beschreibt das Verteilungsmuster der IGFBP-mRNA in der Dezidua der Frau wie folgt: IGFBP-1 und -4 sind in den dezidualisierten Stromazellen vorherrschend, IGFBP-1 zusätzlich im Epithel der Drüsen. Alle anderen IGFBPs waren nur in geringen Mengen vorhanden [224]. In den Geweben des Reproduktionstraktes überwiegt die inhibitorische Wirkung der IGFBPs. Bei den meisten Spezies werden alle sechs Bindungsproteine im Uterus exprimiert [79]. In dieser Arbeit wurden nur die zwei folgenden Bindungsproteine untersucht:

**IGFBP-1** Im menschlichen Uterus werden sehr große Mengen IGFBP-1 exprimiert, was im Vergleich zu anderen Spezies recht ungewöhnlich ist [79, 124, 224]. Der erhöhten IGFBP-1-Konzentration in den Stromazellen des Endometriums des Menschen um den Zeitpunkt der Implantation (Sekretionsphase) werden zwei wichtige Funktionen zugeschrieben: Zum einen ist es hoch affin zu den IGFs, deren Wirkung es vorrangig inhibiert (und damit moduliert), zum anderen Ligand für zelluläre Adhäsionsmoleküle (v.a.  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine), wodurch sie die Motilität und das Wachstum der Zelle zu beeinflussen in der Lage sind [38, 69, 79, 150]. Aktuelle Studien konnten eine Bindung von IGFBP-1 an den humanen Zytotrophoblasten und dessen Integrine, sowie in vitro eine Inhibition der Trophoblast-Invasion in die Dezidua nachweisen. Die o.g. Integrine werden unter anderem von der invasierenden fetalen Plazenta exprimiert, während der Trophoblast größere Mengen IGF-2 exprimiert [69].

**IGFBP-2** Dieses Bindungsprotein bindet mit einer höheren Affinität an IGF-1, als IGF-1 wiederum an seinen Rezeptor bindet. Somit ist eine erhöhte IGFBP-2 Konzentration in der Lage, bei unveränderter IGF-1 Menge eine Verringerung der IGF-1 Aktivität zu bewirken. Es hat eine Größe von 36 kDa.

## 2.6 Tiermodell *Callithrix jacchus* (Weißbüschelaffe)



Abbildung 5: *Callithrix jacchus*; weiblich, adult (Oskarline)

Der *Callithrix jacchus* (siehe Abbildung 5) wird schon seit vielen Jahren erfolgreich als wertvolles Modell in der reproduktionsbiologischen Forschung genutzt [46, 49, 51, 59, 84, 93, 161].

Durch die geringe Größe dieser Primaten, die damit vereinfachte und günstigere Versorgung und Haltung sowie durch die einfachere, häufig narkosefreie Handhabung ist eine intensive und tägliche Arbeit mit den Tieren sehr gut möglich. Weiterhin zeichnen sich die Tiere durch eine hohe, nicht saisonal begrenzte Fruchtbarkeit bei gleichzeitig hoher Anzahl an Nachkommen aus [59, 84, 161]. Nubbemeyer et al. konnten demonstrieren, dass über 90 % der ovulierenden Follikel beim *Callithrix jacchus* zu lebenden Nachkommen führen [138]. Die Tiere sind entwicklungsgeschichtlich sehr nah mit dem Menschen verwandt und rechtfertigen damit die Entscheidung ihrer Anwendung als Modelltier in der humanen Forschung. Aus diesem Grund sind sie auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt worden. Nachfolgend soll näher auf die Tiere und ihre Eignung als Versuchstier für die Reproduktionsmedizin eingegangen werden.

### 2.6.1 Allgemeines zu *Callithrichiden*

Art	<i>Callithrix jacchus</i>
Untergattung	Büschelaffen ( <i>Callithrix</i> )
Gattung	Marmosetten ( <i>Callithrix</i> )
Familie	Krallenaffen ( <i>Callithrichidae</i> , <i>Callithrichinae</i> bzw. <i>Hapalinae</i> [76])
Teilordnung	Neuweltaffen ( <i>Platyrrhini</i> )
Unterordnung	Trockennasaffen ( <i>Haplorrhini</i> )
Ordnung	Primaten ( <i>Primates</i> )
Unterklasse	hohe Säugetiere ( <i>Eutheria</i> )
Klasse	Säugetiere ( <i>Mammalia</i> )

Die Art *Callithrix jacchus*, auch Weißbüschelaffe oder im Englischen Common Marmoset genannt, stammt als Neuweltaffe ursprünglich aus Waldgebieten im nordöstlichen Brasilien [84]. Die im Englischen gebräuchliche Bezeichnung des Common Marmoset stammt aus dem Französischen und wird von dem Wort "Marmouset", was soviel wie kleiner Junge, groteske Figur oder Zwerg bedeutet, abgeleitet [77].

Tiere der Art des *Callithrix jacchus* werden in Freiheit etwa 300-400 g schwer und haben eine Rumpflänge von durchschnittlich 185-188 mm [86, 159]. Das natürliche Habitat dieses Affen umfasst Buschwerk, Sümpfe und baumreiche Gebiete. Ihre Hauptnahrung besteht aus Baumexsudaten (ca. 15%), Früchten und kleineren Beutetieren [84, 159]. Ihre kräftigen langen Incisivi und die langen Finger sind essentiell, da sie Löcher in die Gummibäume ihres natürlichen Verbreitungsgebietes bohren, deren Exsudat sie trinken [136, 159]. In Freiheit leben die tagaktiven Tiere in patriarchalen oder matriarchalen Gruppen mit einer durchschnittlichen Größe von 9, maximal 20 Tieren [159]. Diese Gruppen bewohnen ein variables Revier von 0,5-6,5 Hektar, welches anhand der Dichte von Gummibäumen ausgewählt wird [159]. Nur das dominante Weibchen der Gruppe pflanzt sich fort. Gepflegt werden die Nachkommen von beiden Elternteilen gleichberechtigt und auch der Rest der Gruppe ist beteiligt [84, 85, 159]. Obwohl die Tiere auch Krallenäffchen genannt werden, tragen sie doch Nägel an Fingern und Zehen, die allerdings schmal (lateral komprimiert) und krallenartig verlängert sind und ihnen so ein an das Baumleben angepasstes Leben ermöglichen [77, 136]. Weißbüschelaffen können ca. 12 Jahre alt werden [77]. Rowe (1996) spricht vom Eintreten der Geschlechtsreife bei weiblichen Tieren mit 12 Monaten, bei männlichen Tieren mit 16,7 Monaten [159]. In einer neueren Studie wiesen Smucny et al. und Tardif et al. statistisch nach, dass die Tiere bei der ersten Geburt von Nachkommen mit durchschnittlich 2,91 Jahren jedoch deutlich älter sind [177, 190]. Ein Östruszyklus ist mit durchschnitt-

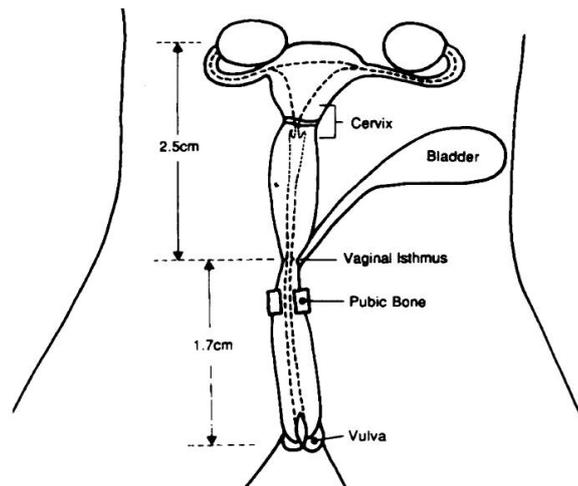


Abbildung 6: **Reproduktionstrakt des *Callithrix jacchus***, schematisch [aus 37]

lich  $28,6 \pm 1,0$  Tagen genauso lang wie bei der Frau [92, 195]. Die Follikelphase ist mit ca. 10,3 Tagen (8-13 Tage) etwas kürzer als die der Frau (14 Tage), die Lutealphase mit  $19,2 \pm 0,6$  Tagen dementsprechend länger [84, 92, 173]. Eine physiologische Gravidität dauert beim Menschen 280 Tage, beim *Callithrix jacchus* etwa 144-148 Tage (4,8 Monate) [92, 159]. Diese Tragzeit ist für eine Spezies dieser Körpergröße ungewöhnlich lang, so dass sehr weit entwickelte Junge zu Welt kommen [84]. Weißbüschelaffen bringen häufig Mehrlinge zur Welt [159]. Beim *Callithrix jacchus* teilen sich die Feten prinzipiell zwei Plazenten, die über ein Gefäßnetzwerk miteinander verbunden sind [13, 65, 86, 214, 215]. Das kurze Geburtsintervall von nur 5,1 Monaten (150 Tage) ist mit der Tatsache erklärbar, dass Weißbüschelaffen weder einer Laktationsanöstrie [59, 84, 195], noch einer Saisonalität ihrer Reproduktionsaktivität unterliegen; ein erneuter Eisprung findet bereits 9-10 Tage post partum statt [84, 159, 195].

### 2.6.2 Weißbüschelaffen als Modelltiere in der reproduktionsbiologischen Forschung

Die anatomischen Verhältnisse der Reproduktionorgane des Weißbüschelaffen sind denen des Menschen sehr ähnlich [26, 37, 74, 207]. Der beim *Callithrix jacchus* ebenfalls birnenförmige Uterus zeigt im Gegensatz zum menschlichen aber keine Version oder Flexion, die Vagina des Weißbüschelaffen ist deutlich länger als beim Menschen und anderen Primaten (siehe Abbildung 6) [37]. Rune et al. (1992) haben in ihren Studien untersucht, ob Callithrichiden, obwohl nicht zu den menstruierenden Primaten gehörend [85], als Modelle für die Erforschung des uterinen Zyklus geeignet sind [161]. Eine ihrer Fragestellungen war, ob das Vorhandensein einer Zonierung des Endometriums zwangsläufig eine Menstruation nach sich zieht, oder aber eine Zonierung auch ohne Menstruation möglich ist. Sie konnten bei *Callithrix jacchus* eine dreizonige Aufteilung des Endometriums nachweisen, während

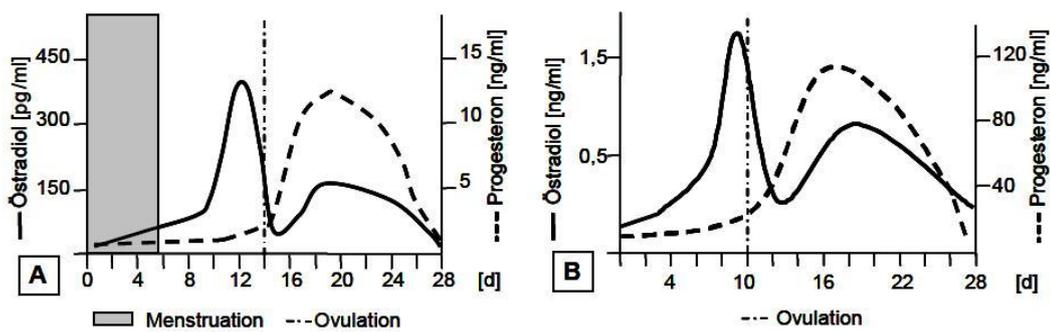


Abbildung 7: **Sexualzyklus: peripher messbare Östrogen- und Progesteronkonzentrationen von Mensch (A) und *Callithrix jacchus* (B),** schematisch, [aus 174] modifiziert nach [84, 172]

andere bei Rhesusaffen [142] und Menschen [101] eine viergeteilte Zonierung nachwiesen. Bei allen untersuchten Spezies lag also eine Zonierung vor, die einer Veränderung während des ovariellen Zyklus unterworfen war [161]. Mit Ausnahme der fehlenden Menstruation ist die Zonierung des callithrichiden Uterus also mit dem der Frau vergleichbar.

Anders als beim Menschen dauert das Stadium der Epithel-Penetration bei Callithrichiden nach der Initiation der Implantation (im Gegensatz zum Makaken, Pavian und Menschen) einige Tage lang an [50, 51, 108, 127, 137] und ist weniger invasiv [127, 137, 217], die Dezidualisierung ist weniger stark ausgeprägt [127]. Dieser verlängerte Implantationsprozess gab Wissenschaftlern wie Merker et al. [128], Moore et al. [130] und Smith et al. [175] erstmalig die Möglichkeit, den komplizierten Ablauf der Implantation mikroskopisch genauer zu untersuchen. Dieses Stadium der Penetration des uterinen Epithels durch den Trophoblasten konnte beim Menschen noch nicht dargestellt werden [50]. Die beim Menschen gemessenen Serum-Östradiol-Spiegel erreichen am Tag 2-3 des Zyklus bei 20-30 pg/ml einen Tiefpunkt und etwa 8 Tage nach der Ovulation je nach Autor einen Höchststand von 300-400 pg/ml [16] oder gar 700 pg/ml [219]. Während *Callithrix jacchus* mit 50 pg/ml ähnliche Minimal-

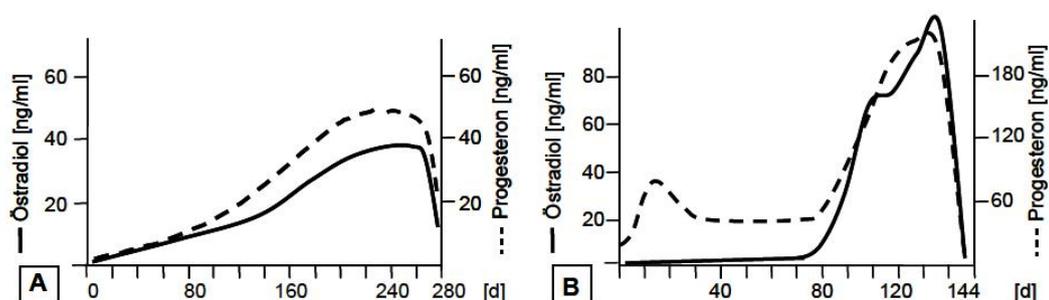


Abbildung 8: **Gravidität: peripher messbare Östrogen- und Progesteronkonzentrationen von Mensch (A) und *Callithrix jacchus* (B),** schematisch, [aus 174] modifiziert nach [84, 113, 172]

werte aufweist, konnten in der mittleren Lutealphase mit einem maximalen Serum-Spiegel von bis zu 700-5500 pg/ml vergleichsweise deutlich höhere Hormonkonzentrationen gemessen werden [195]. Die Serum Progesteron-Spiegel der Callithrichiden steigen 2-3 Tage nach dem LH-Peak an und erreichen ein Maximum von 25-70 ng/ml oder mehr in der Mitte der Lutealphase. Danach sinken sie unter einen Spiegel von 2 ng/ml bis zum nächsten präovulatorischen Anstieg ab (siehe dazu auch Abbildungen 7 und 8) [195]. Die Östrogen- und Progesteron-Spiegel des *Callithrix jacchus* sind zwar während des Zyklus bis zu 10-15x höher als bei Altweltaffen und Menschen [45, 84, 195], hatten aber in den Studien von Torii et al. sowie Chambers und Hearn auch während der Trächtigkeit eine größere Ähnlichkeit mit dem endokrinen Profil des Menschen und der Menschenaffen als mit denen von Makaken und Pavianen [28, 196].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hohe Fertilität, Asaisonalität der Fortpflanzung, das Fehlen einer Laktationsanöstrie, die einfache Handhabung der Tiere, das kurze Generationsintervall und vor allem die anatomische und endokrinologische Vergleichbarkeit mit dem Menschen den Weißbüschelaffen vor anderen Primaten zu einem idealen Modelltier für die reproduktionsbiologische Forschung machen (siehe auch Tabelle 2).

Parameter	Weißbüschelaffe	Rhesusaffe	Pavian	Mensch
Körpergewicht	300-400 g	4,6-14,5 kg	11-30 kg	sehr variabel (Ø 68,1 kg in Dtl.d.)
Pubertätseintritt/ Geschlechtsreife	15-18 Monate	48-84 Monate	48-96 Monate	sehr variabel
Lebenserwartung	11,7 Jahre	21,5 Jahre	28-29 Jahre	82,53 Jahre (in Dtl.d.)
Zykluslänge	28,6 ± 1,0 Tage	28 Tage	35 Tage	28 Tage
<i>Follikelphase</i>	8,3 ± 0,3 Tage	12 Tage	15 Tage	14 Tage
<i>Lutealphase</i>	19,2 ± 0,6 Tage	16 Tage	20 Tage	14 Tage
Graviditätsdauer	144-148 Tage	165-168 Tage	184-185 Tage	267 Tage
Saisonalität der Fortpflanzung (in Gefangenschaft)	Nein	Ja	Nein	Nein
Ø-Anzahl Nachkommen/Jahr	5,0	1,0	0,8	sehr variabel (0,036 in Dtl.d.)
Generationsintervall	1,5-2,0 Jahre	4-6 Jahre	5-7 Jahre	sehr variabel (28,8 Jahre in Dtl.d.)
Laktationsanöstrie	10,5 ± 0,7 Tage	1 Jahr	1-2 Jahre	sehr variabel (6 Wochen - 6 Monate)
Menstruation	Nein	Ja	Ja	Ja

Tabelle 2: Reproduktions-Eckdaten, weiblich: Callithrix - Rhesusaffe - Pavian - Mensch

nach [1, 33, 59, 84, 92, 139, 148, 179, 180, 196, 204]

## 3 Material

### 3.1 Gewebe

Das Organmaterial wurde in einer wissenschaftlichen Kooperation freundlicherweise von Frau Prof. A. Einspanier, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, zur Verfügung gestellt. Die Tiere entstammten alle aus Versuchen der Arbeitsgruppe Einspanier, Nayudu, Gilchrist und Wicherek der Versuchstiereinheit des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) in Göttingen. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden die Reproduktionsorgane von 17 weiblichen Callithrichiden untersucht. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere zum Zeitpunkt der Organentnahme lag bei 400 g, sie waren 2-11 Jahre alt und wiesen unterschiedliche Zuchterfahrung auf. Die Tiere wurden paarweise unter standardisierten Bedingungen mit 12 h Licht/12 h Dunkelheit, einer konstanten Temperatur von  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  und einer Luftfeuchte von  $60 \pm 5 \%$  gehalten. Die Ernährung der Tiere bestand aus verschiedenen Obst- und Gemüsesorten sowie Fertigpellets (ssniff Marmoset, siehe auch [42]), welche abwechselnd mit Geflügelfleisch, Ei, Nudel oder Mehlwürmern ergänzt wurde. Trinkwasser stand den Tieren stets ad libitum zur Verfügung (siehe auch [42]).

Alle für diese Arbeit genutzten Organe wurden in Versuchen gewonnen, welche unter der Tierversuchsnummer 509.42502/08-03.99 (V1) von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt wurden. Angaben zur Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Organe finden sich in Tabelle 3.

Lfd. Nr.	Datum d. Entnahme	Tiernr. und -name	Organ	Bemerkungen zum Sexualzyklus
C 1	22.04.1998	n.b. (Gina)	Plazenta	ca. 144 d grav. (per vias naturalis)
C 2	24.08.1999	w316 (Fiona)	Plazenta	ca. 144 d grav. (bei Sektio)
C 3	16.02.2000	w330 (Halloween)	Plazenta	ca. 144 d grav. (bei Sektio)
C 4	09.12.1997	w233	1/4 Gesamt-Uterus (li)	7. d Follikelphase
C 5	30.01.1998	w248 (Obiva)	1/4 Gesamt-Uterus (li)	4. d Follikelphase
C 6	10.09.1999	w320	1/4 Gesamt-Uterus	4. d Follikelphase
C 7	07.03.1995	w91	Uterus-Schleimhaut	4. d Follikelphase post FSH
C 8	10.05.1994	w146	Uterus-Schleimhaut	4. d Follikelphase post FSH
C 9	23.11.1995	w52	1/2 Gesamt-Uterus	2. d Follikelphase
C 10	20.03.1996	w185	1/4 Gesamt-Uterus	1. d Follikelphase
C 11	07.03.1995	w91	1/4 Gesamt-Uterus	4. d Follikelphase post FSH
C 12	22.03.1998	w148	1/2 Gesamt-Uterus	4. d Follikelphase post FSH
C 13	03.02.1998	w239	1/2 Gesamt-Uterus (re)	7. d Follikelphase post FSH
C 14	21.04.1997	w152	1/4 Gesamt-Uterus	8. d Follikelphase post hCG
C 15	02.02.1998	w169	1/4 Gesamt-Uterus	8. d Follikelphase post hCG
C 16	26.09.1995	w37	1/2 Gesamt-Uterus	frühe Lutealphase
C 17	31.08.1995	w29	1/4 Gesamt-Uterus	9. d Lutealphase

Tabelle 3: **Proben des Reproduktionstrakts von *Callithrix jacchus***; n.b. = nicht bekannt, es liegt keine w-Nummer vor

## 3.2 Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle	Firmensitz
Agarose NEEO, Ultra Qualität	Carl Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Merck	Darmstadt
CaCl	Sigma	Deisenhofen
DEPC	Sigma	Deisenhofen
DMSO	Sigma	Deisenhofen
dNTP Set, 100 mM Lösungen	Amersham Biosciences	Freiburg
Eindeckmittel Roti <sup>®</sup> -Histokitt II	Carl Roth	Karlsruhe
Eindeckmittel Neo-Mount	Merck	Darmstadt
Eindeckmittel Immuno-Mount	Shandon	Pittsburg, USA
Eosin G	Dr. K. Hollborn & Söhne	Leipzig
Ethanol $\geq 99,8\%$	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol, HPLC Gradient Grade (für RNA-Extraktion)	Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Carl Roth	Karlsruhe
Formaldehyd 37 %	Sigma	Deisenhofen
Formamid	Sigma	Deisenhofen
Glycerin, wasserfrei	Merck	Darmstadt
Hexamere (pd(N) <sub>6</sub> Random Hexamere)	Amersham Biosciences	Freiburg
Hämalaun nach Mayer	Dr. K. Hollborn & Söhne	Leipzig
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	Dr. K. Hollborn & Söhne	Leipzig
Mineralöl	Sigma	Deisenhofen
MOPS	Carl Roth	Karlsruhe
Na-Zitrat	Carl Roth	Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck	Darmstadt
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Biochrom	Berlin
SYBR Green (SensiMix dt)	Quantace	Berlin
TAE-Puffer (10x)	Carl Roth	Karlsruhe

Trypsin (2,5%) (GIBco BRL)	Invitrogen	Darmstadt
Vector/AEC-Peroxidase SK 4200	Dianova/Vector Laboratories	Hamburg/Burlingame, USA
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne	Leipzig
Zitronensäure (wasserfrei)	Fa J.T.Baker (Mallinckrodt Baker B.V.)	Deventer, NL

### 3.3 Lösungen

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

1 l	H <sub>2</sub> O	20 min bei
1 ml	DEPC, gut schütteln	121°C autoklavieren

#### Primer-Solution

5 µl	Stock Solution (200 µmol/l)
45 µl	H <sub>2</sub> O (autoklaviert)

#### 0,25-%ige Trypsin-Lösung

10 ml	2,5 % Trypsinlösung
90 ml	0,9 % NaCl-Lösung

#### Zitratpuffer

4,5 ml	0,1 M Zitronensäure	Zitronensäure vorlegen, Na-Zitrat zugeben, die entstehende Lösung auf einen pH-Wert von 6,0 einstellen. Anschließend mit PBS auf 250 ml auffüllen. Die fertige Lösung hat einen pH von 6,5.
ca. 42 ml	0,1 M Na-Zitrat	
ca. 203,5 ml	PBS	

#### PBS / Trypsinlösung

4 ml	Trypsin	Trypsin und PBS vor dem Mischen auf ca. 37°C vorwärmen. Lösung stets frisch ansetzen.
80 ml	PBS	
0,03 g	CaCl <sub>2</sub>	

**Eosin-Lösung (Gebrauchslösung)**

50 ml	2 % Eosin-Stammlösung (2 g Eosin ad 100 ml aqua bidest)	Die Gebrauchslösung ist ca. 2 Wochen haltbar, muss aber ggf. filtriert und nochmals mit Essigsäure versetzt werden. Stammlösung im Kühlschrank aufbewahren.
150 ml	Aqua bidest	
1-2 Tropfen	Essigsäure	

**2-%iges DNA-Agarosegel (Stammlösung)**

8 g	Agarose	Zunächst 1 x TAE-Puffer aus H <sub>2</sub> O und 10 x TAE-Puffer herstellen, die Agarose dazu wiegen, das Gemisch in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erwärmen.
40 ml	10 x TAE-Puffer	
360 ml	H <sub>2</sub> O	

**3.4 Kits**

Methode	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
RNA-Extraktion	Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek	Berlin
Sequenzierungskit	ABI PRISM <sup>®</sup> BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Darmstadt
ShredderTubes	Lysing Matrix D	Qbiogene (MP Biomedicals Europe)	Illkirch, F
Bioanalyzer	RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Bioanalyzer	RNA 6000 Nano Reagents Part I	Agilent Technologies	Santa Clara, USA

**3.5 Enzyme**

Methode	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
DNA-Verdau	RQ RNase-freie DNase (1 U/ $\mu$ l)	Promega	Mannheim
PCR	iTaq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Bio-Rad	München
Real-Time-PCR	2x SensiMix (dT)	Quantace	Berlin
Reverse Transkription	M-MLV Reverse Transkriptase und Puffer	Promega	Mannheim

### 3.6 Antikörper

Produkt	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
ER- $\alpha$	ER- $\alpha$ monocl. mouse anti-human igG	Euromedex	Souffelweyersheim, F
eNOS	eNOS monocl. PC10	Abcam	Cambridge, UK
iNOS	iNOS polycl. IgG	Abcam	Cambridge, UK
HRP-konjug. Ak	goat-anti-mouse/anti-rabbit-Antikörper, DAKO EnVision™ detection kit	Dako Cytomation	Hamburg
IgG (biotinylated)	horse-anti-mouse & -rabbit	Vector Laboratories	Burlingame, USA

### 3.7 Marker

Produkt	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
DNA-100bp-Marker	EZ Load™ Molecular Rulers	Bio-Rad	München

### 3.8 Hormone

Hormon	Bezugsquelle	Firmensitz
FSH (Fertinorm HP75)	Serono	Unterschleissheim
hCG	Vemie Veterinär Chemie	Kempen
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> : Cloprostenol (EstrumateR)	Essex Pharma GmbH	München

### 3.9 Primer

Alle Primer (siehe Tabellen 4a, b auf den nächsten Seiten) wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Gen	Sequenz 5' → 3'	Größe des PCR-Produkts	EMBL Ac. No. der Vergleichssequenz	Homologie-Grad d. Primers zur Vergleichssequenz
18 S-rRNA	for 5' GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A 3'	305 bp	NR_003286 (h)	100 % (h)
	rev 5' GAC ACT CAG CTA AGA GCA TCG A 3'			
Ubiquitin	for 5' ATG CAG ATC TTT GTG AAG AC 3'	191 bp	NM_003333 (h)	100 % (h)
	rev 5' CTT CTG GAT GTT GTA GTC 3'			
ER- $\alpha$	for 5' TGG AIT TGA CCC TCC ATG AT 3'	173 bp	NM_000125 (h)	100 % (h)
	rev 5' GAT CTC CAC CAT GCC CTC TC 3'			
ER- $\beta$	for 5' GCT TCG TGG AGC TCA GCC TG 3'	247 bp	AY785359.1 (h)	100 % (h)
	rev 5' AGG ATC ATG GCC TTG ACA CAG A 3'			
eNOS	for 5' GAA GCA CCT GGA GAA TGA GC 3'	145 bp	BC069465.1 (h)	100 % (h)
	rev 5' TCT GGC TGG TAG CCG AAG 3'			
iNOS	for 5' GCC AAG GTC TGA GCT ACC TG 3'	199 bp	—	keine übereinstimmende (h)/(cj) iNOS Sequenz
	rev 5' GAG TGC CTG GCT GAG TGA G 3'			

Tabelle 4a: Verwendete Primer; Homologie-Grad = Grad der Übereinstimmung der Primer-Sequenz mit bereits publizierter humaner (h), bzw. callithricider (cj) Sequenz

Gen	Sequenz 5' → 3'	Größe des PCR-Produkts	EMBL Ac. No. der Vergleichssequenz	Homologie-Grad d. Primers zur Vergleichssequenz
IGF-1	for 5' TCG CAT CTC TTC TAT CTG GCC CTG T 3'	228 bp	AY790940.1 (h)	92 % (forw. Primer, h)
	rev 5' GCA GTA CAT CTC CAG CCT CCT CAG A 3'		Z49055.1 (cj)	100 % (rev. Primer, cj)
IGF-2	for 5' GAC CGC GGC TTC TAC TTC AG 3'	204 bp	NG_008849 (h)	100 % (h)
	rev 5' AAG AAC TTG CCC ACG GGG TAT 3'			
IGF1-R	for 5' TTA AAA TGG CCA GAA CCT GAG 3'	314 bp	NM_000875.3 (h)	90,5 % (h)
	rev 5' ATT ATA ACC AAG CCT CCC AC 3'		AJ001298 (cj)	100 % (cj)
IGFBP-1	for 5' TCA AGA AGT GGA AGG AGC CCT 3'	127 bp	for: NM_174554 (b)	100 % (h)
	rev 5' AAT CCA TTC TTG TTG CAG TTT 3'		rev: NM_000596 (h)	
IGFBP-2	for 5' CAC CGG CAG ATG GGC AA 3'	136 bp	BC004312 (h)	100 % (h)
	rev 5' GAA GGC GCA TGG TGG AGA T 3'			

Tabelle 4b: Verwendete Primer; Homologie-Grad = Grad der Übereinstimmung der Primer-Sequenz mit bereits publizierter humaner (h), bzw. callithrichider (cj) Sequenz; (b) = bos taurus

### 3.10 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Name/Größe	Bezugsquelle	Firmensitz
Eisenhaltiger Sirup	Ferrum Hausmann Sirup	Astellas Pharma	München
Kanülen	Neoject, 26 G	Dispomed	Gelnhausen
Küvetten		Carl Roth	Karlsruhe
Objektträger	Starfrost 76 x 26 mm	Knittel	Braunschweig
Parafilm		American Can Company	Greenwich, USA
Pipettenspitzen, ohne Filter	Premium Tips (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen, mit Filter	Safeseal Tips (5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße	PCR-Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße für RotorGene Cyclers	Strip Tubes 0,1ml	LTF-Labortechnik	Wasserburg
Skalpelle	B. Braun Cutfix	Aesculap	Tuttlingen
Spritze	ERSTA, 1 ml	WDT	Garbsen

### 3.11 Geräte

Gerätebezeichnung	Name	Bezugsquelle	Firmensitz
Agarose-Gelkammer		Carl Roth	Karlsruhe
Bioanalyser	Bioanalyser 2100	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Heizplatte	IKAMAG RCT	Janke & Kunkel	Staufen
Mikrotom		MICROM (Thermo Fisher Scientific)	Walldorf
Mikrowelle	Mikrostar MD 6459	MTC-Medion Technologie Center	Mülheim/Ruhr
Taumelschüttler	BIO101 Thermo Savant FastPrep <sup>®</sup> FP120	Qbiogene (MP Biomedicals Europe)	Illkirch, F
PCR-Cycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg
Pipetten	Research	Eppendorf	Hamburg
Real-Time-PCR-Cycler	Rotor Gene RG-3000	Corbett Research	Mortlake, AUS
Spannungsgerät	Power Pack P 25	Biometra	Göttingen
Spektrophotometer	NanoDrop ND - 1000	ThermoScientific (PiqLab)	Erlangen
Videodokumentation	GeneGenius	Syngene	Cambridge, UK
Vortex Minischüttler	VF2	Janke & Kunkel	Staufen
Wärmeblock	Thermomixer	Eppendorf	Hamburg
Wärmeschrank	Typ 2028	Heraeus	Hanau
Wasserbad		Julabo	Seelbach
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus	Hanau

---

## 4 Methoden

### 4.1 Zykluskontrolle der Tiere

Da weibliche Callithrichiden keine äußeren Zyklusanzeichen wie eine sichtbare Menstruation oder vaginale Epithelveränderungen zeigen [59], ist eine invasive Methode nötig, um den jeweiligen Reproduktionsstatus der Tiere festzustellen. Zu diesem Zwecke wurden den Tieren regelmäßig (etwa im Abstand von 10 Tagen) Blutproben von ca. 0,1-0,2 ml aus der Vena femoralis entnommen. Um das Prozedere möglichst stressarm für die Tiere zu gestalten, wurden sie zunächst darauf trainiert, freiwillig in ihre Schlafboxen zu gehen, aus denen sie einfach gefangen werden konnten. Für die Blutentnahme wurden heparinisierte 1-ml-Spritzen mit einer 26 G-Kanüle verwendet. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Tiere mit etwa 0,5 ml eines eisenhaltigen Sirups oral belohnt, der zudem einem Eisenmangel durch die vermehrt nötige Blutbildung vorbeugte.

Die Plasmagewinnung aus den entnommenen Blutproben wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde das Blut für 20 min bei 4000 G und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, danach das Plasma abpipettiert und in einem neuen Gefäß gesichert. Die Progesteronwerte wurden mit Hilfe eines Enzymimmunoassays im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut in Leipzig gemessen und damit der Zyklusstand bestimmt [48, 87, 92]. In der Follikelphase liegt der Progesteronwert bei Weißbüschelaffen charakteristischerweise unter 10 ng/ml, während er zum Zeitpunkt der Ovulation, ca. am 10. Zyklustag, Werte deutlich über 10 ng/ml erreicht (siehe dazu auch Abschnitt 2.6.2 und Abbildungen 7, 8) [46, 62, 84]. In der Lutealphase werden Werte von über 100 ng/ml erreicht. Die so detektierte Lutealphase kann zur Verhinderung einer Trächtigkeit mittels einer intramuskulären Gabe von 0,8 fg  $\text{PGF}_{2\alpha}$  am 20.-25. Zyklustag abgebrochen werden [46, 48, 185]. Die damit ausgelöste Luteolyse und der folglich gesunkene Progesteronwert wurden 3-4 Tage nach der Injektion mit Hilfe einer erneuten Blutprobe kontrolliert. Der Tag der Prostaglandingabe wurde im Folgezyklus als Tag 0 des Zyklus gewertet. Das vorgestellte Kontrollregime ist bereits vielfach erprobt und bewährt [59, 84].

Bei den zur Probenentnahme vorgesehenen Tieren wurde dies zunächst über mindestens drei Zyklen durchgeführt, um einerseits die Regelmäßigkeit der Zyklen zu kontrollieren und andererseits Graviditäten zu verhindern. Danach wurden die Tiere dem eigentlichen Versuch zugeführt.

### 4.1.1 Hormonbehandlung der Tiere vor Organentnahme

Einige der Tiere wurden kurz vor der Organentnahme mit Hormonen behandelt, um deren kurzfristigen Einfluss auf die Genexpression des Uterus zu untersuchen. Die Tiere mit den Nummern w91 (C 7, C 11), w146 (C 8) und w148 (C 12) wurden vom Tag 0 ihres Zyklus bis zum Tag 4 (Tag der Organentnahme) alle 12 Stunden mit jeweils 1,5 IE (internationale Einheiten) FSH intramuskulär behandelt, siehe auch Publikation von Gilchrist et al. [68]. Bei dem Tier w239 wurde eine Modifikation dieses Behandlungsprotokolls über 6 Tage durchgeführt, bevor an Tag 7 die Organentnahme vorgenommen wurde (Gilchrist, R., Wicherek, M., unveröffentlichte Daten).

Denjenigen Tieren, denen am Tag 8 ihres Zyklus zunächst hCG (75 IE) gespritzt wurde, wurden 22 Stunden nach der Hormon-Applikation, jedoch vor dem Eisprung, die Organe entnommen (w152/C14 und w169/C15). Siehe auch die Publikation von Einspanier et al. [44].

## 4.2 Organgewinnung

Im Rahmen dieses Versuches wurden weibliche Weißbüschelaffen zu unterschiedlichen Zykluszeitpunkten ovariohysterektomiert, bzw. Plazenten im Zuge einer Sectio caesarea oder einer normalen Geburt gewonnen. Die Ovariohysterektomie wurde unter Vollnarkose durchgeführt: Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren zunächst 0,1 ml der sog. „Göttinger Mischung II“ (bestehend aus Ketamin, Xylazin, Atropin und Aqua ad injectionem), intramuskulär injiziert, danach die Narkose per Isofluran-Inhalation aufrecht erhalten [42, 46]. Die gewonnenen Organe wurden in zwei Teile aufgeteilt und in 4-%igem Formalin beziehungsweise flüssigem Stickstoff zur weiteren Verarbeitung gesichert. Das aufgearbeitete Organmaterial wurde nachfolgend im Labor histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht. Detailliertere Angaben unter anderem in [43, 46].

## 4.3 Histologie und Immunhistochemie

### 4.3.1 Organpräparation für Histologie und Immunhistochemie

Die zur histologischen Untersuchung vorgesehenen Organe wurden für ca. 12 h in 4-%igem Formalin fixiert, danach vollständig entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden nach Aushärtung des Paraffins 5  $\mu$ m dicke Organschnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert, in dem sie zuerst zweimal für je 15 min in Xylol, danach zweimal je 15 min in 100-%igem Ethanol

und schließlich je 3 min in eine absteigende Ethanolreihe (90 %, 80 %, 70 %, 50 %) getaucht wurden. Abschließend wurden die Präparate für 5 min in Aqua bidest gespült. Die vorbereiteten Organschnitte konnten so für weiterführende histologische und immunhistochemische Untersuchungen genutzt werden.

#### **4.3.2 Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin**

Um die verschiedenen Uteri vergleichend beurteilen zu können, wurde zunächst eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin angefertigt, bei der sich das Zytoplasma rötlich, Zellkern und Mitochondrien blau darstellen. Die Organschnitte wurden für 5 min in eine Hämalaun-Lösung nach Mayer getaucht und danach für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Um das Zytoplasma kontrastfarben rot anzufärben, wurden die Schnitte in einem zweiten Schritt für 2 min in 0,5-%iges Eosin getaucht und schließlich mit Aqua bidest gespült. Zur Fixierung der Schnitte wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (70 %, 90 %, 100 %), mit Xylol behandelt und mit dem Einschlussmittel Roti Histo Kitt II eingedeckt.

#### **4.3.3 Immunhistochemie**

Ziel der Immunhistochemie ist die Sichtbarmachung spezifischer Proteine. Für die Untersuchung der vorliegenden Präparate wurde ein indirektes immunhistochemisches Verfahren verwendet: In diesem Verfahren werden zunächst unkonjugierte Primärantikörper, welche sich durch eine hohe Spezifität und Affinität zum gesuchten Protein auszeichnen, auf den Organschnitt aufgebracht. Der danach genutzte Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper und ist an ein Enzym gekoppelt (Detektionssystem). Wird nachfolgend ein passendes Substrat zugegeben, so setzt das gebundene Enzym das Substrat in einen sichtbaren Farbstoff um. Auf diese Art und Weise kann bestimmt werden, ob das gesuchte Protein in einem bestimmten Gewebe vorhanden und in welchem Zellkompartiment es lokalisiert ist [18].

**4.3.3.1 Immunhistochemische Färbung von ER- $\alpha$**  Bei der Färbung mit Antikörpern gegen den ER- $\alpha$  muss eine Vorbehandlung vor der eigentlichen immunhistochemischen Färbung vorgenommen werden. Ziel der Vorbehandlung ist eine enzymatische Demaskierung zur besseren Identifizierung der darzustellenden Substanzen [18]. Nach der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Entparaffinierung folgte eine Antigendemaskierung. Für diese Demaskierung wurden die Präparate zunächst über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank vorgewärmt. Am Folgetag wurde eine mit Zitratpuffer gefüllte Glasküvette in einem Wärmeschrank bei 120°C

bis zum Kochen des Zitratpuffer erwärmt, dann mit den Präparaten bestückt und jene für weitere 30 min in selbigen Wärmeschrank gestellt. Anschließend kühlten die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur ab und wurden dann kurz mit Aqua bidest, sowie für 2 x 5 min in PBS-Puffer gespült. Für den folgenden proteolytischen Schritt der Vorbehandlung wurden die Schnitte für 15 min in den Wärmeschrank in eine auf 37°C vorgewärmte Küvette mit PBS/0,0125-%iger Trypsinlösung, der kurz vor Gebrauch 0,03 g CaCl zugesetzt wurde, verbracht.

Im Anschluss an diese Vorbehandlung wurden die Schnitte kurz mit Aqua bidest und zweimal je 5 min in PBS gespült. Nach Zugabe von 3-%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden die Präparate bei Raumtemperatur in die Feuchtkammer gestellt und dort für 20 min inkubiert. Als erneuter Waschschrift folgte wieder die Spülung mit PBS für zweimal 5 min, bevor humanes Normalserum (Verdünnung 1:100 mit Aqua bidest) aufgetragen und nach 30 min der Primärantikörper sowie IgG als Negativkontrolle zugegeben wurden. Die Präparate wurden daraufhin über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Objektträger bevor und nachdem der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200, a-mouse/a-rabbit) für 30 min auf die Präparate gegeben wurde, jeweils zweimal für 5 min mit PBS-Puffer gespült. Als weitere Schritte folgte die Zugabe von AEC-Peroxidase/Vector und nach 45 min die 2-malige Spülung mit PBS, bevor für ca. 20 min chromogenes Substrat (AEC-Vector) auf die Präparate aufgetragen wurde. Um die Enzym-Substrat-Reaktion zu stoppen, wurden die Objektträger für 5 min in Leitungswasser gelegt und schließlich mit Aqua bidest abgespült. Zur Fixierung der Proben wurden die Präparate mit Immuno-Mount eingedeckt und nach ca. 2 Stunden mit Neo-Mount verschlossen.

**4.3.3.2 Immunhistochemische Färbung von eNOS und iNOS** Die immunhistochemische Färbung der NO-Synthasen erfolgte ähnlich jener der Östradiol-17 $\beta$ -Rezeptoren, ohne dass jedoch eine Vorbehandlung nötig war. Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung wurde hier vor dem Eindecken mit Immuno-Mount noch eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt. Dies diente der unspezifischen Anfärbung der Zellkerne um einen übersichtlicheren Eindruck des Organschnittes zu bekommen. Zu diesem Zwecke wurden die Objektträger nach dem Stoppen der Enzymreaktion mit Leitungswasser für ca. 20 s in Hämalaun getaucht und anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült.

## 4.4 Molekularbiologie

### 4.4.1 RNA-Extraktion

Die Vermeidung einer Kontamination mit RNasen, wie sie z.B. natürlicherweise auf der Haut, aber auch in Bakterien und Pilzen vorkommen, ist bei der Extraktion von RNA essentiell. Um den Abbau der in den Proben vorhandenen RNA zu verhindern, wurde stets an einem speziellen RNA-Arbeitsplatz gearbeitet. Die Arbeit an diesem Arbeitsplatz fand grundsätzlich mit Einmalhandschuhen und unter Verwendung von speziellen RNase-freien Materialien (autoklavierte Einweg-Plastikmaterialien) statt. Alle Lösungen, Glas- und Reaktionsgefäße wurden vor Benutzung für 20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Nicht autoklavierbare Materialien wie Gelkammern wurden mit 0,1-molarer NaOH-Lösung für 30 min inkubiert. Weiterhin wurden die Werkbank, sowie der eigens zur RNA-Extraktion vorgesehene Satz Pinzetten und Reaktionsgefäßhalter vor Aufnahme der Arbeit mit Ethanol gereinigt.

Die Proben aus Organen bzw. Organteilen mussten zunächst zerkleinert werden. Zu diesem Zwecke wurden Individual Lysing Matrix D Tubes aus dem FastRNA<sup>®</sup> Pro Green Kit der Firma Qbiogene genutzt. Da die RNA-Extraktion mit dem Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit der Firma Invitex erfolgte, fand die Zerkleinerung des Gewebes unter Zuhilfenahme der Lysis-Solution R aus diesem Kit statt. Nach Beschriftung der Röhrchen wurden zunächst 1000 µl Lysis-Solution R in jedes Röhrchen vorgelegt. Nun wurden die Proben einzeln aus dem -80°C Gefrierschrank auf Eis geholt, sofern möglich mit einem Skalpell geteilt und ein Stück der Probe (max. 100 mg Feuchtgewicht) in das entsprechende Reaktionsgefäß gegeben, so dass es im Lysis-Puffer schwamm. Sofort wurde das Röhrchen verschlossen und der Verschluss zusätzlich mit Parafilm verstärkt.

Nachfolgend wurden die Proben im FastPrep-Gerät bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s viermal für jeweils 20 s geshreddert. Zwischen den Shredder-Schritten wurden die Proben für wenige Minuten auf Eis gelagert, bis sie wieder abgekühlt waren, um eine Überhitzung und damit Degradation der Probe zu vermeiden. Im Anschluss an den letzten Shredder-Schritt wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur und einer Geschwindigkeit von 12000 U/min zentrifugiert. Die weitere Extraktion erfolgte nach Vorschrift des o.g. Kits. Alle im Folgenden erwähnten Zentrifugationen fanden bei Raumtemperatur statt. 700 µl des entstandenen klaren Überstandes wurden abgenommen und auf den DNA-Binding-Filter des Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit gegeben, um die genomische DNA zu entfernen. Das Ly-sat wurde auf dem DNA-Binding-Filter zunächst für 1 min inkubiert, dann für 2 min bei 12000 U/min zentrifugiert, der DNA-Filter verworfen und der Durchfluss weiter verwendet. Danach wurden 700 µl 70-%iges Ethanol durch vorsichtiges, gründliches auf- und abpipet-

tieren mit dem Lysat vermischt, um so die Voraussetzung für die Bindung der RNA mit dem RNA-Binding-Filter zu schaffen. In den nächsten zwei Arbeitsschritten wurden jeweils 700  $\mu\text{l}$  der Reaktionsflüssigkeit auf den RNA-Filter, welcher sich in einem neuen Reaktionsgefäß befand, gegeben, für 1 min inkubiert, bei 10000 U/min für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss folgten drei Waschschriffe zur Reinigung der RNA. Dazu wurden im ersten Reaktionsschritt 600  $\mu\text{l}$  des Wasch-Puffers R1 auf den RNA-Filter gegeben und die Proben bei 10000 U/min für 30 s zentrifugiert. Danach folgten zwei identische Waschschriffe, in denen jeweils 500  $\mu\text{l}$  des Wasch-Puffers R2 auf die RNA-Filter pipettiert wurden und die Reaktionsgefäße für 30 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in allen drei Waschschriffen jeweils verworfen. Im Anschluss daran wurde die Probe ein weiteres Mal zentrifugiert, um selbige zu trocknen. Dies erfolgte bei 12000 U/min für 3 min. Nun wurde der RNA-Filter auf ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit Hilfe von 40  $\mu\text{l}$  des Elutions-Puffers R, welcher direkt auf den Filter gegeben wurde, eluiert. Dafür wurde die Probe mit dem Puffer zunächst für 2 min inkubiert, dann bei 10000 U/min für 1 min zentrifugiert und das Eluat sofort auf Eis gesichert. Die darin gelöste RNA wurde mit einem Vortex-Gerät zur homogenen Verteilung gründlich durchmischt, für wenige Sekunden zentrifugiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort wieder auf Eis verbracht. Die Lagerung der RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.2 Quantifizierung der gewonnenen RNA**

Das Prinzip zur Bestimmung der RNA-Konzentration beruht auf der Adsorption von UV-Licht durch die RNA. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-Konzentration mit jeweils 2,5  $\mu\text{l}$  der Probe im NanoDrop Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um eine Kontamination der Probe mit Proteinen auszuschließen, misst das Gerät zusätzlich die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge, welche durch Proteine hervorgerufen würde. Die im Anschluss gebildete Ratio der Werte für 260 nm/280 nm ermöglicht eine Aussage über die Reinheit der Probe. Ein Quotient von  $>1,8$  weist auf eine gute Reinheit hin.

#### **4.4.3 Denaturierendes RNA-Agarose-Gel**

Zur Herstellung eines RNA-Gels wurde zunächst die Gelkammer samt Kamm und Schlitten für 30 min mit 0,1 molarer NaOH inkubiert und danach gründlich mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, um alle Materialien von RNasen zu dekontaminieren. Das Agarose-Gel wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

---

**Denaturierendes-Agarose-Gel**


---

0,6 g	Agarose-Pulver
6 ml	10x MOPS (Puffer-Lösung)
44,4 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O

---

Zur homogenen Verteilung der Agarose wurde die Lösung unter mehrmaligem Schwenken in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Nach einer Abkühlung auf 40°C wurden 9,6 ml 37-%iges Formaldehyd hinzugefügt, das handwarme Gel auf den Schlitten gegossen und der Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach etwa 60 min war das Gel auspolymerisiert und der Schlitten in der Gelkammer wurde mit 1x MOPS überschichtet, bis die Kammer gefüllt war. Als letzter Arbeitsschritt wurde der Kamm entfernt. Jeweils 2 µg RNA wurden in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 10 µl Probenpuffer (s.u.) gemischt.

---

**Probenpuffer für 8 Proben**


---

75 µl	Formamid
25 µl	Formaldehyd (37 %)
10 µl	10x MOPS
1 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
6 µl	Glycerin
2 µl	BPB-Lösung

---

Im Anschluss wurden alle Proben für 10 min bei 70°C denaturiert, dann die Proben für weitere 5 min auf Eis gelagert, nachfolgend kurz bei 4°C und 12000 U/min abzentrifugiert und je 17 µl in die Geltaschen einpipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 70 V (ca. 30 mA) für 45-60 min. Die Wanderung und Auftrennung der RNA in die dominanten Banden der 18 S- und 28 S-rRNA konnte anhand der Ethidiumbromideinlagerungen unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Klarheit und das Verhältnis der beiden Banden zueinander ermöglichten einen Rückschluss auf die Qualität der RNA, wobei die Intensität der 28 S-rRNA-Bande doppelt so stark sein sollte wie die der 18 S-rRNA. Fotografisch dokumentiert und archiviert wurden die Gele mit Hilfe der Video-Dokumentationsanlage GeneGenius. Bei den Proben C7 und C8 wurde auf Grund einer im Photospektrometer gemessenen sehr geringen RNA-Konzentration auf ein RNA-Gel verzichtet und lediglich eine Untersuchung mit dem Bioanalyser vorgenommen (vgl. dazu auch Abbildung 9).

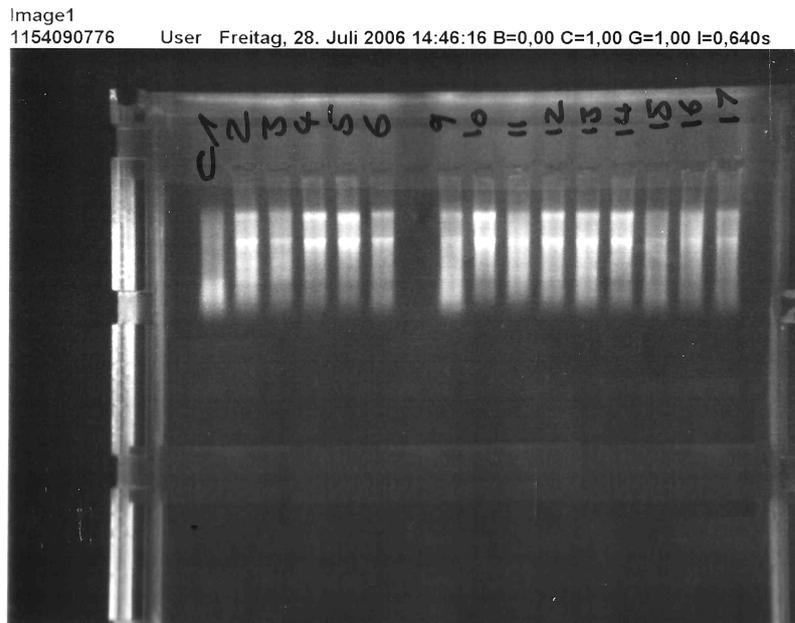


Abbildung 9: **RNA-Gel-Proben der untersuchten Reproduktionsorgane;**  
n = 15, Bezeichnung der Proben anhand ihrer Lfd.Nr., zur näheren Beschreibung der Proben siehe Tabelle 3

#### 4.4.4 Untersuchung der RNA-Qualität mit Hilfe des Bioanalyzers

Neben der Messung der Quantität der RNA im NanoDrop wurde die Qualität der Proben mittels Bioanalyser 2100 untersucht. Das Prinzip dieser Untersuchung beruht auf einer Kapillarelektrophorese in einem kompakten Chip-System, bei dem die RNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und mit einem externen Standard verglichen wird. Mit diesem Verfahren können die Größe der in der Probe vorhandenen RNA (also vor allem 18 S und 28 S) sowie ihre Konzentration bestimmt werden. Auf dem Chip befinden sich Vertiefungen für die Proben und die Größenmarker, die über ein gelgefülltes Mikro-Kanalsystem verbunden sind. Zunächst wurde der Chip in die dafür vorgesehene Priming-Station eingesetzt und die mit einem schwarzen G gekennzeichnete Vertiefung mit einer vorbereiteten Gel-Farbstoff-Matrix gefüllt (65  $\mu\text{l}$  gefilterte Gel-Matrix und 1  $\mu\text{l}$  Farbstoffkonzentrat), welche durch Druckluft in das Mikrokanalsystem gepresst wurde. Nach diesem 30 s dauernden Vorgang wurde die Priming-Station erneut geöffnet und auch in die übrigen zwei mit G gekennzeichneten Vertiefungen Gel-Matrix pipettiert (Reserve). Die verbliebenen Vertiefungen wurden mit je 5  $\mu\text{l}$  RNA-Nano-Marker beschickt. Vor Beladung des Chips mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  des RNA 6000 Größenstandards und 1  $\mu\text{l}$  der Proben wurden selbige in einem Wärmeblock bei 70°C für jeweils 2 min denaturiert. Der nun mit Proben und Marker beschickte Chip wurde für 1 min bei 2400 U/min auf einem speziellen Schüttler gründlich durchmischt, nachfolgend in den Bioanalyser eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Die im Verlauf dieses Verfahrens ge-

bildeten RNA-Farbstoff-Komplexe wurden durch einen Laser zur Fluoreszenz gebracht, so detektiert und die Daten als gelähnliche Bilder (Banden) und Elektropherogramme (Peaks) angezeigt. Weiterhin errechnet das Gerät eine RNA Integrity Number (RIN), mit der die Integrität bzw. Qualität der Gesamt-RNA beurteilt werden kann.

#### 4.4.5 Reverse Transkription

Da für eine quantitative Messung bestimmter Transkripte in der Real-Time-PCR ein cDNA-Template vorliegen muss, wurde die vorliegende RNA zunächst als Matrize für eine reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) genutzt. Für diese Reaktion wurde eine reverse Transkriptase genutzt, die aus dem Moloney murine leukemia Virus stammt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu unterbinden, wurde vor der reversen Transkription ein DNase-Verdau vorgenommen. Um eine Verunreinigung des im Anschluss genutzten DNA-Arbeitsplatzes mit DNasen zu verhindern, wurde für diesen Arbeitsschritt der bei der RNA-Extraktion genutzte Arbeitsplatz sowie spezielle gestopfte Pipettenspitzen genutzt und die Pipetten nach Gebrauch mit 70 % Ethanol gereinigt. Alle Proben wurden zwischen den einzelnen Schritten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es wurde  $1\ \mu\text{g}$  RNA in  $10\ \mu\text{l}$  PCR- $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt, zunächst  $10\ \mu\text{l}$  des DNase-Reaktionsansatzes (s.u.) hinzugefügt, die Probe gut durchmischt und anschließend für 1 min und 13000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

##### DNase-Reaktionsansatz

$4\ \mu\text{l}$	5x M-MuLV RT-Puffer
$6\ \mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$
$1\ \mu\text{l}$	RQ1 RNase-free DNase ( $1\ \text{U}/\mu\text{l}$ )

Nun wurden die Proben in den MasterCycler Gradient eingesetzt, für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend das DNase-Enzym bei  $75^{\circ}\text{C}$  für 5 min deaktiviert und die RNA-Sekundärstruktur zerstört. Nach diesem Schritt kühlte das Gerät die Proben sofort auf  $4^{\circ}\text{C}$  herunter, so daß die Proben dann gefahrlos auf Eis gelagert werden konnten, um die Denaturierung der RNA aufrecht zu erhalten. Schließlich wurden je  $20\ \mu\text{l}$  des RT-Reaktionsansatzes (s.u.) zu jeder Probe hinzugefügt, die Proben gemischt, kurz zentrifugiert und erneut in den MasterCycler eingesetzt.

**RT-Reaktionsansatz (20  $\mu$ l pro Probe)**

4 $\mu$ l	5x M-MuLV RT-Puffer
4 $\mu$ l	dNTPs (je 10 mM)
3 $\mu$ l	Random-Hexamere (50 $\mu$ M)
8 $\mu$ l	PCR-H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)

Im Cycler wurden die Proben zunächst für 10 min auf 25°C erwärmt, danach für 60 min bei 42°C inkubiert, das Enzym bei 70°C für 10 min denaturiert und zuletzt auf 4°C herunter gekühlt. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

**4.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (konventionelle PCR)**

Grundsätzlich wird bei der PCR zunächst die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, um die Einzelstränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden damit aufgebrochen. Danach wird die Temperatur 30 s lang so gehalten, dass eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing) möglich ist. Die genaue Temperatur wird hierbei durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt. Als dritter Schritt findet die Zweitstrangsynthese (Elongation) mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase (iTaq) statt. In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig heterologe Primer genutzt, deren optimale Annealing-Temperatur für bovine bzw. humane cDNA bekannt war. Es wurden jeweils die Annealing-Temperatur, Produktgröße und Sequenz überprüft. Sofern nötig, wurde eine optimale Annealing-Temperatur mittels konventioneller Gradienten-PCR ermittelt (siehe auch Kapitel 4.4.7). Zunächst wurden jeweils 5  $\mu$ l der cDNA in ein neues Reaktionsgefäß, welches sich in einem Kühlblock befand, überführt. Vom PCR-Reaktionsansatz (s.u.) wurden jeweils 20  $\mu$ l zu der aliquotierten cDNA gegeben.

**PCR-Reaktions-Ansatz**

0,5 $\mu$ l	Primer for (20 mM)
0,5 $\mu$ l	Primer rev (20 mM)
0,75 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
2,5 $\mu$ l	10x iTaq-Puffer
0,5 $\mu$ l	dNTPs (je 10 mM)
15,15 $\mu$ l	PCR-H <sub>2</sub> O
0,1 $\mu$ l	iTaq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

Die Proben wurden gut durchmischt, kurz zentrifugiert und danach in den auf 90°C vorgeheizten Cycler gegeben. Der erste Schritt diente der Aktivierung der Hotstart-Polymerase und dauerte 10 min bei 95°C. Nachfolgend schlossen sich 40 Zyklen bestehend aus 30 s bei 95°C (Denaturierung, Trennung der Doppelstränge) und 1 min bei der primerspezifischen Annealing-Temperatur (siehe Tabelle 5) an. Schließlich wurden alle Proben für 2 min auf 72°C erhitzt und danach sofort auf 4°C abgekühlt. Zur Verifikation der Amplifikate wurde die Größe aller PCR-Produkte nachfolgend mit UV-Licht in einem DNA-Agarosegel (siehe Kapitel 4.4.8) sichtbar gemacht, beurteilt und kommerziell sequenziert.

#### **4.4.7 Auswahl primerspezifischer Temperatur-Optima mit Hilfe der Gradienten-PCR**

Zur Bestimmung der jeweils optimalen Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Der Heizblock des Cyclers umfasste 12 nebeneinander liegende Heizzonen und erlaubte eine Temperaturdifferenz von maximal  $\pm 8^\circ\text{C}$ , so dass derselbe PCR-Ansatz in einem Cycler gleichzeitig unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt werden konnte. Die Temperatur-Verteilung lag bei einer mittleren Temperatur von 60°C zwischen 52°C und 68°C. Der Reaktionsansatz erfolgte wie für eine herkömmliche PCR. Die optimale Temperatur wurde im DNA-Agarose-Gel unter UV-Licht (siehe Kapitel 4.4.8) optisch bestimmt: die Temperatur mit der spezifischsten und stärksten Bande wurde als Annealing-Temperatur gewählt.

#### **4.4.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die PCR wurde das Ergebnis mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese in 2 x TAE-Puffer kontrolliert. Dafür wurden 50 ml des in der Mikrowelle verflüssigten 2-%igen Agarose-Gels mit 5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid gemischt und danach luftblasenfrei in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen und der Kamm gesetzt. Nach etwa 1 h war das Gel ausgehärtet und konnte mit 200 ml 2x TAE-Puffer überschichtet werden. Jeweils 20  $\mu\text{l}$  der PCR-Produkte wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Ladepuffer gemischt und nachfolgend je 20  $\mu\text{l}$  in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Ermittlung der PCR-Produktgröße wurden zusätzlich 10  $\mu\text{l}$  eines Standards (GeneRuler 100 bp) in zwei außenstehende Taschen verbracht. Die Gelelektrophorese wurde mit konstant 80 Volt für 45-60 min durchgeführt. Anschließend konnten die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden unter UV-Licht in der Video-Dokumentationsanlage sichtbar gemacht und abfotografiert werden.

<b>Faktor</b>	<b>°C</b>	<b>Anzahl PCR-Zyklen</b>
18 S-rRNA	61	25
Ubiquitin	56	40
eNOS	56	40
iNOS	60	40
ER-alpha	59	40
ER-beta	65	40
IGF-1	62	40
IGF-2	60	40
IGF1-R	55	40
IGFBP-1	56	40
IGFBP-2	56	40

Tabelle 5: Annealingtemperaturen und Zykluszahlen der einzelnen Primer

#### 4.4.9 Aufreinigung und Gewinnung der PCR-Produkte

Um das PCR-Produkt quantifizieren und sequenzieren zu können, wurden die in der PCR produzierten und im DNA-Agarosegel nachgewiesenen Banden zunächst mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der PCR-Produkte fand mit dem Invisorb Spin DNA Extraktions Kit der Firma Invitek nach Protokoll des Herstellers statt. Alle Zentrifugationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die im Reaktionsgefäß (2,0 ml) befindlichen Agarosegel-Stücke mit 1000  $\mu$ l des Gel Solubilizer S überschichtet und für 10 min bei 50°C auf dem Eppendorf Thermomixer Comfort unter kontinuierlichem Schütteln bei 600 U/min bis zur vollständigen Auflösung des Gels inkubiert. Danach wurden 500  $\mu$ l des Binding Enhancers hinzugefügt und die Probe gründlich durchmischt. Um das DNA-Fragment zu binden, wurden je maximal 800  $\mu$ l der Probe in mehreren Schritten auf einen in einem neuen Reaktionsgefäß befindlichen SpinFilter gegeben, bei 12000 U/min für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Im Anschluss wurden in zwei aufeinander folgenden Waschschritten jeweils 500  $\mu$ l eines Waschpuffers auf den Filter gegeben, die Proben für 30 s bei 12000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss ebenfalls verworfen, bevor sich ein Trocknungsschritt von 4 min bei 12000 U/min anschloss. Der Filter wurde auf ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 40  $\mu$ l des Elutionspuffers überschichtet, für 5-10 min inkubiert und dann für 1 min bei 12000 U/min zentrifugiert.

Die gewonnene DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Konzentration im NanoDrop-Gerät (siehe Kapitel 4.4.2) gemessen und die DNA bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

#### 4.4.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die eigentliche Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz) kommerziell durchgeführt. Vorbereitend wurden im eigenen Labor folgende Reaktionsschritte vorgenommen: Bei der Sequenziermethode nach dem Prinzip des Didesoxy- bzw. Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger et al. (1977) wurde zunächst eine PCR mit nur einem Primer durchgeführt [163]. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA lagert sich der zugegebene Primer an und die Polymerase beginnt mit der Synthese des komplementären Stranges. Da dem Reaktionsansatz zusätzlich zu den nötigen dNTPs eine gewisse Menge mit Fluoreszenzfarbstoff markierte ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphat, fehlende OH-Gruppe am 3'-Ende) zugesetzt sind, kommt es bei Einbau dieser jeweils zu Kettenabbrüchen. Die so vorbereiteten Proben wurden an die Firma GATC Biotech gesendet, wo diese DNA-Kettenfragmente mittels Kapillar-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurden, was eine Sequenzanalyse mittels Laserabtastung ermöglichte.

Die Sequenzier-Reaktion erfolgte mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit unter Gebrauch des folgenden Reaktionsansatzes:

<b>Reaktionsansatz Sequenzieren</b>	
6 µl	DNA, Amplikon
2 µl	verdünnter Primer (5,25 µl PCR-H <sub>2</sub> O + 1 µl Primer = 3,2 pmol/µl)
2 µl	BigDye Kit

Der so hergestellte Reaktionsansatz wurde zur Unterbindung eines Verdunstungsverlustes mit 20 µl Mineralöl überschichtet und die Sequenzierreaktion bei folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: zunächst 10 s bei 96°C, dann 25 Zyklen von 50°C für je 5 s, 60°C für 4 min und 96°C für 10 s. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz auf 4°C herunter gekühlt. Die Reaktionsgefäße wurden an die Firma GATC Biotech gesendet, welche die Kapillar-Elektrophorese auf einem DNA Analyzer ABI 3730XL durchführten. Die erfassten Sequenzen wurden mit dem Programm DNASIS sowie von Hand ausgewertet, mit bekannten humanen Sequenzen in der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, USA) verglichen und, sofern für *Callithrix jacchus* noch nicht vorhanden, in selbige Datenbank eingespeist.

#### 4.4.11 Real-Time-PCR mittels SYBR Green

Zur Quantifizierung der cDNA wurde eine Real-Time-PCR im RotorGene 3000 durchgeführt. Der für dieses Projekt genutzte DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green lagert sich in die doppelsträngige DNA ein. Die Erhöhung der Fluoreszenz erfolgt proportional zur Vermehrung der Amplifikate. Diese Methode zur Quantifizierung ermöglicht es, die Amplifizierung der Templates über den gesamten Reaktionsverlauf, bzw. nach jedem einzelnen Zyklus der PCR zu messen. Daher kann die Amplifikation so bereits in der frühen exponentiellen Phase der Real-Time-PCR detektiert werden, welches einen Vorteil gegenüber der traditionellen PCR darstellt, in der nur der Endpunkt der PCR quantitativ gemessen werden kann. In der exponentiellen Phase der Amplifikation ist sichergestellt, dass alle Reagenzien ausreichend vorhanden sind, während sich die Plateau-Phase durch einen Mangel an Komponenten auszeichnet, die die Reaktion verlangsamen. Diese Plateau-Phase stellt das Ende der Reaktion dar, es werden keine neuen Amplifikate hergestellt. Die exakte Menge cDNA wurde durch das Gerät anhand der Standardkurve eines definierten PCR-Produktes ermittelt. Zunächst wurde die benötigte Standardreihe in 10er Verdünnungsschritten hergestellt, wofür jeweils 2,0  $\mu\text{l}$  des Standards mit 18,0  $\mu\text{l}$  PCR- $\text{H}_2\text{O}$  gründlich durchmischt und nachfolgend weitere 1:10 Verdünnungen hergestellt wurden.

##### **Real-Time-PCR-Reaktionsansatz**

0,2 $\mu\text{l}$	Primer for (20 $\mu\text{M}$ )
0,2 $\mu\text{l}$	Primer rev (20 $\mu\text{M}$ )
5,0 $\mu\text{l}$	2x SensiMix (dT)
0,2 $\mu\text{l}$	50x SYBR Green-Solution
3,4 $\mu\text{l}$	PCR- $\text{H}_2\text{O}$

Alle Komponenten des Real-Time-PCR-Reaktionsansatzes (s.o.) mit Ausnahme des SYBR Greens wurden gründlich durchmischt, anschließend das SYBR Green zugefügt, der Ansatz erneut durchmischt und für etwa 30 s bei 13000 U/min zentrifugiert. Für die Durchführung der PCR wurden 0,1 ml Reaktionsgefäße verwendet, welche während der Vorbereitung der Proben in einem vorher auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühlten Metallblock lagerten. Es wurden je 9,0  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes in jedes Reaktionsgefäß vorgelegt. Im Anschluss wurden je 1,0  $\mu\text{l}$  cDNA, Standard oder PCR- $\text{H}_2\text{O}$  (Negativ-Kontrolle) zugegeben, die Gefäße verschlossen, in den RotorGene RG-3000 eingesetzt und das entsprechende Programm gestartet. Grundsätzlich wurden 45 Zyklen des Cycling Programmes (siehe Tabelle 6) durchgeführt. Lediglich bei der Amplifikation mit 18 S-rRNA-Primern wurde eine geringere Zykluszahl gewählt (25 Zyklen), da hier erfahrungsgemäß die Plateau-Phase der Amplifikation bereits deutlich früher

PCR-Programm		Temperatur	Zeit	Zykluszahl
HOLD		95°C	10 min	1
CYCLING	Denaturierung	95°C	15 s	25 bzw. 40 s. Tabelle 5
	Annealing	siehe Tabelle 5	20 s	
	Extension	72°C	30 s	
MELT		50-50,5°C	15 s	1
		99°C	5 s/0,5°C	
HOLD 2		40°C	1 min	1

Tabelle 6: Cycling Programm der Real-Time-PCR

erreicht wird. Die primerspezifischen Annealing-Temperaturen finden sich in Tabelle 5. Die Real-Time-PCR der Housekeeping-Gene 18 S-rRNA und Ubiquitin wurde für alle Proben zur Überprüfung der Qualität und Effizienz der reversen Transkription und zur Normalisierung der Expressionsdaten genutzt. Zur Beurteilung der Spezifität jedes Amplikons wurde im Anschluss an die Amplifikationszyklen vom Real-Time-Gerät eine Schmelzkurve erstellt. Die spezifischen Schmelztemperaturen der PCR-Produkte finden sich in Tabelle 7. Zur Auswertung wurde nach Ablauf des Cycling-Programmes die vom Hersteller zur Verfügung gestellte Software Rotor-Gene 6.0 genutzt. Dabei wurde zunächst für alle Proben der sogenannte  $C_T$ -Wert (cycle threshold) ermittelt, welcher der Zykluszahl zum Zeitpunkt exponentieller Amplifikation entspricht. Da eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem  $C_T$ -Wert besteht, konnte anhand der  $C_T$ -Werte der Standards eine Standardkurve erstellt werden, deren Korrelationskoeffizient (R-Wert) optimal bei 0,99 lag und mit deren Hilfe aus den  $C_T$ -Werten der anderen Proben die cDNA-Ausgangs-Konzentration errechnet werden konnte. Zusätzlich wurde die Effizienz der Reaktion anhand der Steigung der Regressionsgeraden bestimmt, welche durchschnittlich in einem Bereich von 90 % lag. Eine Auswertung fand nach der Überprüfung der Schmelzpunktkurve und der Spezifität des Produktes statt.

#### 4.4.12 Etablierung der Primer

Genutzt wurden im Institut vorliegende Multi-Spezies-Primer, die bereits in den Spezies Pferd oder Rind erprobt waren. Zunächst wurden die Primer an diversen unterschiedlichen Organen von *Callithrix jacchus* getestet. Die Organe durchliefen dasselbe RNA-Extraktions- und RT-PCR-Programm wie oben beschrieben. Danach erfolgte der Primer-Test in der kon-

Faktor	°C
18 S-rRNA	83,9 und 90,2
Ubiquitin	84,2
eNOS	85,3
iNOS	87,6
ER- $\alpha$ (L)	82,3
ER- $\beta$ (B)	84,6
IGF-1	85,7
IGF-2	88,5
IGF1-R	84,7
IGFBP-1	79,0
IGFBP-2	87,3

Tabelle 7: Spezifische Schmelztemperaturen der einzelnen PCR-Produkte

ventionellen Block- bzw. Gradienten-PCR, ebenfalls wie oben beschrieben. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte in DNA-Agarose-Gel sichtbar gemacht und so kontrolliert, ob die verwendeten Primer auch in *Callithrix jacchus* Gewebe arbeiten. Als finale Kontrolle wurde die amplifizierte Sequenz mit der humanen oder callithrichiden Sequenz verglichen, um die Sequenzhomologie zu bestimmen.

#### 4.4.13 Normalisierung der Ergebnisse

Um mögliche Fehler bei der Probenaufbereitung und -analyse (Präzision beim Pipettieren, Effizienz und Wirkungsgrad bei der RNA-Extraktion und der Reversen Transkription, minimal unterschiedliche Probengröße) auszugleichen, wurde eine Normalisierung der Ergebnisse durchgeführt. Auch wenn bei der Real-Time-PCR Unterschiede in den PCR-Effizienzen im Gegensatz zur konventionellen PCR minimiert sind, erfordert diese Methode dennoch die Korrektur potentieller Störfaktoren. Ziel der Normalisierung ist es, Ergebnisse mit unterschiedlichem Grundniveau vergleichbar zu machen. Zu diesem Zwecke gibt es mehrere mögliche Strategien: Zum einen kann versucht werden, die Probengrößen exakt zu standardisieren. Diese Methode ließe jedoch außer Acht, dass die weitere Aufbereitung der Proben ein hohes Fehlerpotential birgt. Zum anderen können die gemessenen Werte mit dem Gesamtgehalt an genomischer DNA abgeglichen werden. Dies ist jedoch hier nicht möglich, da diese

---

am Beginn der Probenbearbeitung entfernt wurden. Weiterhin ist die Genauigkeit der Methode umstritten [213]. Auch die Gesamt-RNA kann zur Normalisierung herangezogen werden, z.B. über eine Mengenbestimmung im Agilent Bioanalyzer. In dieser Arbeit erfolgt die Normalisierung jedoch über mehrere Haushaltsgene. Die Housekeeping-Gene fungieren dabei als Referenzwert für die cDNA-Konzentration. Dazu werden möglichst stabil exprimierte Gene genutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, dass die in der Aufbereitung der Proben unter Umständen gemachten Fehler gleichermaßen die Housekeeping-Gene wie die untersuchten Faktoren betreffen [213].

Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurden die gemessenen Konzentrationen über zwei Transkripte, die 18 S-rRNA und das Ubiquitin normalisiert. Die Korrelation zwischen diesen beiden Genen lag bei über 80 %. Dies spricht für eine relativ stabile Expression der ausgesuchten Housekeeping-Gene in Bezug auf die spezifischen Gewebe, so dass sie für die Normalisierung geeignet erschienen.

Bei einer Normalisierung wird üblicherweise das Verhältnis zwischen den Expressionen des Zielgens und des Referenzgens gebildet. Da hier zwei Referenzgene zur Anwendung kommen, wurde, wie von Vandesompele vorgeschlagen über dem geometrischen Mittel der beiden Referenzgene (Divisor) normalisiert [205]. Die (dimensionslose) relative Konzentration  $C_{X0}$  des untersuchten Faktors  $X$  berechnet sich daher aus den gemessenen Konzentrationen des untersuchten Faktors ( $C_X$ ) und der beiden Housekeeping-Gene 18 S ( $C_{H1}$ ) und Ubiquitin ( $C_{H2}$ ):

$$C_{X0} = \frac{C_X}{\sqrt{C_{H1}C_{H2}}}$$

Alle nach dieser Formel berechneten Konzentrationen werden im Folgenden als *relative mRNA-Expression* beschrieben.

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der Faktoren 18 S-rRNA, Ubiquitin, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , eNOS, iNOS, IGF-1, IGF-2, IGF1-R, IGFBP-1 und IGFBP-2 in Gesamt-Uteri, Uterus-Schleimhaut und Plazenten von Weißbüschelaffen untersucht. Die Expressionsuntersuchung erfolgte zu unterschiedlichen Zykluszeitpunkten sowohl normalzyklisch unbehandelter, als auch normalzyklisch hormonbehandelter (FSH und hCG) Tiere.

Im Rahmen der Studie wurde die qualitative und quantitative mRNA-Expression der einzelnen Faktoren in verschiedenen Geweben ermittelt. Zusätzlich wurden histologische Organschnitte angefertigt und mittels Immunhistologie die Faktoren ER- $\alpha$ , eNOS und iNOS angefärbt, um die Expression der untersuchten Faktoren auf Protein-Ebene mit der Expression auf Transkript-Ebene vergleichen zu können. Detail-Informationen bezüglich der untersuchten Organproben siehe auch Tabellen 3 bzw. 8.

Wie bereits in Kapitel 4.4.13 erläutert, wurde jeweils der mRNA-Gehalt mit Hilfe zweier Housekeeping-Gene normalisiert und wird im Folgenden als *relativer* mRNA-Gehalt grafisch dargestellt. Dennoch werden die tatsächlich gemessenen *absoluten* mRNA-Gehalte jeweils kurz erwähnt, um hervorzuheben, wie ausgeprägt die Expressions-Unterschiede zwischen den einzelnen Faktoren, insbesondere den Housekeeping-Genen im Vergleich zu den anderen untersuchten Faktoren sind.

Gerade die sehr geringen absoluten Werte einiger Faktoren wirken sich limitierend auf die Möglichkeiten der Interpretation der Real-Time-PCR-Ergebnisse aus, da selbst kleinste Fehler auf Ergebnisse der Real-Time-PCR hier eine große Wirkung hätten. Bei der grafischen Darstellung der relativen mRNA-Gehalte wurde zur besseren Vergleichbarkeit bewusst jeweils eine Multiplikation mit dem Faktor  $10^{-6}$  gewählt.

Generell wurden für alle elf Transkripte in allen Callithrix-Organen spezifische Amplifikate nachgewiesen; die absolute und relative Menge war allerdings sehr unterschiedlich. Im Folgenden werden die einzelnen mRNA-Ergebnisse im Detail dargestellt.

Säule	Lfd. Nr.	Organ	Zyklusphase	
1	C 10	Uterus	1. d FP	FP
2	C 9	Uterus	2. d FP	
3	C 5	Uterus	4. d FP	
4	C 6	Uterus	4. d FP	
5	C 4	Uterus	7. d FP	
6	C 7	Uterus-SH	4. d FP post FSH	FP+FSH
7	C 8	Uterus-SH	4. d FP post FSH	
8	C 11	Uterus	4. d FP post FSH	
9	C 12	Uterus	4. d FP post FSH	
10	C 13	Uterus	7. d FP post FSH	
11	C 14	Uterus	8. d FP post hCG	FP+hCG
12	C 15	Uterus	8. d FP post hCG	
13	C 16	Uterus	frühe LP	LP
14	C 17	Uterus	9. d LP	
15	C 1	Plazenta	ca. 144 d grav.	PI144
16	C 2	Plazenta	ca. 144 d grav.	
17	C 3	Plazenta	ca. 144 d grav.	

Tabelle 8: Für die Expressionsanalyse verwendete Gewebeproben aus dem Reproduktionstrakt von *Callithrix jacchus*, aufgeführt in der Reihenfolge, in der sie in den Ergebnisgrafiken aufgetragen sind. SH = Schleimhaut, FP = Follikelphase, LP = Lutealphase

## 5.1 Housekeeping-Gene

### 5.1.1 18 S-rRNA

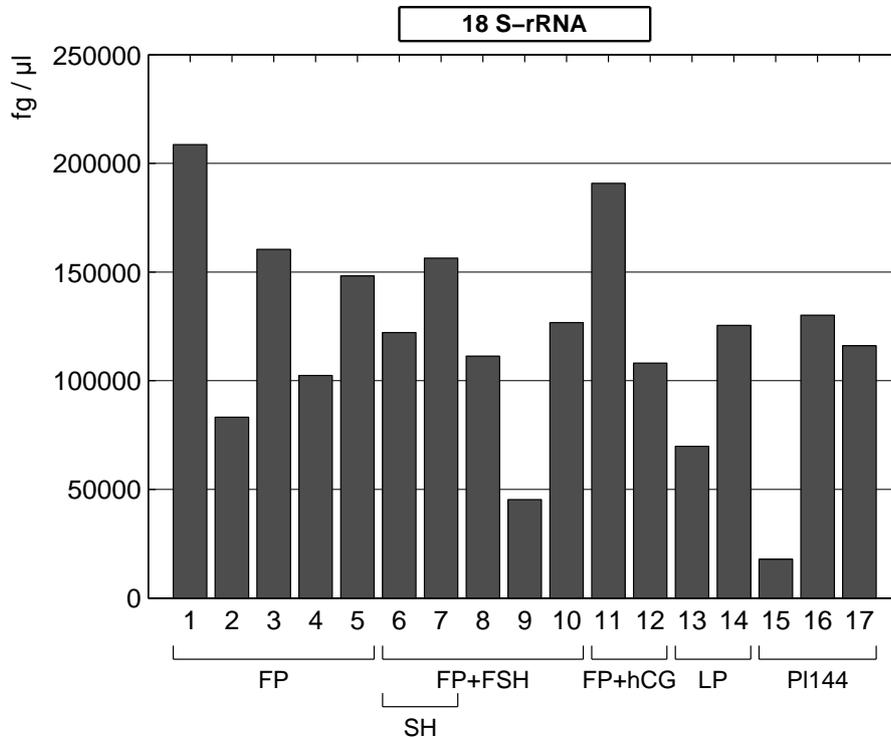


Abbildung 10: **18 S rRNA-Expression** in allen Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Zyklustag und Hormonbehandlung; Total-RNA in fg/µl; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

Die in Abbildung 10 aufgetragene *absolute* Expression der callithrichiden 18 S-rRNA war Grundlage der in Kapitel 4.4.13 vorgestellten Normalisierung. Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnte eine absolute 18 S-rRNA-Konzentration in der Größenordnung von  $1,79 \times 10^4$  bis  $20,87 \times 10^4$  fg/µl Gesamt-RNA detektiert werden. Bei der Überprüfung des callithrichiden PCR-Produkts konnte sowohl mit den bekannten humanen, als auch callithrichiden 18 S-rRNA-Sequenzen jeweils eine 100-%ige Übereinstimmung durch cDNA-Sequenzierung festgestellt werden.

Die jeweiligen eigenen Sequenzen sowie die EMBL Acc. No. der zum Vergleich des PCR-Produkts herangezogenen Sequenzen befinden sich in Anhang A.

## 5.1.2 Ubiquitin

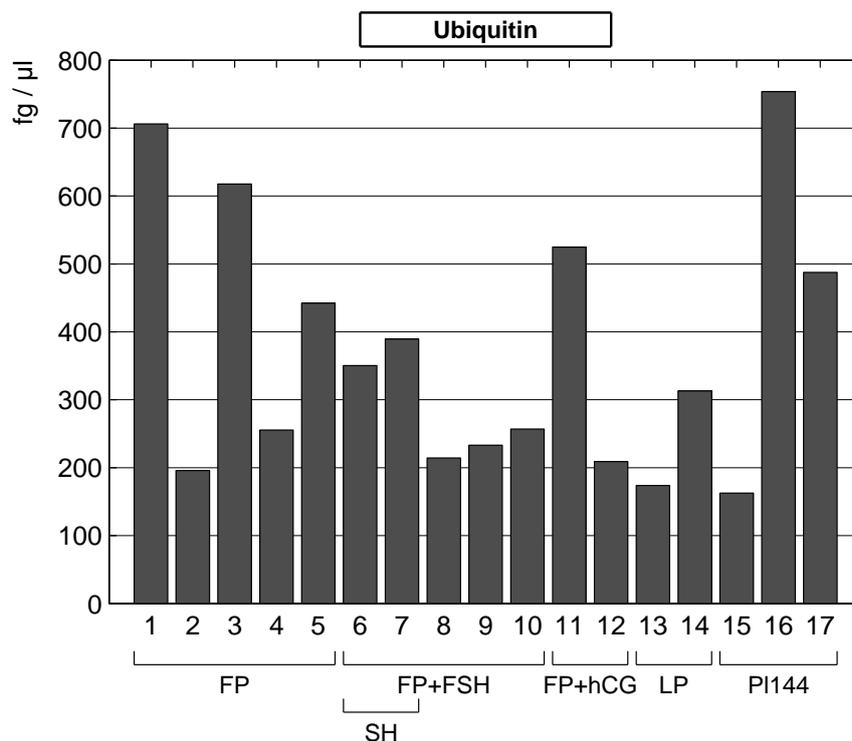


Abbildung 11: **Ubiquitin mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Zyklustag und Hormonbehandlung; Total-RNA in fg/µl; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

Da unter anderem die Expression dieses Faktors Grundlage der Normalisierung war, ist in Abbildung 11 die *absolute Expression* der Ubiquitin-mRNA in den Proben grafisch dargestellt. Die Messung der Genexpression in der Real-Time-PCR ergab eine *absolute* Ubiquitin-mRNA-Konzentration von  $1,63 \times 10^2$  bis  $7,54 \times 10^2$  fg/µl Gesamt-RNA. Bei der Überprüfung des 189 bp langen PCR-Produkts konnte auf der Aminosäuren-Ebene eine 100-%ige Übereinstimmung, auf der Nukleotid-Ebene eine Übereinstimmung von 97,8 % mit der bekannten humanen Sequenz festgestellt werden (4 von 189 Nukleotiden differierend zu human). Beim Vergleich mit einer publizierten callithrichiden Sequenz konnte eine 99,5 %ige Homologie auf Nukleotid-Ebene nachgewiesen werden, wodurch lediglich eine Aminosäure in der Sequenz abweicht, siehe Anhang A.

Alle untersuchten Organe wurden im Folgenden mittels eines gemeinsamen, auf Basis der Housekeeping-Genexpression gebildeten Faktors normalisiert. Zum gewählten Normalisierungsverfahren siehe Kapitel 4.4.13.

## 5.2 Östrogen-Rezeptoren

### 5.2.1 ER- $\alpha$

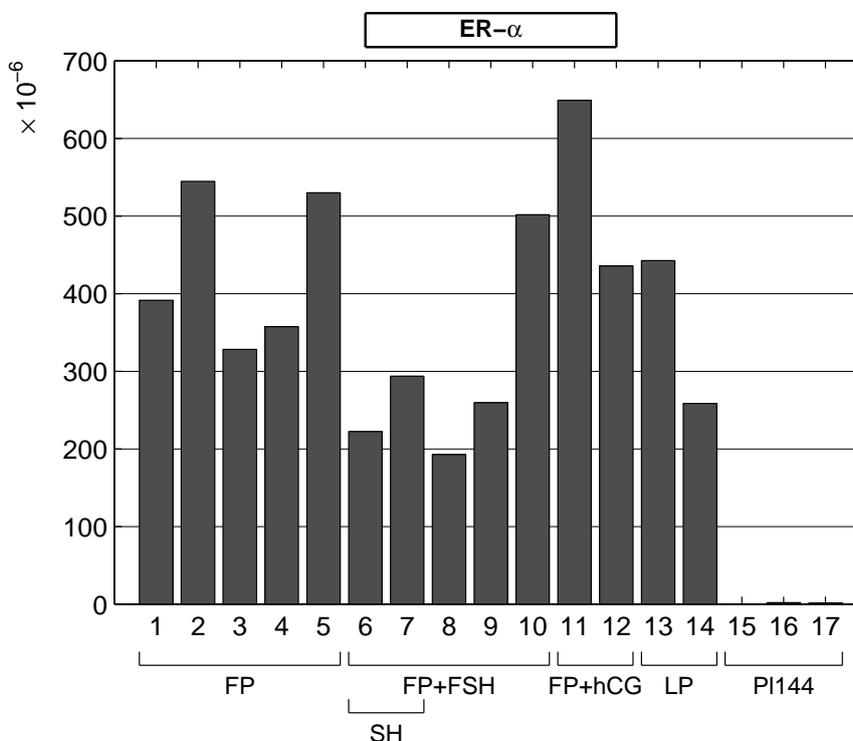


Abbildung 12: **Relative ER- $\alpha$  mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

ER- $\alpha$  mRNA konnte in einer Gesamtgrößenordnung von absolut 0,00031 bis 6,49 fg/ $\mu$ l nachgewiesen werden. Nach der Normalisierung (siehe Abbildung 12) über den jeweiligen Housekeeping-Gen-Faktor ergaben sich relative Konzentrationen von  $0,18 \times 10^{-6}$  bis  $648,96 \times 10^{-6}$ . Die Überprüfung des PCR-Produktes ergab eine große Homologie (97,1 %) zur humanen Sequenz (5 von 173 auswertbaren Basenpaaren differierten, welches sich in einer anderen Aminosäure niederschlug). Die Homologie zu einer publizierten callithrichiden Sequenz war mit 98,3 % noch höher, siehe Anhang A. Dadurch ergeben sich zur publizierten callithrichiden Sequenz zwei abweichende Aminosäuren.

In der Plazenta waren die relativen ER- $\alpha$ -Konzentrationen mit Werten von  $0,18 \times 10^{-6}$  bis  $1,91 \times 10^{-6}$  im Vergleich zu allen Uterus und Uterusschleimhaut-Proben deutlich vermindert. Im Uterus waren im Gegensatz dazu relative Werte von  $192,61 \times 10^{-6}$  bis  $648,96 \times 10^{-6}$  nachweisbar. In der frühen Follikelphase unter iatrogenem zugeführtem FSH-Einfluss waren die ER- $\alpha$ -mRNA-Gehalte tendenziell niedriger als in den Vergleichsproben (Balken 6-9), während anhand der vorliegenden gemessenen Werte kein relevanter Expressionsunterschied

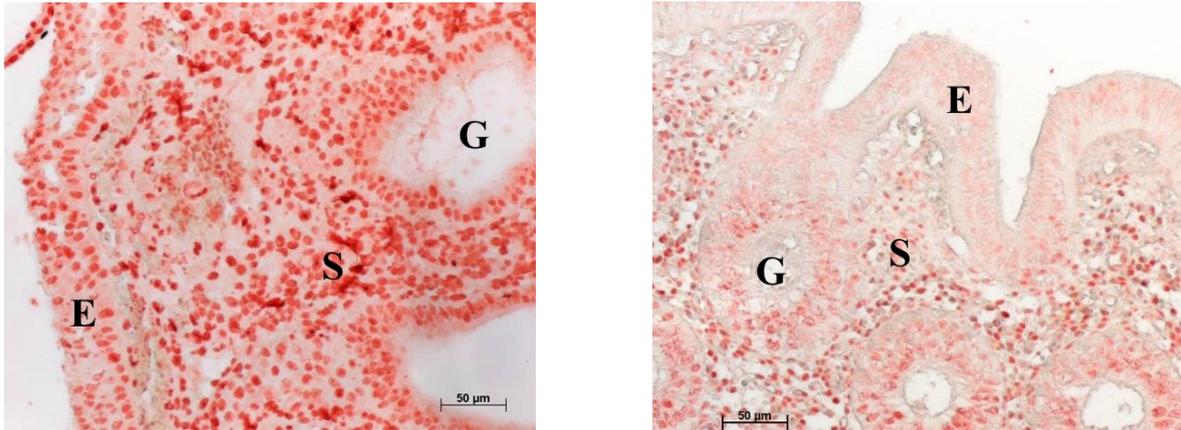


Abbildung 13: **ER- $\alpha$ : Immunhistologische Färbung des Endometriums, gravid (links) und nicht gravid (rechts), 12./13. Tag post ov., G = Glandula, uterine Drüsen; S = Stroma, Interstitium; E = Epithel;** zur Verfügung gestellt von Prof. Einspanier, Vet-Phys-Chem Institut, Universität Leipzig

zwischen Follikel- und Lutealphase oder durch eine Behandlung mit hCG ersichtlich ist.

Für den Faktor ER- $\alpha$  wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen angefertigt, die mir dankenswerterweise von Frau Prof. A. Einspanier, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut zur Verfügung gestellt wurden. Da der Östrogen-Rezeptor bekanntermaßen ein kernständiger Rezeptor ist (siehe Kapitel 2.5.2), handelt es sich bei dieser Färbung um eine Kernfärbung, bei der das Zytoplasma ungefärbt bleibt. Es erfolgte keine Gegenfärbung mit dem blauen Farbstoff Hämalaun, um eine Überfärbung der positiv gefärbten Östrogen-Rezeptoren zu vermeiden. Im graviden Uterus kann eine deutliche Kernfärbung des Epithels, Interstitiums und der uterinen Drüsen um den Implantationszeitpunkt (12/13 Tage post ov.) beobachtet werden (Abbildung 13 links), während im nicht-graviden Uterus des Weißbüschelaffen zum selben Zykluszeitpunkt nur ein schwacher Proteinnachweis im tiefer gelegenen Interstitium und den Drüsen gelang (Abbildung 13 rechts). Die hier vorliegenden immunhistologischen Organfärbungen sind auch Bestandteil einer gemeinsamen, im Jahr 2009 von Einspanier et al. veröffentlichten Arbeit, siehe [47].

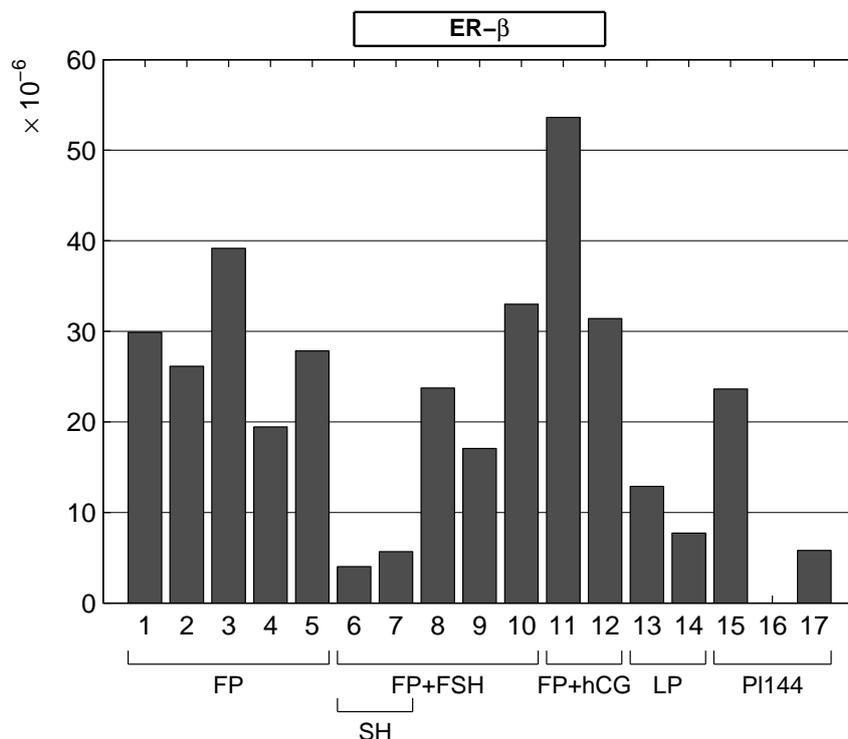
5.2.2 ER- $\beta$ 

Abbildung 14: **Relative ER- $\beta$  mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

In den untersuchten Proben konnte ein absoluter ER- $\beta$ -mRNA-Gehalt von 0,03 bis 0,54 fg/ $\mu$ l nachgewiesen werden, während sich die relativen mRNA-Gehalte in der Größenordnung  $4,03 \times 10^{-6}$  bis  $53,6 \times 10^{-6}$  bewegten (siehe Abbildung 14). Bei dem für diese Arbeit sequenzierten PCR-Produkt handelt es sich um die Basenpaare 1009-1256 einer bereits publizierten *Callithrix jacchus*-Sequenz mit einer Länge von insgesamt 1651 bp. Es lag eine 100-%ige Übereinstimmung mit dieser Sequenz vor. Ein Vergleich mit einer humanen Sequenz ergab großflächige Homologien, die jedoch von einem dazwischen lokalisierten Genabschnitt unterbrochen wurden, siehe Anhang A.

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, wurden in der Uterus-Schleimhaut deutlich geringere mRNA-Gehalte als in unbehandelten und post FSH Gesamt-Uterus Proben der Follikelphase nachgewiesen. Uteri der Follikelphasen post hCG wiesen tendenziell leicht erhöhte Werte auf. In der Lutealphase war die relative Expression niedriger als in den Gesamt-Uteri der Follikelphase. Insgesamt ist die relative mRNA-Expression des ER- $\beta$  etwa um den Faktor 10 geringer als die des ER- $\alpha$ .

Bei der Untersuchung des Faktors ER- $\beta$  in der Real-Time-PCR war die Probe C2 (Säule 16) nicht auswertbar.

## 5.3 NO-Synthasen

### 5.3.1 eNOS (NOS3)

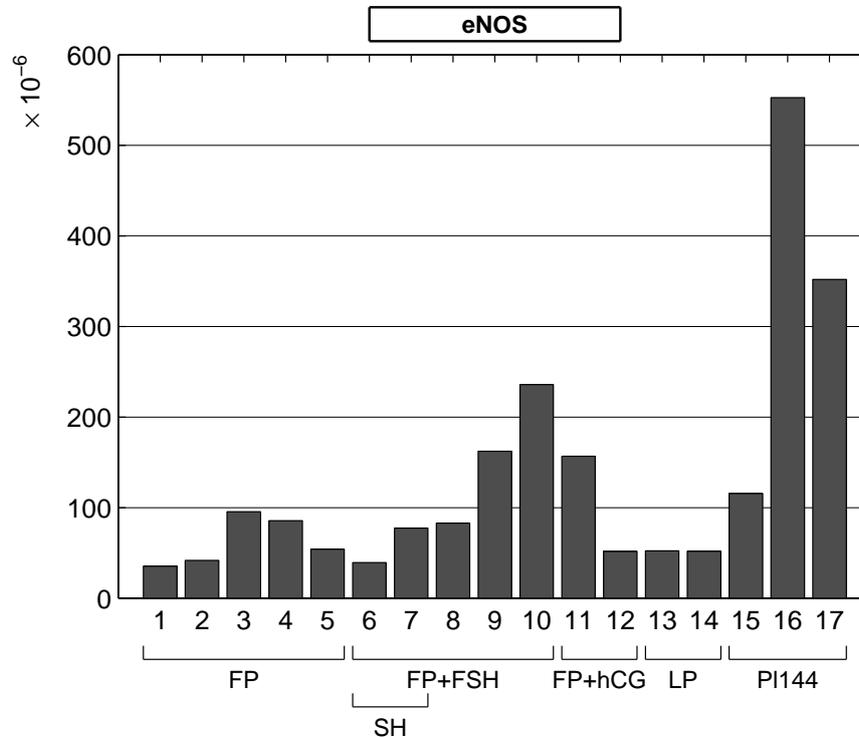


Abbildung 15: **Relative eNOS mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

Die Messung der Expression der eNO-Synthase mit Hilfe der Real-Time-PCR ergab einen absoluten mRNA-Gehalt von 0,17 bis 5,47 fg/ $\mu$ l, daraus ergaben sich normalisierte relative mRNA-Gehalte von  $35,46 \times 10^{-6}$  bis  $552,72 \times 10^{-6}$ . Die Sequenzierung der 145 auswertbaren Basenpaare zeigte neben einem insgesamt hohen Homologiegrad (98,0 %) zur humanen Sequenz an drei Stellen andere Basen, welche jedoch keine Veränderung in der Aminosäuresequenz zur Folge haben. Bei einem Sequenzvergleich mit einer in der Zwischenzeit publizierten callithrichiden Sequenz konnte eine 99,3-%ige Homologie mit nur einem differierenden Nukleotid festgestellt werden, welches jedoch nicht identisch mit den zur humanen Sequenz abweichenden Nukleotiden ist. Die Aminosäuresequenz der beiden verglichenen callithrichiden Sequenzen ist identisch, siehe Anhang A.

Die Expression der eNOS-Synthase in den Gesamt-Uteri nimmt im Verlauf der Follikelphase zunächst zu und danach wieder leicht ab. Dieser Verlauf ist auch in den Uterusproben post FSH nachvollziehbar, hier jedoch mit durchweg höherer Konzentration. Die gemessenen Werte in den Uteri der Lutealphase waren vergleichsweise niedrig, während die Plazenta

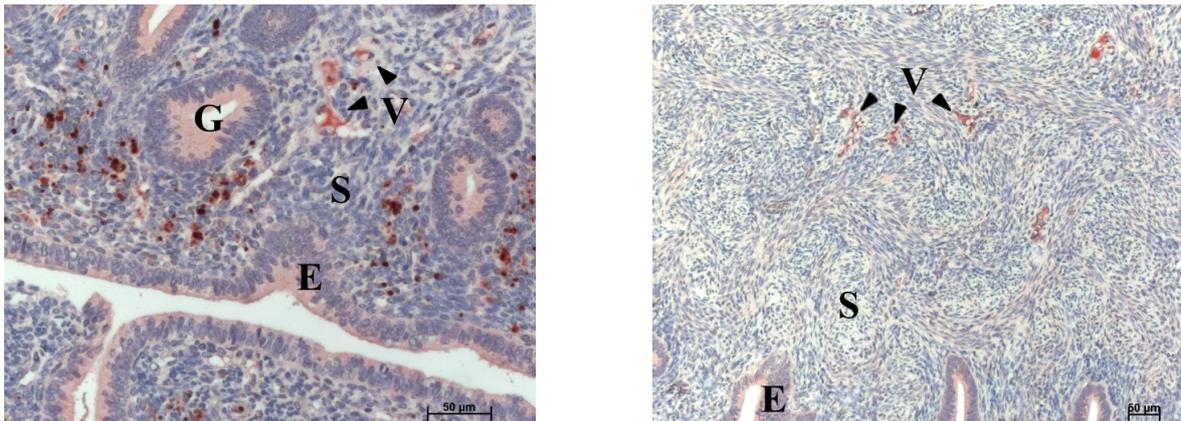


Abbildung 16: eNOS: Immunhistologische Färbung des Endometriums, gravid (links) und nicht gravid (rechts), 12./13. Tag post ov., G = Glandula, uterine Drüsen; S = Stroma, Interstitium; E = Epithel, V = Vas, Blutgefäß; zur Verfügung gestellt von Prof. Einspanier, Vet-Phys-Chem Institut, Universität Leipzig

deutlich erhöhte relative eNOS-Konzentrationen aufwies.

Auch hier wurden von Frau Prof. Einspanier, Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, dankenswerter Weise immunhistologische Färbungen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Während im nicht-graviden Uterus (Abbildung 16 rechts) vorrangig Zellen der Gefäßwände positiv gefärbt werden konnten (siehe Pfeile), zeigt sich im graviden Uterus um den 12./13. Tag post ov. eine deutliche, zusätzliche Färbung im Stroma des Endometriums (Abbildung 16 links).

## 5.3.2 iNOS (NOS2)

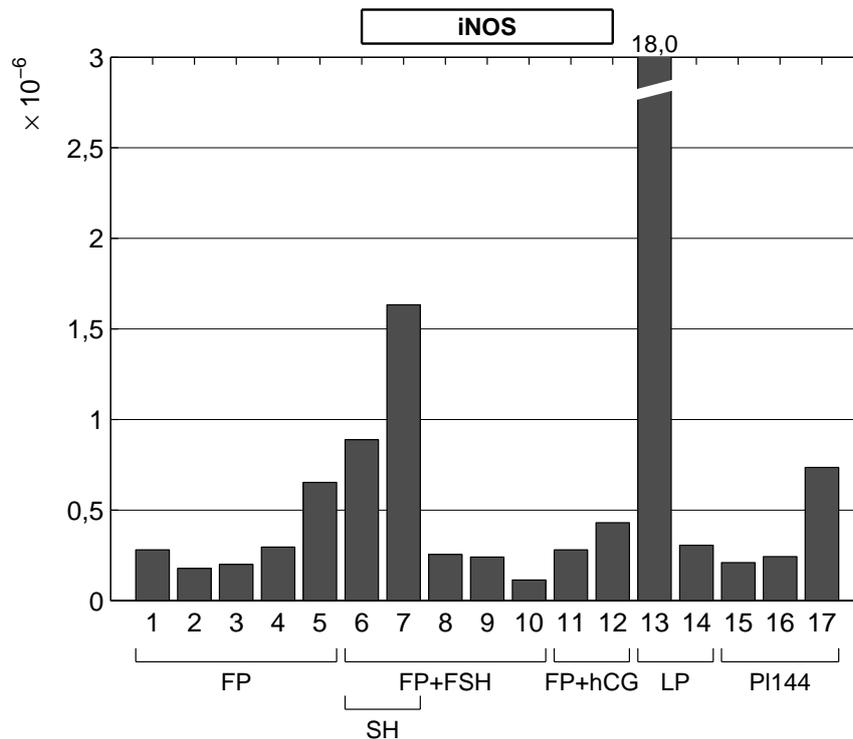


Abbildung 17: **Relative iNOS mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

Der mittels Real-Time-PCR ermittelte Gesamtgehalt an iNOS-mRNA lag ohne die Ausreißerprobe der frühen Lutealphase (Balken 13) bei 0,000358 bis 0,013 fg/ $\mu$ l, während der gemessene Wert dieser speziellen Probe mit 0,063 fg/ $\mu$ l vergleichsweise hoch ist. Die in der dargestellten Grafik (Abbildung 17) aufgetragenen relativen mRNA-Gehalte der Proben mit Werten von  $0,114 \times 10^{-6}$  bis  $1,63 \times 10^{-6}$  zeigen die Diskrepanz zum relativen mRNA-Gehalt der Uterusprobe zum Zeitpunkt einer frühen Lutealphase besonders deutlich ( $18,04 \times 10^{-6}$ ). Bei der Sequenzierung des Amplifikates konnten auf der Nukleotid-Ebene mit 199 auswertbaren Basenpaaren 14 zur humanen Sequenz differierende Nukleotide festgestellt werden, was auf der Proteinebene 3 differierende Aminosäuren zur Folge hatte. Somit lag der Grad der Homologie der Nukleotid-, bzw. Proteinsequenz bei 93,0 % respektive 95,5 %. Zu einer zwischenzeitlich veröffentlichten callithrichiden iNOS-Sequenz ergab ein Vergleich eine Homologie von 98,0 % mit vier abweichenden Nukleotiden und 2 differierenden Aminosäuren, siehe Anhang A.

Die in den Proben gemessenen Werte sind zunächst scheinbar recht inhomogen, die in der Grafik deutlichen Unterschiede zwischen den Proben sind insgesamt jedoch gering, da die gemessenen Werte nahe der Nachweisgrenze liegen. Der im Vergleich ungewöhnlich hohe

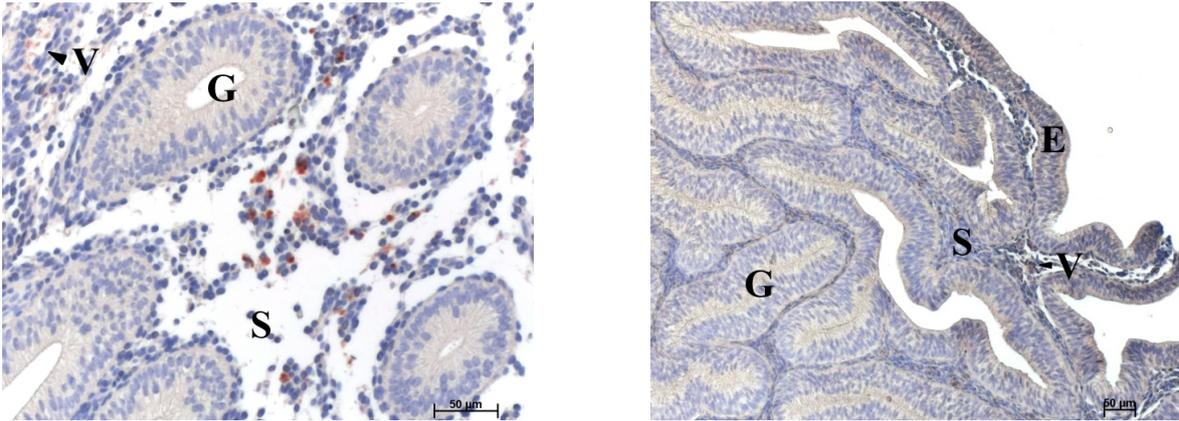


Abbildung 18: iNOS: Immunhistologische Färbung des Endometriums, gravid (links) und nicht gravid (rechts), 12./13. Tag post ov., G = lat. Glandula, uterine Drüsen; S = Stroma, Interstitium; V = Vas, Blutgefäß; zur Verfügung gestellt von Prof. Einspanier, Vet-Phys-Chem Institut, Universität Leipzig

Wert der frühen Lutealphase beträgt etwa die Hälfte des niedrigsten gemessenen Wertes an eNOS-Amplifikaten.

Die hierzu angefertigten immunhistologischen Bilder zeigen im nicht-graviden Uterus (Abbildung 18 rechts) keinerlei Färbung für das iNOS-Enzym, während im konzeptiven Uterus (Abbildung 18 links) am 12.ten Tag post ov. eine geringgradige, disseminierte Färbung des Stromas beobachtet werden kann. Auch diese Bilder wurden von Frau Prof. Einspanier, Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

## 5.4 Insulin-like growth factor-System (IGF-System)

### 5.4.1 Liganden: IGF-1 und IGF-2

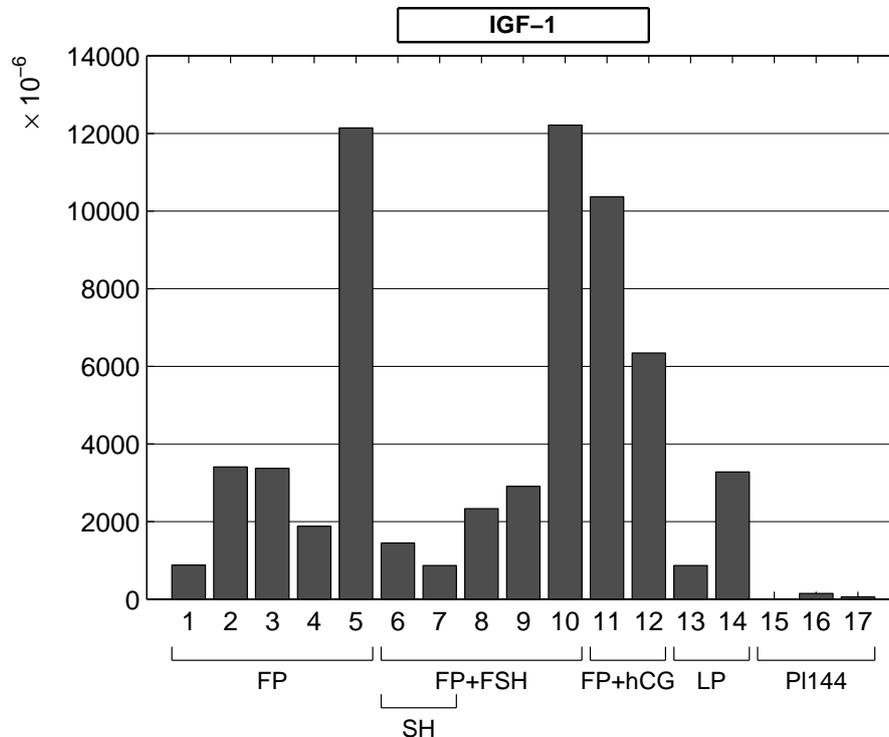


Abbildung 19: **Relative IGF-1 mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

**5.4.1.1 IGF-1** Der Gesamtgehalt an IGF-1-Amplifikaten konnte mit absolut 0,000408 bis 103,76 fg/ $\mu$ l festgestellt werden, während der relative Gehalt zwischen  $23,93 \times 10^{-6}$  und  $12213,98 \times 10^{-6}$  lag. Im Falle dieses Faktors konnte der sequenzierte Genabschnitt mit einer vorliegenden *Callithrix jacchus*-Sequenz verglichen werden. In der hier vorliegenden Arbeit waren 228 Basenpaare des Amplikons auswertbar, während die bereits publizierte Sequenz eine Länge von 872 bp hatte. Der Grad der Homologie zwischen diesen beiden *Callithrix jacchus*-Sequenzen lag auf der Nukleotid-Ebene bei 98,7 % und damit recht hoch, siehe Anhang A.

Die in der Grafik (Abbildung 19) aufgetragenen relativen mRNA-Gehalte zeigen in der Luteal- und frühen Follikelphase, unabhängig von einer Hormon-Applikation oder Gesamt-Uterus/Uterus-Schleimhaut niedrige, in der späten Follikelphase deutlich höhere mRNA-Gehalte. Die gemessenen Konzentrationen der Plazenta sind mit Werten von  $0,239 \times 10^{-6}$  bis  $144 \times 10^{-6}$  vergleichsweise niedrig.

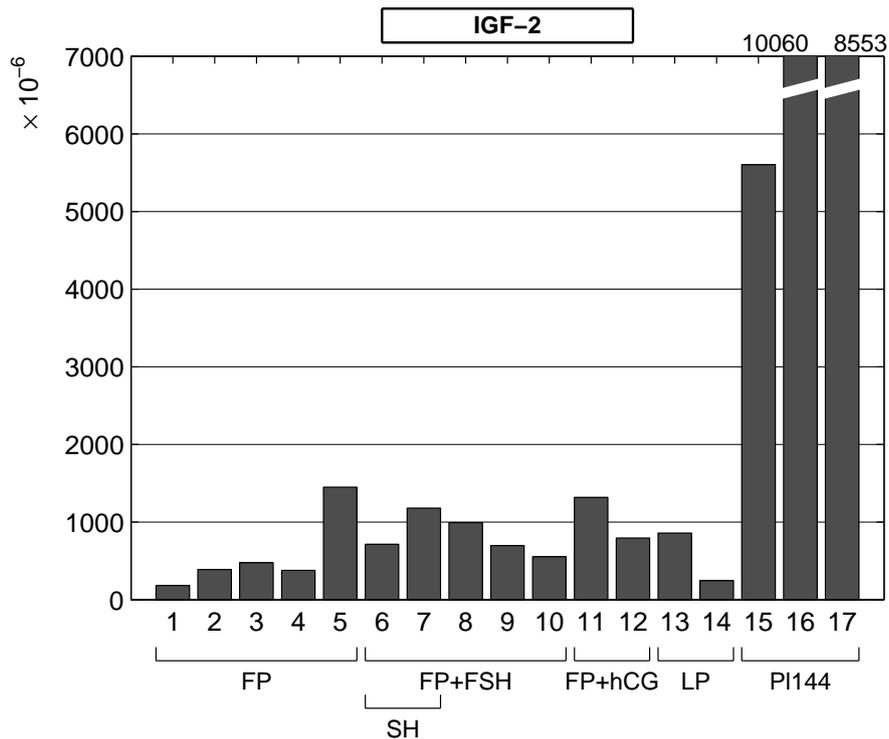


Abbildung 20: **Relative IGF-2 mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

**5.4.1.2 IGF-2** Der absolute Gesamt-mRNA-Gehalt der Proben an IGF-2 lag zwischen 1,53 und 99,64 fg/ $\mu$ l. Die daraus errechneten relativen mRNA-Gehalte bewegen sich in der Größenordnung 182,03 x 10<sup>-6</sup> bis 10059,56 x 10<sup>-6</sup>. Bei der Untersuchung der Amplifikate konnte mit vorliegenden callithrichiden Sequenzen verglichen werden. Während die eigene Sequenz 204 Basenpaare lang war, war die Vergleichssequenz 215 Basenpaare lang, die überlappenden 143 bp waren zu 99,3 % homolog (ein Nukleotid abweichend) [62]. Im Vergleich zur humanen Sequenz waren 6 Nukleotide differierend, was in einer anderen Aminosäure resultierte. Insofern lag die Sequenz-Homologie bei 97,0 % respektive 98,5 %. Genauere Informationen zu den Homologien der zum Vergleich herangezogenen Sequenzen befinden sich in Anhang A.

Die gemessenen mRNA-Gehalte an IGF-1 und IGF-2 sind im Vergleich zu den anderen untersuchten Faktoren sehr hoch. Während die IGF-2-Werte in den Plazentaprobe deutlich erhöht sind, zeigt sich im Uterus eine homogen niedrige Expression, welche in reinen Schleimhautproben und in den anderen Proben hormonbehandelter Tieren tendentiell erhöht waren. Die Probe der späten Lutealphase zeigte einen niedrigen Gehalt an IGF-2-mRNA.

## 5.4.2 Rezeptoren: IGF1-R

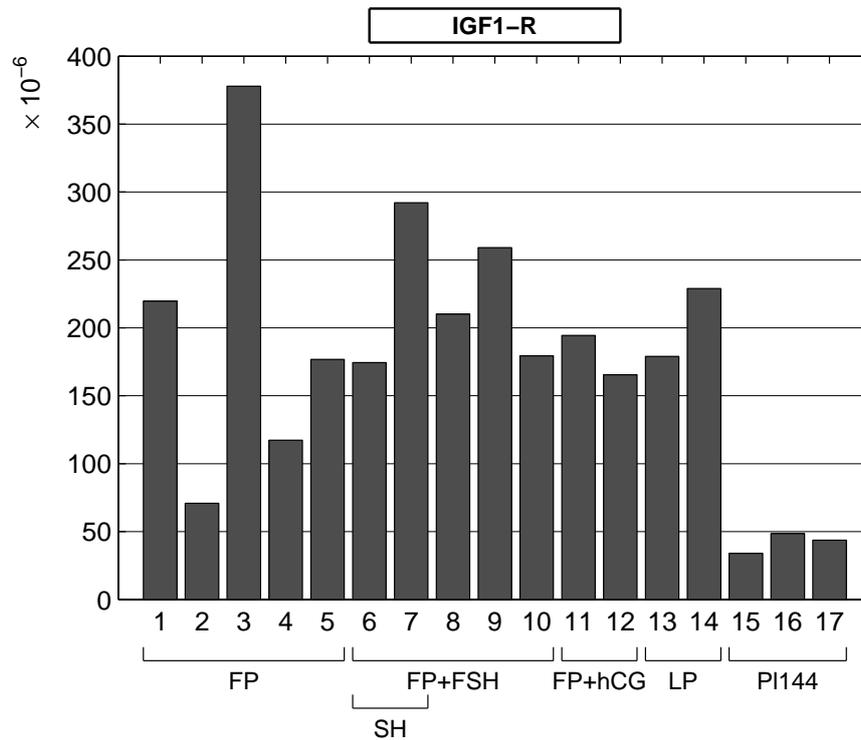


Abbildung 21: **Relative IGF1-R mRNA-Expression** in Organproben von *Callithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnten absolute mRNA-Gehalte von 0,058 bis 3,76 fg/ $\mu$ l festgestellt werden, welche nach der Normalisierung als relative Werte von 34,04  $\times 10^{-6}$  bis 377,82  $\times 10^{-6}$  in Abbildung 21 zusammengefasst wurden. Das für diese Arbeit sequenzierte Amplifikat war zu 100 % identisch mit einer bereits publizierten *Callithrix jacchus*-Sequenz, während im Vergleich zur humanen Sequenz 18 der 314 auswertbaren Basenpaare und damit 3 von 84 Aminosäuren differierten (94,2 % respektive 96,4 % Homologie), siehe Anhang A.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, konnte zyklus- und hormonunabhängig eine recht homogene Expression des IGF1-Rezeptors im Uterus festgestellt werden. Nur in der Plazenta waren die gemessenen Werte deutlich niedriger.

### 5.4.3 Bindungs-Proteine: IGFBP-1 und IGFBP-2

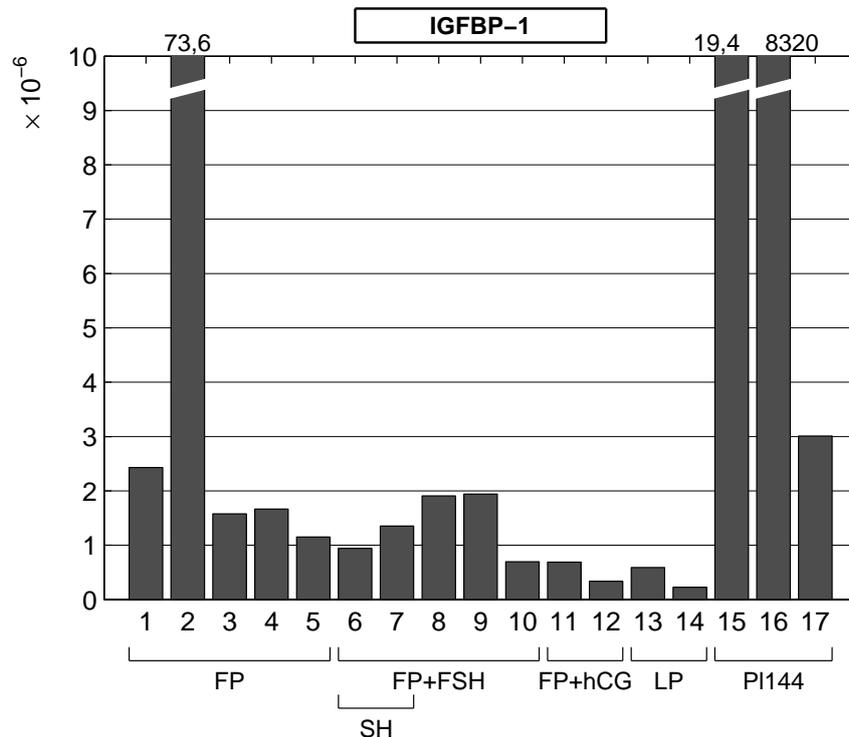


Abbildung 22: **Relative IGFBP-1 mRNA-Expression** in Organproben von *Calithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

**5.4.3.1 IGFBP-1** Die mit Hilfe der Real-Time-PCR ermittelten absoluten mRNA-Gehalte bewegten sich zwischen 0,00143 und 0,297 fg/ $\mu$ l, während die relativen 0,0228 bis 73,6  $\times 10^{-6}$  betragen. Die Proben C9 und C2 (Säulen 2 und 16) wiesen mit einem absoluten Wert von 0,297 fg/ $\mu$ l respektive 82,4 fg/ $\mu$ l und einem relativen Wert von 73,6  $\times 10^{-6}$  respektive 8320  $\times 10^{-6}$  ungewöhnlich hohe Konzentrationen auf.

Bei der Sequenzierungsreaktion konnte ein Genabschnitt mit 127 Nukleotiden nachgewiesen werden, dessen Homologie zur menschlichen Sequenz mit 18 differierenden Nukleotiden und damit 12 veränderten Aminosäuren 85,83 % respektive 70,73 % betrug. Die 127 Nukleotide entsprachen den Basenpaaren 799-925 der insgesamt 1660 bp langen, humanen Sequenz. Beim Vergleich mit einer zwischenzeitlich publizierten callithrichiden Sequenz kann für die Basenpaare 12-127 eine 100 %ige Homologie bestätigt werden, während die ersten 11 Nukleotide der beiden Affen-Sequenzen differierten, siehe Anhang A.

Die hier gemessenen Werte bewegen sich, verglichen mit denen anderer Faktoren, insgesamt in einem sehr niedrigen Bereich. Die Werte der Plazenta sind jedoch vergleichsweise höher als die der uterinen Proben.

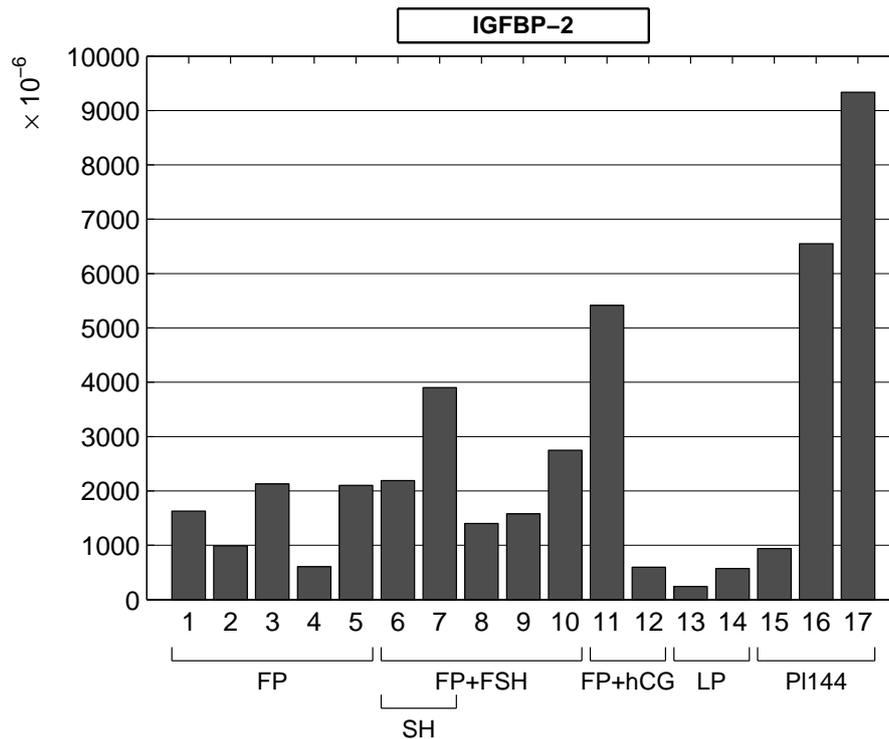


Abbildung 23: **Relative IGFBP-2 mRNA-Expression** in Organproben von *Calithrix jacchus* in Abhängigkeit von Organ, Zyklustag und Hormonbehandlung; arithmetisches Mittel zweier Real-Time-PCRs; zur Spezifikation der Proben siehe Tab. 8

**5.4.3.2 IGFBP-2** Die Spannweite des per Real-Time-PCR ermittelten absoluten mRNA-Gehaltes der Proben lag zwischen 0,84 und 70,24 fg/ $\mu$ l, was nach der Normalisierung über den Housekeeping-Faktor relative Werte von  $241,61 \times 10^{-6}$  bis  $9337,79 \times 10^{-6}$  ergab. Von den 136 nach der Sequenzierungsreaktion auswertbaren Basenpaaren waren 10 Nukleotide abweichend von der humanen Sequenz, was zu drei differierenden Aminosäuren und damit zu einer Sequenzhomologie von 92,7 % respektive 80 % führte. Ein Vergleich mit einer callithrichiden Sequenz ergab 2 abweichende Basenpaare, die auch in zwei differierenden Aminosäuren resultierten, siehe Anhang A.

Während die Expression in der Follikelphase im Uterus und in Uterus-Schleimhaut unabhängig von der durchgeführten Hormonbehandlung recht inhomogen ist, konnte in der Lutealphase eine vergleichsweise niedrige, in der Plazenta eine sehr hohe Expression nachgewiesen werden. Insgesamt war die Expression in den untersuchten Organen verglichen mit den anderen untersuchten Faktoren (z.B.: IGFBP-1, iNOS, etc.) sehr hoch.

Organ Faktor	Uterus				Plazenta	
	FP	FP+FSH (SH)	FP+FSH	FP+hCG	LP	Pl 144
ER- $\alpha$	+	-	- / ~	+	~	--
ER- $\beta$	+	-	+	++	-	-
eNOS	~	~	~ / +	~	-	++
iNOS	~	+	~	~	~ / ++	~
IGF-1	+	~	+	++	~	--
IGF-2	~	~	~	~ / +	~	++
IGF1-R	~ / +	+	+	+	+	-
IGFBP-1	+	~	~	-	-	++
IGFBP-2	~	~	~ / +	~	-	+

Tabelle 9: Übersichtsdarstellung der relativen Transkriptmengen in Organen des Reproduktionstraktes von *Callithrix jacchus*;

++ = deutlich erhöht; + = erhöht; ~ = normal; - = erniedrigt, -- = deutlich erniedrigt;

FP = Follikelphase; FSH = Follikelstimulierendes Hormon; SH = Schleimhaut; hCG = hum. Choriongonadotropin; LP = Lutealphase; Pl 144 = Plazenta am 144 Trächtigkeitstag

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expressionsbestimmung ausgewählter Faktoren im Uterus und in Plazenten von *Callithrix jacchus*, denen eine maßgebliche Beteiligung an der erfolgreichen Reproduktion beim Säugetier zugeschrieben wird [80, 173, 200]. Wie eingangs erwähnt, ist der Weißbüschelaffe ein verbreitetes Modelltier in der reproduktionsbiologischen Forschung. Bisher liegen jedoch nur wenige Studien des Uterus und der Plazenta auf Expressionsebene für die hier untersuchten Faktoren vor. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und die dafür genutzten Methoden sollen im Folgenden kritisch betrachtet werden.

### 6.1 Gewebe und Methodik

Das für die Arbeit genutzte Tiermaterial stammte aus streng kontrollierten Versuchen in der Tierversuchseinheit des DPZ Göttingen. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, wurde der Zyklus der Tiere engmaschig anhand von Blutproben (Progesteron-Assays) kontrolliert. Die Organentnahme wurde jeweils erst durchgeführt, wenn mehrere regelmäßige Zyklen der Tiere beobachtet worden waren, um sicher zu stellen, dass die zum Zyklusstand gemachten Angaben dem tatsächlich vorliegenden hormonellen Status entsprachen. Es wurden nur makroskopisch gesunde und unveränderte Uteri für die weitere Untersuchung verwendet. Von den hier untersuchten Plazenten wurden zwei im Rahmen von geplanten Kaiserschnitten, sowie eine weitere bei einer Geburt per vias naturalis gewonnen, bei allen konnte die Ovulation und damit die Dauer der Trächtigkeit bis auf wenige Tage präzise terminiert werden. Die entnommenen Organe wurden ohne Verzögerung geteilt und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Eine Degeneration der vorhandenen mRNA kann so sicher vermieden werden [57]. Für die Untersuchungen der mRNA-Expression wurden bis auf zwei Ausnahmen jeweils Homogenate von In-toto-Organen genutzt, so dass eine genaue Differenzierung bei unterschiedlicher Genexpression zwischen Epithel, Mukosa und muskulärem Anteil nicht mehr getroffen werden konnte. Vergleichend dazu wurden zwei uterine Schleimhautstanzen untersucht, um Hinweise auf mögliche Unterschiede erhalten zu können. Im Rahmen der Studie wurden von den in flüssigem Stickstoff konservierten Organen annähernd gleich große Proben abgetrennt und verarbeitet. Bedingt durch die relativ geringe Größe der Organe bei *Callithrix jacchus* musste weitgehend auf eine genauere Differenzierung des Gewebes in unterschiedliche Organschichten (Myo- vs. Endometrium) oder Organabschnitte (Fundus vs. Corpus) verzichtet werden. Untersuchungen am Uterus der Frau haben jedoch gezeigt, dass es zwar innerhalb des Organs eine variabel ausgeprägte Genexpressionen unterschiedlicher Faktoren gab, jene Expressionsvarianten jedoch keine Rückschlüsse auf die Lokalisation der Proben-

entnahme zuliessen [178]. Die Schwierigkeit der Untersuchung von Organen in toto liegt darin, dass einerseits die potentielle Genexpression des untersuchten Faktors in allen vorhandenen Geweben bedacht werden muss und andererseits der tatsächliche Anteil der einzelnen Organschichten in der Regel nicht konstant ist. Dies macht eine Interpretation der gemessenen Werte deutlich komplexer und fehleranfälliger als bei der Untersuchung isolierter Organschichten. Zur Verifizierung der festgestellten mRNA-Expressionen und, sofern möglich, zur Lokalisierung von Expressionsmaxima in bestimmten Gewebsschichten, wurden kurz nach der Organgewinnung zu ausgewählten Faktoren immunhistologische Färbungen einiger Organschnitte angefertigt, welche freundlicherweise vom Lehrstuhl von Frau Prof. A. Einspanier, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, zur Verfügung gestellt wurden. Im Vorfeld der Organentnahme wurden einige Tiere mit den Hormonen FSH und hCG behandelt. Dies hat zur Folge, dass ein etwaiger Einfluss der genannten Hormone auf die mRNA-Expression der dargestellten Faktoren im Uterus untersucht werden konnte.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen mRNA-Expressionen wurden mittels Real-Time-PCR gemessen. Dies machte eine Quantifizierung der mRNA und damit den direkten Vergleich verschiedener Proben innerhalb desselben Real-Time-PCR-Laufs möglich. Die gemessenen Konzentrationen wurden in fg mRNA/ $\mu$ l total RNA gemessen, über mehrere Housekeeping-Gene normalisiert und jeweils in Grafiken dargestellt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte konnte zeigen, dass es sich um die gesuchten Transkripte handelte. Sie zeigten jeweils einen hohen Grad der Homologie mit der equivalenten humanen Sequenz und auch mit den zwischenzeitlich publizierten callithrichiden Sequenzen. Sofern bisher noch keine callithrichide Sequenz vorlag, wurden diese in die öffentliche Datenbank des NCBI eingespeist.

Die aus ethischen Gründen geringe Probenzahl sowie das Bestreben, mit den 17 verfügbaren Proben möglichst viele unterschiedliche Zykluszeitpunkte, Hormoneinflüsse und Organe des Reproduktionstraktes für eine erste Übersicht abzudecken, machten eine Einteilung der Proben in Gruppen und damit eine statistisch valide Auswertung der Proben unmöglich. Somit muss die vorliegende Studie als initiale Fallstudie über die Möglichkeit des Nachweises bestimmter Faktoren bei *Callithrix jacchus* angesehen werden.

### **6.1.1 Zur Normalisierung: Vorteile und Tücken**

Bei der Normalisierung mit Hilfe von Housekeeping-Genen muss bedacht werden, dass auch deren Expression nicht immer so konstant ist, wie es für eine möglichst valide Berechnung von Nöten wäre. Im Idealfall spiegeln die in Abbildung 10 für 18 S-rRNA dargestellten absoluten Expressionsunterschiede lediglich die im Rahmen der Probenbehandlung aufgetretenen

Variationen wieder. Natürlicherweise auftretende Schwankungen im Gesamt-mRNA-Gehalt sollen durch den Einsatz einer immer gleich großen Menge von RNA für die Reverse Transkription (siehe auch 4.4.5) ausgeglichen werden.

Einige Autoren empfehlen daher umfangreiche Voruntersuchungen zur Festlegung der bestmöglichen Housekeeping-Faktoren für das zu studierende Gewebe [193]. Für die Untersuchung von mRNA-Variationen regen jedoch auch sie das Benutzen von 28 S-rRNA und/oder 18 S-rRNA an, da die Schwankungen in deren mRNA-Expression im Vergleich dazu geringer ausfallen und keinen großen Einfluss auf den Gesamt-RNA-Gehalt einer Zelle haben [193]. Ein einzelndes Housekeeping-Gen sei in der Regel unzureichend, um eine valide Normalisierung zu garantieren, daher wird vorgeschlagen, mindestens zwei Housekeeping-Gene zur Normalisierung zu nutzen [193, 199]. Zudem wurde die Expressionsanalyse nicht nur mehr mit der herkömmlichen Endpunkt-PCR, sondern mit Hilfe der Real-Time-PCR angefertigt. Hier werden zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben Verdünnungsreihen mit bekannter DNA-Menge eingesetzt, was eine genaue Quantifizierung der Amplifikate und eine Analyse der Effizienz der Reaktion (Steigung der Standardkurve) ermöglicht, sowie die Validität der Ergebnisse unterstreicht [213].

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Normalisierung wie die hier vorgenommene alle technischen Fehler komplett ausschließt oder andere Faktoren für eine Normalisierung besser geeignet sein könnten. Wie die Ergebnisse anderer Arbeiten müssen auch die Erkenntnisse der hier vorliegenden Arbeit kritisch betrachtet werden und dem Vergleich mit zukünftigen Studien standzuhalten versuchen. Besonders die limitierte Probenzahl zusammen mit der geringen Organmenge stellt eine zusätzliche Herausforderung dar.

## 6.2 Östrogen-Rezeptoren

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die beiden Östrogen-Rezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  untersucht und die gewonnen Sequenzen auch mit denen des Menschen verglichen. Der Nachweis dieser Faktoren beim Weißbüschelaffen ist zuvor schon anderen Autoren gelungen [47, 173]. Das Expressionsniveau von ER- $\beta$  lag in der vorliegenden Studie im Zyklusverlauf des Uterus generell deutlich unter den gemessenen Werten von ER- $\alpha$ , während in der Plazenta des Gegenteil der Fall war. Jedoch waren die hier gemessenen die hier gemessenen Maxima an ER- $\beta$ -mRNA stets deutlich unter den im Uterus gemessenen ER- $\alpha$ -Konzentrationen. Diese generellen Begebenheiten wurden auch für den Menschen in vielen Studien nachgewiesen [117, 176]. Der im Rahmen der Sequenzierung der PCR-Produkte angestellte Vergleich mit bereits publizierten *Callithrix jacchus*-Sequenzen ergab einen hohen Homologie-Grad von 98,3% für ER- $\alpha$  und 100% für ER- $\beta$ .

### 6.2.1 Östrogen-Rezeptor-alpha - ER- $\alpha$

Im Uterus des Weißbüschelaffen konnte in dieser Arbeit folgendes Expressionsprofil nachgewiesen werden: bei den FSH-stimulierten reinen Schleimhautproben und den In-toto-Organen der frühen Follikelphase war tendenziell weniger rezeptorkodierende mRNA nachweisbar als bei den restlichen Organen. In der späten Lutealphase war die Expression ebenfalls verringert. Ein Einfluss durch eine hCG-Behandlung auf den Uterus kann nicht sicher nachgewiesen werden. Die Plazentaproben enthielten im Vergleich zu den restlichen Proben nur minimale mRNA-Konzentrationen.

Der Östrogen-Rezeptor- $\alpha$  gehört zu den wenigen in dieser Arbeit untersuchten Faktoren, zu dessen Expression bereits Studien beim Weißbüschelaffen vorliegen. Einspanier et al. stellten im Jahre 2009 ihre Ergebnisse zur mRNA-Expression beim Weißbüschelaffen vor. Schwerpunkt der Studie war die Expression in der späten Lutealphase im konzeptiven bzw. nicht konzeptiven Uterus und in der Schwangerschaft [47]. Hier war die mRNA-Konzentration für ER- $\alpha$  in der späten Lutealphase konstant hoch, unabhängig davon, ob eine erfolgreiche Befruchtung des Weibchens stattgefunden hatte. Die Proteinkonzentration war im konzeptiven Zyklus jedoch deutlich ausgeprägter. In diesen immunhistochemischen Kontrollen konnten die ER- $\alpha$  in den Zellkernen von Epithel, Stroma und Drüsen lokalisiert werden [46, 47]. Die im Jahre 2009 von Einspanier et al. in Kooperation veröffentlichten immunhistologischen Organfärbungen sind auch Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit. Die von der Arbeitsgruppe festgestellten Ergebnisse einer ausgeprägten ER- $\alpha$ -mRNA-Expression in der Lutealphase widersprechen den hier präsentierten eigenen Ergebnissen auf mRNA-Ebene insofern nicht, als dass auch hier eine deutliche mRNA-Expression in der Lutealphase nachgewiesen wurde. In dieser Studie wurde neben dem beschriebenen Vergleich gravider vs. nicht-gravider Uteri in der späten Lutealphase kein zusätzlicher Expressionsvergleich mit anderen Zyklusphasen vorgenommen, so dass kein abschließender Studienvergleich zur gemessenen mRNA-Konzentration getroffen werden kann.

Narkar et al. konnten im Jahre 2006 in immunhistochemischen Studien die Lokalisation der Östrogen- $\alpha$ -Rezeptoren im Normalzyklus des Marmoset genauer beschreiben: Sie konnten den Rezeptor in den uterinen Drüsen vor allem in der frühen Follikelphase und der späten Lutealphase nachweisen, während die Proteindichte in der späten Follikel- und der frühen Lutealphase abnahm. Im ebenfalls untersuchten Interstitium war eine genau gegenläufige Tendenz (Maximum in später Follikelphase und früher Lutealphase) zu verzeichnen, während im uterinen Epithel ein Maximum in der späten Lutealphase festzustellen war [133, 134].

Silvestri und Fraser hingegen beschreiben in ihrer Veröffentlichung zum Proteinnachweis von ER- $\alpha$  beim Weißbüschelaffen im Stroma ein Maximum des Rezeptors vor allem in der

Follikelphase, während das in der Follikelphase entstandene Plateau in den uterinen Drüsen bis in die frühe Lutealphase nachweisbar war [173]. Diese Erkenntnisse sind vergleichbar mit denen bei Makaken (Brenner et al., 1994 wie zitiert in [173]) und dem Menschen [69, 107, 111, 126, 178]. In dezidualisierten Zellen war immunhistologisch kein ER- $\alpha$  nachweisbar [173], ebensowenig wie in den Endothelzellen der Blutgefäße [111, 129].

Zu den besonders bezüglich der Drüsen differierenden Ergebnissen der Proteinnachweise von Narkar et al. und Silvestri und Fraser gesellen sich die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit, in der auf mRNA-Ebene keine einheitliche Zyklusdynamik im Uterus nachgewiesen wurde. Die in den FSH-behandelten Tieren der frühen Follikelphase (Säulen 6-9) gemessenen niedrigen Expressionswerte lassen sich nicht schlüssig mit der Hormonapplikation erklären. Das Hormon FSH agiert normalerweise in einem Regelkreis der gegenseitigen Kontrolle mit Östradiol: FSH stimuliert das Wachstum der Follikel im Ovar, welche Östradiol ausschütten und damit ihrerseits am Hypothalamus die Ausschüttung von GnRH und damit die Synthese von FSH an der Adenohypophyse inhibieren. Eine FSH-Applikation führt also in der Folge zu einer erhöhten Östrogenkonzentration. Brys et al. z.B. wiesen im Jahre 2009 einen positiven Effekt einer 14-tägigen Östriolbehandlung auf die ER- $\alpha$ -Expression in Endometrium und Vagina von postmenopausalen Frauen nach. Die im Myometrium gemessenen Expressionsunterschiede von ER- $\alpha$  waren jedoch nicht signifikant [20]. Die in Folge einer kurzfristigen FSH-Gabe langfristig erhöhten Östrogen-Konzentrationen werden vermutlich bei den in der vorliegenden Arbeit gemachten Untersuchungen zeitlich nicht erfasst. Ob eine deutlich erhöhte Östrogenkonzentration die Genexpression des dazugehörigen Rezeptors im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus beeinflusst, sei dahingestellt. Kurzfristige hCG-Effekte auf die ER- $\alpha$ -Expression sind in dieser Studie nicht ersichtlich. Da sich die gemessenen Werte in den natürlich eingetretenen Lutealphasen sich ebenfalls nicht maßgeblich von den anderen Zyklusphasen unterscheiden, war dies auch nicht zwingend zu erwarten.

In der Plazenta wurden vergleichsweise sehr niedrige mRNA-Konzentrationen für den Östrogen-Rezeptor- $\alpha$  gemessen. Hier liegen bisher noch keine Studien zur Genexpression beim *Callithrix jacchus* vor. Ähnlich wie bei den weiteren untersuchten Faktoren lagen zudem keine Studien vor, die die mRNA-Expression des Faktors in Uterus und Plazenta vergleichend untersucht hätten. Dieser Bericht ist der erste Nachweis dieses Rezeptors in der Plazenta des *Callithrix jacchus*.

Bukovsky et al. fertigten im Jahre 2003 erstmalig Western Blots zur Untersuchung des ER- $\alpha$  in menschlichen Plazenten an. In normal entwickelten Schwangerschaften war der Rezeptor in Zytotrophoblasten und den Perizyten der in den Zotten gelegenen Blutgefäße sowie den Sinusoiden nachweisbar [23, 164, 165]. Fujimoto et al. konnten bei ihren Studien zur ER- $\alpha$ -Konzentration in der Plazenta der Frau während des Schwangerschaftsverlaufes

nach einer initialen Zunahme im ersten und zweiten Trimester eine deutliche Abnahme im letzten Trimester nachweisen [60]. Die tatsächlich gemessenen Konzentrationen lassen sich aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden nicht direkt vergleichen. Auch wenn mit den hier vorgestellten Daten keine genaue Aussage über die Lokalisation des ER- $\alpha$  in der Plazenta des Weißbüschelaffen getroffen werden kann, so kann doch festgestellt werden, dass, ähnlich wie bei der Frau, ER- $\alpha$  auch in Plazenten des Weißbüschelaffen nachgewiesen werden kann.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die mRNA-Expression von ER- $\alpha$  beim *Callithrix jacchus* bestätigen einmal mehr die große Relevanz dieses Faktors vor allem im Uterus vieler Spezies. Die Daten lassen vermuten, dass sich der Weißbüschelaffe jedoch im Detail von der Zyklusdynamik der Frau unterscheidet. Zukünftige Studien werden die speziesspezifischen Unterschiede zwischen Frau und Affe, auch und besonders auf der translatierten Proteinebene weiter untersuchen, und so abschließend klären können, ob der Weißbüschelaffe in diesem Aspekt als Modelltier in der reproduktionsbiologischen Forschung geeignet erscheint. Der hohe Homologiegrad der untersuchten callithrichiden Gensequenz zu der der Frau (> 97 %) unterstreicht den Verwandtschaftsgrad zum Menschen.

### 6.2.2 Östrogen-Rezeptor-beta - ER- $\beta$

Neben der Messung des Östrogen-Rezeptors- $\alpha$  wurde in dieser Arbeit auch die Expression des Faktors ER- $\beta$  erfasst.

Rey et al. wiesen 1998 ER- $\beta$  im Uterus des Menschen nach, stellten jedoch keine Zyklusveränderungen fest [155]. Matsuzaki et al. hingegen konnten ein Jahr danach nicht nur berichten, dass ER- $\beta$  im ganzen menschlichen Endometrium immunhistochemisch nachweisbar ist, sondern auch einer Zyklusdynamik unterliegt, die jedoch weit geringer ausgeprägt sei, als die des ER- $\alpha$  [126]. Silvestri und Fraser konnten einige Jahre später diese Erkenntnisse für den Weißbüschelaffen bestätigen [173]. Bei ihren Untersuchungen waren die Zyklusveränderungen in den Drüsen nur geringgradig ausgeprägt, jedoch war ER- $\beta$  v.a. in den Endothelzellen der interstitiell gelegenen Blutgefäße und im perivaskulären Stroma nachweisbar [173].

Bei den hier vorgestellten Real-Time-PCR Untersuchungen konnte in der Uterusschleimhaut der Follikelphase ein deutlich niedrigerer Gehalt an ER- $\beta$  festgestellt werden, als in anderen Zyklusphasen. Die von Silvestri und Fraser für *Callithrix jacchus* im Gefäßendothel und Stroma des Endometriums festgestellte ER- $\beta$ -Expression konnte durch die hier festgestellte niedrige Konzentration von ER- $\beta$ -mRNA in den reinen Schleimhaut-Proben der frühen Follikelphase bestätigt werden. In den immunhistochemischen Studien von

Lecce et al. wurden für den Menschen für die Follikelphase in den einzelnen Endometrium-Kompartimenten folgende Erkenntnisse gewonnen: Im Epithel war der ER- $\beta$ -Proteingehalt in der frühen Follikelphase zwar größer als in der Lutealphase, jedoch deutlich geringer als in der späten Follikelphase [107]. Auch im Drüsenepithel des Endometriums stellten Lecce et al. erst in der periovulatorischen Phase einen Anstieg der ER- $\beta$ -Proteine fest, während sie im Interstitium sogar erst gegen Ende der Lutealphase eine vermehrte ER- $\beta$ -Färbung nachwies [107]. Ein geringer Gehalt an ER- $\beta$  in der frühen bis mittleren Follikelphase in der vorliegenden Arbeit bestätigt die in den Studien von Lecce et al. an menschlichem und Silvestri und Fraser an *Callithrix jacchus* gemachten Erkenntnisse.

Die bei den Organen der Follikelphase vergleichsweise höheren Mengen an mRNA könnten ihre Ursache in der Tatsache haben, dass ER- $\beta$  bekanntermaßen auch im Myometrium und dessen Blutgefäßen exprimiert wird [126, 144, 173]. Wie bereits erwähnt berichten Silvestri und Fraser für den Faktor ER- $\beta$  beim *Callithrix jacchus* von einer insgesamt gering ausgeprägten Zyklusdynamik, die bei der Untersuchung von Organen in toto auf Grund des eingangs erwähnten, variablen Anteils der einzelnen Gewebeschichten nur schwer nachzuvollziehen ist [173]. Die in der mittleren bis späten Follikelphase unter hCG-Einfluss tendenziell leicht erhöhten ER- $\beta$ -mRNA Gehalte lassen sich in einen Kontext mit der Studie von Lecce et al. am Uterus der Frau stellen. Sie konnten auf der Protein-Ebene um den Ovulationszeitpunkt sowohl im Epithel, als auch in Drüsen eine vermehrte ER- $\beta$ -Färbung nachweisen [107]. Auch Silvestri und Fraser beschreiben für den Weißbüschelaffen im Interstitium aller Kompartimente eine Zunahme der ER- $\beta$ -Expression gegen Ende der proliferativen Follikelphase [173].

In der frühen Lutealphase der untersuchten Uteri in toto konnte wiederum eine deutlich verminderte ER- $\beta$ -Expression nachgewiesen werden, die den Expressionswerten der Schleimhautproben ähnlich waren. Auch hier haben die Studien von Lecce et al. an menschlichem Gewebe ein ähnliches Ergebnis: Die immunhistochemische Färbung von ER- $\beta$ -Proteinen war im Epithel in der Lutealphase deutlich geringer als in der Follikelphase, während die Gehalte in den Drüsen nach einem Peak um den Ovulationszeitpunkt ebenfalls wieder fielen [107]. Im Interstitium und den Gefäßwänden konnte sie erst gegen Ende der Lutealphase einen geringgradigen Anstieg der insgesamt schwachen Proteinfärbung nachweisen [107]. Der Beitrag des Myometriums an der gemessenen mRNA-Konzentration ist vermutlich geringer, als in den anderen Zyklusphasen, da die Werte ähnlich niedrig wie die der reinen Schleimhaut-Proben waren. Zur Verifikation dieser Vermutung sind dezidierte Untersuchungen der einzelnen Organschichten zu variablen Zykluszeitpunkten notwendig. Auch Matsuzaki et al. berichten von einer Abnahme der ER- $\beta$ -mRNA in der Lutealphase des Menschen [126].

Die im Vergleich zu ER- $\alpha$  insgesamt etwa um den Faktor 10 verminderten Expressionswerte bestätigen die Studien von Matsuzaki, Rey und Lecce am Menschen [107, 126, 155]. Die recht niedrigen Werte und die Tatsache, dass es auch im Myometrium eine nachweisbare ER- $\beta$ -mRNA-Expression gibt [126, 144], stellen eine mögliche Ursache einer Verzerrung der gemessenen Werte dar. Bei der Untersuchung von In-toto-Organen kann nicht von einem konstanten Verhältnis von Myo- zu Endometrium ausgegangen werden, was die Interpretation der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Wu et al. beschreiben, dass der tatsächliche Rezeptor, also das ER- $\beta$ -Protein im Myometrium der Frau zum Zeitpunkt einer Geburt kaum nachweisbar sei, aber damit dennoch deutlich stärker vorhanden sei, als die von ihr gemessenen Werte in nicht schwangeren Uteri [216]. Das Minimum an ER- $\beta$ -Proteinen sei etwa in der Mitte des Zyklus der Frau gelegen, bei einer normalzyklischen Frau im Myometrium sei ER- $\alpha$  dominierend [216]. Brenner und Slayden stellten ER- $\beta$  zyklusunabhängig in den glatten Muskelzellen und im Endothel sowie angrenzenden Zellen der Blutgefäße beim Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) dar [19]. Trotz der extrem niedrigen mRNA-Mengen im Myometrium kann ein Einfluss der in der Muskelschicht vorhandenen ER- $\beta$ -mRNA auf die gemessene Gesamtkonzentration in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden.

Silvestri und Fraser schlussfolgern in ihren Studien, dass die Verteilung der Östrogenrezeptoren beim *Callithrix jacchus* mehrheitlich dem Verteilungsmuster beim Menschen und anderen Primaten entspricht [173], zumindest beim Menschen korreliert die jeweils gemessene mRNA-Expression mit der Konzentration der translatierten Proteine [107]. Sie stellten außerdem fest, dass ER- $\beta$ , unabhängig vom Zyklusstand, der vorrangige Steroidrezeptor im Gefäßendothel und des perivaskulären Stromas im Uterus bei Weißbüschelaffen ist [173]. Diese Besonderheit wurde in anderen Studien auch für den Menschen [36, 107] und bei Makaken [19] nachgewiesen. So kann mit dieser Arbeit die Schlussfolgerung Silvestri's bestätigt werden, dass die ER- $\beta$ -mRNA-Expression im Endometrium im Gesamtbild der des Menschen gleicht. Die geringe Probenzahl lässt jedoch keine belastbare Aussage zu den zyklischen Veränderungen der ER- $\beta$ -Expression zu. Zur Verifizierung dieser Feststellung wären aufbauend auf die hier ermittelten Ergebnisse Studien mit einem größeren Probenumfang oder einer spezielleren Probenauswahl (z.B. beschränkt auf das Endometrium) sinnvoll.

Die in der Plazenta gemessenen Konzentrationen sind ähnlich niedrig wie die der Uteri. Bei der Interpretation des augenscheinlich ausgeprägten Expressionsunterschiedes zwischen den beiden untersuchten Plazenten muss der insgesamt niedrigen Gesamtexpression Rechnung getragen werden. Schiessl et al. stellten im Jahre 2005 per Immunhistologie an Parafinschnitten von menschlichen Plazenten fest, dass ER- $\beta$  sowohl im Synzytiotrophoblasten, als auch im extravillösen Trophoblasten exprimiert wird [164, 165]. Ihre vergleichenden Untersuchungen an Plazenten von normalen, präeklampsischen und wachstumsverminderten

Schwangerschaften konnten außerdem zeigen, dass ER- $\beta$  in ähnlich großen, jedoch immer geringeren Konzentration als ER- $\alpha$  vorlag und in krankhaft veränderten Plazenten in anderer Konzentration vorlagen. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  in normalen Plazenten des dritten Trimesters nachgewiesen werden. Auch hier waren die Konzentrationen der beiden Rezeptoren tendenziell gleich stark/schwach ausgeprägt, wobei jedoch im Gegensatz zum Menschen ER- $\beta$  eine geringgradig höhere Konzentration als ER- $\alpha$  aufwies.

Abschließend lässt sich feststellen, dass ER- $\beta$  sowohl im Uterus als auch in der Plazenta von *Callithrix jacchus* erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wobei die Expressionmuster im Uterus denen der Frau sehr ähnlich, die der Plazenta eher gegensätzlich ausgeprägt waren. Inwieweit die hier ersichtliche Diskrepanz zu den menschlichen plazentären Gegebenheiten valide ist, bzw. einen tatsächlichen Einfluss auf die in vivo ablaufenden Prozesse hat, kann nur durch weitergehende Studien geklärt werden.

### 6.3 NO-Synthasen

Bisher wurden noch keine Studien zur Expression von NO-Synthasen im Uterus von Callithrichiden veröffentlicht, so dass vorrangig die Erkenntnisse beim Menschen als Grundlage für eine vergleichende Diskussion der Genexpression herangezogen werden müssen.

#### 6.3.1 eNOS (NOS3)

Bei der hier vorgestellten Studie konnte eine anfängliche Zunahme mit nachfolgendem Rückgang der mRNA-Expression für eNOS im Verlauf der Follikelphase nachgewiesen werden, welche durch kurzfristige Hormongaben in der Gesamttendenz nicht maßgeblich beeinflusst wurden, jedoch waren nach Hormongabe tendenziell mehr Amplifikate in den Proben vorhanden. Eine veränderte Amplifikat-Konzentration durch eine Probenbeschränkung auf das Endometrium ist dabei nicht ersichtlich. Die mRNA-Konzentrationen in der Lutealphase erscheinen niedrig. In Studien zur Expression von NO-Synthasen im menschlichen Endometrium konnten sowohl e- als auch iNOS nachgewiesen werden [103, 187, 191, 192, 201–203], ohne jedoch in ihren Aussagen stimmig zu sein: Telfer et al. und Tschugguel et al. postulierten eine zyklusunabhängige eNOS-Expression vorrangig in endometrialem Drüsenepithel, Stroma und Blutgefäßen. Telfer et al. wiesen zwar variierende Expressionen nach, konnten jedoch keinen Zusammenhang mit der Lokalisation der Probenentnahme oder dem Zykluszeitpunkt herstellen, während Tschugguel et al. zwar eine gleichbleibende Intensität der gefärbten Gefäße beschrieb, dabei aber eine Zunahme der Anzahl der Blutgefäße zur spätsekretorischen Phase hin feststellte [191, 192, 202]. Tseng et al. stellte anhand der NADPH-

Diaphorase-Aktivität unspezifisch NO-Synthasen im Drüsen-Epithel und Gefäßen in der späten sekretorischen Phase des Zyklus fest. Im Weiteren konnte sie mRNA für die eNOS in allen Epithelen, vor allem aber im uterinen Drüsenepithel der Lutealphase und der Decidua nachweisen [203]. Die dort nachgewiesene vermehrte Expression in der Lutealphase steht im Gegensatz zu den in der vorliegenden Studie gemessenen Werten. Andere Autoren weisen jedoch zusätzlich eine genau gegenläufige Zyklusdynamik im Myometrium mit einem Maximum in der proliferativen Phase nach [103]. Die meisten der Studien konnten eNOS in den Drüsen, dem Epithel und in den Gefäßen des Endometriums, sowie eine verstärkte Ausprägung der NOS-Expression in der Lutealphase nachweisen, was auf eine Regulierung der Expression im Endometrium durch Progesteron hinweisen könnte.

Die in diesen Studien festgestellten Gegebenheiten bei der Frau lassen sich auf den ersten Blick nicht in einen überzeugenden Zusammenhang mit den Real-Time-PCR-Ergebnissen der hier vorgestellten Studie bringen. Weder ist durch die anderen Autoren zunächst eine leichte Zunahme noch ein anschließender Rückgang der Genexpression in der proliferativen Phase, noch eine geringere eNOS-Expression in der Lutealphase beschrieben worden. Die von Khorram et al. vorgestellte Studie weist mit ihren zusätzlichen Ergebnissen zur Zyklusdynamik der eNOS-Expression im Myometrium auf einen besonderen Aspekt hin: Hier wurde festgestellt, dass die myometriale eNOS-Expression im genauen Gegensatz zur Expression des Endometriums steht [103]. Für die hier vorgestellte Arbeit wurden mit zwei Ausnahmen mRNA-Extraktionen aus Homogenaten von Organen in toto zur Real-Time-PCR genutzt. Das dabei potentiell nicht konstante Verhältnis von Endo- zu Myometrium kann auch bei einer den menschlichen Verhältnissen ähnlichen eNOS-Genexpression zu deutlichen Schwankungen der im Gewebshomogenat gemessenen mRNA-Konzentration führen. Selbstverständlich sollte auch eine dem Weißbüschelaffen eigene, nicht mit dem Menschen vergleichbare Zyklusdynamik in Betracht gezogen werden.

Wie aus den histologischen Schnitten ersichtlich, ist das eNOS-Protein im nicht-graviden Marmoset-Uterus (12 Tage post ov.) nur geringgradig in den Gefäßendothelien nachweisbar, während sich im graviden Uterus zusätzlich einige Zellen im Interstitium positiv anfärben. Insofern bestätigen die immunhistologischen Bilder wie erwartet die Anwesenheit des Proteins in den Blutgefäßen, wie auch bei den erwähnten Studien am menschlichen Uterus festgestellt wurde [103, 187, 192, 202]. Eine offensichtlich *Callithrix jacchus*-spezifische Differenz im eNOS-Proteinmuster ist die Abwesenheit desselben im Drüsenepithel des Uterus, indem es bei der Frau in den Studien von mehreren Autoren nachweisbar war [103, 187, 202]. Die Färbung des Stromas jedoch deckt sich mit den Ergebnissen von Khorram et al., Telfer et al. und Tschugguel et al. [103, 191, 192, 202]. Die hier vorgestellten Bilder differenzieren lediglich zwischen einem sehr früh graviden und einem nicht konzeptiven Uterus in der späten Lutealphase. Für einen genaueren Vergleich des callithrichiden

Proteinmusters mit den menschlichen Gegebenheiten müssten zusätzliche Organschnitte zu weiteren Graviditäts-Zeitpunkten angefertigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten in den Plazentaprobe im Vergleich zu den Uterusproben insgesamt signifikant erhöhte relative Konzentrationen an eNOS-mRNA gemessen werden. Conrad et al. wiesen eNOS in der menschlichen Plazenta nach, aufbauend darauf konnten Ariel et al. den Faktor in allen drei Trimestern der Schwangerschaft nachweisen, wobei die immunhistochemische Anfärbung in ihrer Studie im dritten Trimester vergleichsweise geringer und diffuser als in den vorangegangenen Trimestern war [6, 34]. Sie stellten die These auf, dass die Freisetzung von NO eine Rolle bei der Invasion des Trophoblasten in das maternale Gewebe haben könnte, zumal sie in der reifen Plazenta nur im fetalen Teil eNOS nachweisen konnten [6]. Auch andere Studien konnten eNOS in der reifen Plazenta nachweisen, z.B. im Western Blot [3], immunhistochemisch [194] und per Enzym-Aktivitätsassay [152]. Auch diese Studien bestätigten eine Abnahme der eNOS Konzentration im Schwangerschaftsverlauf. Rossmanith et al. beschreiben im Kontrast dazu eine Zunahme an eNOS in der Plazenta und liegen damit wiederum im Konsens mit Conrad et al. und Buttery et al. [25, 34, 158]. Die von Al-Hijji et al. gemessene NOS-Aktivität in der Plazenta war deutlich höher, als die im angrenzenden Myometrium (etwa 6-9 fach), die totale Aktivität (e- und iNOS) in beiden Geweben jeweils 3-5 fach stärker als die Ca-unabhängige NOS-Aktivität (iNOS) [3]. Anhand dieser Studie kann also von einer eNOS-Dominanz in beiden Geweben im letzten Schwangerschafts-Trimester ausgegangen werden. Keine der Studien stellte einen direkten Vergleich der eNOS-Expression in Plazenta und Uterus an.

Aus den vielen vorliegenden Studien kann für die Frau kein einheitliches Expressionsprofil festgestellt werden, so dass keine eindeutige Aussage über die Ähnlichkeit der in dieser Arbeit festgestellten Expressionsdynamik mit der der Frau getroffen werden kann. Beim Weißbüschelaffen konnte erfolgreich für die epithelialen NO-Synthase kodierende mRNA in Plazenta und Uterus nachgewiesen und sequenziert werden. Während in der Follikelphase die mRNA-Konzentrationen einer gewissen Dynamik unterlagen, waren in der sekretorischen Phase etwas weniger, in der Plazenta jedoch stark erhöhte Amplifikatmengen für diesen Faktor messbar.

### 6.3.2 iNOS (NOS2)

Bei der hier vorgestellten Arbeit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass auch der Weißbüschelaffe mRNA für iNO-Synthase im Uterus exprimiert. Eine valide zyklusabhängige Konzentrationsveränderung kann hier nicht beschrieben werden. Die gemessenen, insgesamt inhomogenen Expressionswerte der Proben lagen durchweg nahe der Nachweisgrenze. Bei den Messungen wurden zudem vorrangig Teile kompletter Organe verwendet. Even-

tuell wiederkehrende Muster der mRNA-Konzentrationen werden daher vermutlich durch eine potentiell hohe Fehlerquote durch den Aufbau des Organstückes verzerrt. Die verhältnismäßig hohe iNOS-Expression in der Probe der frühen Lutealphase lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit hypothetisch durch einen bei der Organentnahme makroskopisch nicht sichtbaren, entzündlichen Prozess im Gewebe erklären, der zu einer vermehrten Einwanderung von immunkompetenten Zellen und damit einer erhöhten iNOS-Konzentration geführt haben könnte [109]. Im Vergleich zur mRNA-Expression anderer Faktoren ist jedoch selbst dieser Extremwert gering. Die hier vorliegenden immunhistologischen Organschnitte, bei denen mit Hilfe von gegen das iNOS-Protein gerichteten Antikörpern eben dieses Enzym nachgewiesen und farblich kenntlich gemacht wurden, weisen folgendes Muster auf: die induzierbare NO-Synthase kann in der späten Lutealphase im nicht-graviden Uterus des Weißbüschelaffen weder im Drüsenepithel, noch im Stroma oder stromalen Blutgefäßen nachgewiesen werden; wahrscheinlich aufgrund zu geringer Expressionsrate. Das Myometrium wurde immunhistologisch nicht untersucht. Im frühgraviden Uterus jedoch ist eine geringgradige, disseminierte Anfärbung des Stromas ersichtlich.

Da bisher keine Veröffentlichungen zur iNOS-Expression im Uterus des Weißbüschelaffen vorliegen, wird ein Vergleich mit den menschlichen Gegebenheiten gezogen. Bezüglich der iNOS-Expression in menschlichem Gewebe liegen vorrangig immunhistochemische und NADPH-Diaphorase-Aktivitäts-, sowie einige RT-PCR-Studien vor, die hier kurz vorgestellt werden sollen. Tseng et al. wiesen bereits 1996 unspezifisch NO-Synthasen in Epithelzellen und Blutgefäßen des sekretorischen Uterus der Frau nach. Ihnen gelang zudem ein spezifischer Nachweis von iNOS in vereinzelt uterinen Drüsen während der Menstruation [203]. Keine zyklusabhängigen Veränderungen, jedoch eine schwache iNOS-Aktivität in dezidualisierten Zellen wurden von Telfer et al. nachgewiesen [191]. Dies warf die Frage auf, in welchem Maße iNOS progesteronreguliert sei oder ob es in einem direkten Zusammenhang mit der Dezidualisierung stünde. Tschugguel et al. und Khorram et al. erweiterten Tsengs Erkenntnisse insofern, als sie iNOS-mRNA und -Proteine vorrangig im spätsekretorischen Endometrium nachweisen konnten [103, 201, 202]. Die festgestellte Zunahme an iNOS-Protein korrelierte eng mit einer erhöhten Zahl immunkompetenter Zellen (zytotoxische T-Zellen, Makrophagen) im angrenzenden Stroma [201, 202]. Während der Menstruation konnten Tschugguel et al. gar eine sechsfach verstärkte iNOS-Aktivität im Vergleich zu Proben aus der proliferativen Phase nachweisen [201]. Vermutungen, dass diese Zellen und das durch sie produzierte Stickoxid an der „entzündlichen“ Abstoßungsreaktion der Gebärmutter Schleimhaut beteiligt seien, werfen erneut die Frage auf, ob dies auf einen nicht menstruierenden Primaten wie den Weißbüschelaffen übertragbar ist [202]. Die meisten Autoren von Studien an humanen Organen beschreiben eine vermehrte Expression von iNOS in der Lutealphase [103, 187, 202, 203], einige zusätzlich eine Expression in der Frühgra-

vidität [187, 191]. Eine frühe und deutliche Differenzierung zwischen nicht-graviden und graviden Uteri allein anhand der mRNA-Expression des Endometriums scheint jedoch beim Menschen nicht möglich. Wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit anhand von immunhistologischen Färbungen beim Weißbüschelaffen bereits sehr früh (in der spätsekretorischen Phase) eine Gravidität von einer späten Lutealphase differenziert werden. Die fehlende iNOS-Expression im nicht-graviden Uterus der späten Lutealphase könnte mit der beim Weißbüschelaffen fehlenden Menstruation erklärt werden.

Die in den Plazenten gemessenen iNOS-Konzentrationen lagen ebenfalls an der Grenze der mit einer Real-Time-PCR nachweisbaren Amplifikat-Konzentration. Frühe Studien, z.B. von Garvey et al. und Myatt et al. an menschlichen Plazenten waren zunächst nicht in der Lage, iNOS-mRNA in reifen Plazenten nachzuweisen [63, 132]. Im Jahre 1999 jedoch konnte dieselbe Arbeitsgruppe mit Hilfe einer empfindlicheren Multiplex-PCR mRNA für die induzierbare NOS auch in der Plazenta nachweisen [11].

Die in dieser Arbeit festgestellte geringe iNOS-Expression in der Plazenta des Weißbüschelaffen kann also im Konsens mit den am Menschen gewonnenen Erkenntnissen gesehen werden. Auch die geringe Zahl an mRNA-Amplifikaten im Uterus entspricht den oben beschriebenen Studien an Organen des Menschen, wenn auch keine Steigerung der Genexpression gegen Ende des Zyklus ersichtlich ist. Durch die in dieser Arbeit genutzten In-toto-Organen könnte eine geringgradige Steigerung jedoch verschleiert sein. So erscheint der Weißbüschelaffe für diesen Faktor als mögliches Modelltier für die reproduktionsbiologische Forschung nicht ungeeignet.

## 6.4 Insulin-like growth factor-System (IGF-System)

Das IGF-System ist ein sehr komplexes endokrines Regelsystem. Bisher sind zwei Liganden, zwei Rezeptoren und sechs hoch-affine Bindungsproteine sowie vier weitere Proteine mit einer niedrigeren Affinität zu IGF-1 und -2 bekannt. Weiterhin gibt es Proteasen, die spezifisch einzelne Bestandteile des IGF-Systems abbauen. Jeder Bestandteil dieses Regelsystems hat ein einzigartiges Expressionmuster in Geweben und im Entwicklungsverlauf einer Spezies. Die Bindungsproteine wirken sowohl inhibierend durch ihren sequestrierenden Effekt, als auch begünstigend durch den von Ihnen gebotenen Schutz der Liganden vor Proteasen und ihrer potentiellen Zuführung zu den Zielrezeptoren [94, 100].

### 6.4.1 Liganden: IGF-1 und IGF-2

**6.4.1.1 IGF-1** Bezüglich der mRNA-Expression des insulinähnlichen Wachstumsfaktors-1 liegen bereits Erkenntnisse an callithrichiden Geweben durch Gabler et al. vor. Er

konnte im Jahre 1998 bei seinen Studien an Ovidukten ein Expressionsminimum in der frühen sekretorischen Phase nachweisen, während die mRNA-Expression in der späten proliferativen Phase und der frühen bis mittleren sekretorischen Phase vergleichsweise erhöht war [62]. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen grundsätzlich eine ähnliche Expression im Uterus auf. Es kann ein deutliches Expressionsmaximum in der späten Follikelphase nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gabler et al. kann jedoch kein zweites Expressionsmaximum in der frühen Lutealphase bestätigt werden. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass das von Gabler et al. im Ovidukt gemessene zweite Maximum im Endometrium nicht vorhanden ist.

Das IGF-System wurde im menschlichen Uterus bereits eingehend untersucht, so dass Daten zur Expression von IGF-1 bereits in gängige Lehrbücher wie z.B. die *Encyclopedia of Reproduction* von Knobil eingegangen sind [79]. Das beim Menschen vor allem im Myometrium angereicherte, hoch östrogenresponsive IGF-1 zeigt in der proliferativen Phase einen Expressionsanstieg bis zu einem Plateau, welches von Tag 7 bis Tag 14 andauert, um dann bis zum Tag 21 wieder abzusinken und auf diesem niedrigen Niveau bis zum Tag 0 des neuen Zyklus (= 1. Tag der Menstruation) zu verbleiben [16, 69, 79]. Im Kontrast dazu beschreibt Giudice et al. für die Frau auch in der frühen Lutealphase noch eine höhere mRNA-Konzentration im Endometrium, was wiederum in Übereinstimmung mit den durch Gabler et al. gewonnenen Erkenntnissen am Ovidukt des Weißbüschelaffen gesehen werden kann [62, 71]. Wobei die tatsächlichen Effekte des weiterhin stark exprimierten IGF-1 durch eine deutliche, parakrin induzierte Reduktion der IGF1-R in der Lutealphase indirekt vermindert würden [182].

Hammond betont, dass das dem IGF-System eigene, spezielle Expressionsmuster deutlich zwischen einzelnen Spezies variiert [79]. Dennoch zeigen die hier vorgelegten Expressionswerte des IGF-1 beim Callithrichiden einen ähnlichen Zyklusverlauf wie beim Menschen mit einem Expressionsmaximum um den Zeitpunkt der Ovulation.

Ein signifikanter Einfluß durch kurz vor der Organentnahme zugeführte Hormone (FSH, hCG) ist nicht ersichtlich. Dies könnte zum Beispiel darin begründet sein, dass das IGF-1 von dem durch FSH/LH-Gabe angesprochenen Regelsystem unabhängig sein könnte, oder aber, dass der Faktor selber nicht direkt durch diese Hormone, sondern lediglich indirekt durch eine durch diese Hormone stimulierte Folgereaktion reguliert wird, womit eine größere zeitliche Verzögerung einhergeht. Die Möglichkeit der FSH/LH-Unabhängigkeit ist zumindest für das Hormon FSH unwahrscheinlich, da FSH das Follikelwachstum und damit deren Östradiolproduktion und -ausschüttung stimuliert und steigende Östrogenspiegel beim Menschen eine vermehrte IGF-1-Expression zur Folge haben [16]. Nach einer Applikation von hCG kurz vor der Organentnahme in der mittleren bis späten Follikelphase sind

die IGF-1 Gehalte ähnlich hoch, wie in Proben des 7. Tages der Follikelphase. Die dennoch leicht verringerten mRNA-Gehalte lassen die Vermutung zu, dass die ca. 22 Stunden vor der Organentnahme durchgeführte hCG-Gabe zu einem Rückgang der Transkription des IGF-1-Gens in mRNA geführt haben könnte. Dies impliziert eine generelle Reduktion an IGF-1 mRNA während und nach der Ovulation beim Weißbüschelaffen, was mit den hier vorgestellten geringeren mRNA-Gehalten in der Lutealphase konform geht und sich damit von der durch Giudice et al. festgestellten Zyklusdynamik des Menschen unterscheidet [71]. Auch eine Beschränkung des Probenmaterials auf das Endometrium zeigt in dieser Studie keinen eindeutigen Einfluß. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die IGF-1-Expression in den beiden Organteilen (Endo- und Myometrium) ähnlich ist und daher eine Beschränkung auf die uterine Schleimhaut bei konstant eingesetzter cDNA-Menge nach der Reversen Transkription der mRNA keinen signifikanten Einfluß hat. Diese Vermutung steht im Gegensatz zu den Aussagen der Autoren der Encyclopedia of Reproduction, die bei der Frau vorrangig dem Myometrium eine hohe IGF-1-Konzentration zusprechen [79].

In der vorliegenden Arbeit wurden in der spätgraviden Plazenta im Vergleich zu den Uterusproben relativ niedrige mRNA-Konzentrationen des IGF-1 nachgewiesen. In einer Studie neueren Datums beschreiben Sheikh et al. die IGF-1-Konzentration in der menschlichen Plazenta im Schwangerschaftsverlauf und berichten, dass IGF-1 in der jungen, sich entwickelnden Plazenta des ersten Trimesters in großen Mengen vorhanden ist. In der reifen Plazenta jedoch war weder in den Zotten noch im Chorion eine ausgeprägte IGF-1-Expression nachweisbar [170]. Frühere Studien konnten IGF-1 im fetalen Anteil der Plazenta nicht einmal im ersten Trimesters nachweisen [80]. Street et al. konnten in einer aktuellen Studie zwar große Mengen IGF-1-mRNA in reifen Plazenten nachweisen, nicht jedoch das entsprechende Protein [181]. Die Studien an menschlichen Organen sind also inkonsistent. Der Konzentrationsverlauf der mRNA in einer callithrichiden Plazenta im Verlauf einer Schwangerschaft wurde auch bei der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es kann aber festgehalten werden, dass die IGF-1-Konzentration in der Plazenta des Weißbüschelaffen zum Zeitpunkt der Geburt bzw. der Sectio caesarea nachweisbar, jedoch deutlich niedriger war, als jene im zyklischen Uterus. Vergleiche mit Plazenten zu früheren Trächtigkeitszeitpunkten sollten Bestandteil zukünftiger Forschung sein, um ein genaueres Expressionsprofil der callithrichiden Plazenta zu erhalten. Es ist bekannt, dass die Lokalisation der Probenentnahme (im Gegensatz zum Uterus) aus der aus vielen unterschiedlichen Zelltypen bestehenden Plazenta einen großen Einfluss auf die gemessenen Expressionswerte vieler Faktoren hat [96]. Hier wurden jedoch Homogenate halbirter ganzer Plazenten verwendet. Dies zeigt die Notwendigkeit der weiteren Untersuchung des IGF-1, unter anderem auch auf der Proteinebene (Immunhistochemie) an Organschnitten besonders deutlich auf. Gerade auch die Tatsache, dass viele Proteine des IGF-Systems einer potentiellen post-translationalen Modifizierung unterzogen

werden können, welche großen Einfluss auf ihre Aktivität, ihr Bindungsvermögen und ihren Effekt am Zielorgan haben, sollte dabei bedacht werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der IGF-1-Faktor des *Callithrix jacchus* sowohl in der kodierenden Gensequenz als auch in der mRNA-Expression in Uterus und Plazenta große Ähnlichkeit mit dem IGF-1-Faktor des Menschen aufweist. Auch dadurch erscheint der Weißbüschelaffe als Modelltier geeignet.

**6.4.1.2 IGF-2** In allen untersuchten uterinen und plazentären Proben konnte IGF-2 nachgewiesen werden. Die in dieser Studie gemessenen, relativen mRNA-Gehalte für IGF-2 sind, ebenso wie die des IGF-1, verglichen mit den Gehalten der anderen Faktoren sehr hoch. Im Gegensatz zu IGF-1 liegt hier der Schwerpunkt der Genexpression jedoch eindeutig auf der Plazenta, während die Werte der Uteri insgesamt geringer ausfielen. Die Proben der Schleimhautstanzen sowie die der hormonbehandelten Tiere zeigen sich tendenziell leicht erhöht, die 9 Tage nach dem Eisprung gewonnene Probe der späteren Lutealphase eher erniedrigt. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Studien zur Expression von IGF-2 im Corpus Uteri beim Weißbüschelaffen vor. Im Ovidukt jedoch wurde der Faktor, ebenso wie in der Plazenta, bereits nachgewiesen [62, 162]. Im Ovidukt des *Callithrix jacchus* war die Genexpression in der frühen proliferativen Phase geringer als die der späten proliferativen und frühen sekretorischen Phase. Bei immunhistochemischen Färbungen der Ovidukte (Isthmus und Ampulla) konnte IGF-2 jedoch nicht nachgewiesen werden [62]. Bei der Frau beschreibt Hammond für IGF-1 eine Expression in Endo- und Myometrium, während sich die Expression von IGF-2 seinen Angaben zufolge auf das Endometrium beschränkt [79]. Hier steigt die Expression von IGF-2, dem eine Rolle bei der Dezidualisierung des Endometriums zugeschrieben wird, ab dem Tag 21 des menschlichen Zyklus an [69, 71, 79]. Zhou et al. schränken dies sogar auf das endometriale Stroma ein. Sie konnten keine IGF-2-Expression im Epithel nachweisen [222]. Eine Erhöhung des IGF-2 Gehaltes im sekretorischen Uterus kann für den Weißbüschelaffen hier nicht bestätigt werden, während jedoch die iatrogene Hormonzufuhr einen gewissen Effekt zu haben scheint. Inwiefern der IGF-Regelkreislauf des Weißbüschelaffen direkt oder indirekt durch die Hormone FSH und hCG beeinflussbar ist, kann abschließend in dieser Studie nicht geklärt werden.

Die markante Erhöhung der IGF-2-Expression in der Plazenta bestätigt die beim Menschen gewonnenen Erkenntnisse. Während einer Schwangerschaft beim Menschen wurde IGF-2 vorrangig in Zellen fetalen Ursprungs nachgewiesen, aber auch in der Plazenta und Decidua [80, 90]. Auch hier lagen die relativen Konzentrationen jeweils deutlich über denen von IGF-1 und IGF1-R [80]. Han et al., die den Standpunkt vertreten, IGF-2 werde in normalen Schwangerschaften ausschließlich in der Plazenta, nicht jedoch in der Dezidua ge-

bildet, konnten in ihren in situ-Studien bezüglich der IGF-2-Expression zwischen Plazenten des zweiten und des dritten Trimesters keine signifikanten Unterschiede nachweisen [80]. Beim Pavian (*Papio anubis*) konnte ein Anstieg der mRNA-Konzentration von IGF-2 in plazentärem Gewebe im Verlauf der Trächtigkeit nachgewiesen werden [223].

Während die mRNA-Expression im Uterus des Weißbüschelaffen vor allem in der Lutealphase Diskrepanzen zur Zyklusdynamik der Frau aufweist, bestätigen die in der Plazenta gemessenen Werte die oben erwähnten Studien am Menschen.

#### **6.4.2 Rezeptor: IGF1-R**

Auch der IGF1-Rezeptor konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden, jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen als z.B. IGF-2. Die in den unterschiedlichen Uterusproben gemessenen Konzentrationen waren zyklus- und hormonunabhängig recht homogen. Die zunächst ausgeprägt wirkenden Expressionsunterschiede relativieren sich in Anbetracht der geringen Gesamtkonzentration der mRNA. Die mRNA-Konzentrationen der Plazenta-proben waren noch einmal deutlich geringer als die der Uterusproben.

Der IGF-1-Rezeptor wurde ebenfalls bereits im Ovidukt des Weißbüschelaffen nachgewiesen, wo er mit einem Expressionsmaximum um den Zeitpunkt der Ovulation dieselbe Zyklusdynamik aufwies, wie auch alle anderen durch Gabler et al. untersuchten Faktoren [62]. Die Erkenntnisse bei der Frau zu IGF1-R sind inkonsistent: Giudice postuliert bei Knobil [69] eine konstante IGF1-R-Konzentration im Zyklusverlauf, während ihre Arbeitsgruppe im Jahre 1998 einen geringgradigen Anstieg vom ersten bis zum letzten Zyklustag beschreibt (jeweils den Grafiken entnommen) [71]. Andere bekunden eine Progesteron-Sensibilität vom IGF1-R in vitro, welche zu einer Reduzierung des Rezeptors in der Lutealphase führen könnte, ohne jedoch eine indirekte Herabregulierung durch eine progesteronstimulierte, autokrine IGF-1-Sekretion, welche in früheren Experimenten zu einer Herabregulierung des IGF1-R geführt hat, ausschließen zu können [182]. Mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen können weder die Ergebnisse von Gabler et al. zum Ovidukt des Weißbüschelaffen mit einem Expressionsmaximum um die Ovulation, noch die Feststellungen von Giudice et al. bei der Frau mit einer vermehrten Rezeptorzahl gegen Ende des Zyklus bestätigt werden. Eine identische Expression der Wachstumsfaktoren in Ovidukt und Uterus war auch bei derselben Spezies in unterschiedlichen Organen nicht unbedingt zu erwarten. Jedoch geht eine recht homogene IGF1-R-Expression im Uterus des Weißbüschelaffen mit den Aussagen der Autoren der Encyclopedia of Reproduction über den Menschen konform [79].

Die festgestellten geringen IGF1-R mRNA-Konzentrationen in der Plazenta des Weißbü-

schelaffen bestätigen prinzipiell das bei der Frau nachgewiesene Expressionsprofil: In der humanen Plazenta waren in allen Zelltypen geringe Konzentrationen an IGF1-R vorhanden [80, 81], beim Pavian war in allen drei Trächtigkeits-Trimestern etwa die gleiche Menge mRNA für den Rezeptor nachweisbar [223]. So kann festgehalten werden, dass der IGF1-R dem des Menschen besonders in der kodierenden Sequenz sehr ähnlich ist. Die nachgewiesenen mRNA-Gehalte in den einzelnen Organen entsprechen den Ergebnissen einiger Autoren [69, 79–81], während sie anderen Autoren eher widersprechen [62, 71].

### 6.4.3 Bindungsproteine: IGFBP-1 und IGFBP-2

**6.4.3.1 IGFBP-1** Bei den hier vorgestellten Untersuchungen konnten im Uterus des Weißbüschelaffen durchgehend nur sehr geringe mRNA-Gehalte für den Faktor IGFBP-1 nachgewiesen werden, Säulen 1-14). Etwaige Ausschläge nach oben wie z.B. in der Probe C9 mit einer relativen mRNA-Konzentration von 73,55 (absolut 0,30 fg/ $\mu$ l) sind, verglichen mit z.B. den für IGFBP-2 gemessenen Werten, immer noch sehr niedrig.

Sowohl die bei der Frau, als auch die beim Pavian festgestellte Expression von IGFBP-1 hat ihr Maximum in der späten Lutealphase [55, 58, 70, 71] und ist dort vor allem in dezidualisierten Zellen nachweisbar [80]. Auch während der Gravidität konnten ähnliche Expressionsprofile nachgewiesen werden [55]. Aktuelle Untersuchungen zu potentiell charakteristischen, biochemischen und immunologischen Markern für das Implantationsfenster konnten neben anderen Faktoren auch eine erhöhte IGFBP-1-Konzentration nachweisen [124]. Diese ausgeprägte IGFBP-1-Expression ist eine Besonderheit des menschlichen Uterus und einiger anderer Spezies [79]. Diese Feststellungen können für den Weißbüschelaffen nicht bestätigt werden. Da man annimmt, dass das bei der Frau durch die maternale Dezidua sezernierte IGFBP-1 Einfluss auf die Invasivität des Trophoblasten nimmt, während der inhibitorische Effekt des IGFBP-1 wiederum durch eine Reduktion seiner Expression durch von Plazenta und Trophoblasten produziertes IGF-2 vermindert wird [97, 98], stellt sich die Frage, inwieweit diese Theorie auf den Weißbüschelaffen übertragbar ist. Weiterhin ist der Phosphorylierungsgrad des IGFBP-1-Proteins für seine Funktion von entscheidender Bedeutung, da die nicht-phosphorylierte Form eine deutlich geringere Affinität zu IGF hat, als das phosphorylierte Gegenstück [67, 208]. Dies wiederum hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des IGF-1 und damit dessen Einfluss als Wachstumsfaktor. Allein der Nachweis unterschiedlicher Genexpressionen von IGFBP-1 auf mRNA-Ebene im Uterus des Weißbüschelaffen lässt folglich keine präzise Aussage über die potentiellen physiologischen Folgen seiner Expression auf das gesamte IGF-System zu. Weitere Studien auf Proteinebene, besonders auch zum Phosphorylierungsgrad der Proteine sowie IGF-1-Bindungsversuche, könnten in Zukunft weitere Aufklärung bringen. Neben seiner Aufgabe als Bindungsprotein

der Wachstumsfaktoren hat IGFBP-1 zusätzlich eigene, unabhängige Effekte an Zielzellen: IGFBP-1 bindet neben IGF-1 und -2 auch an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine auf der Zelloberfläche [56]. Mit der Bindung an dieses Integrin hat IGFBP-1 einen Effekt auf die Zell-Motilität und die Anhaftung der Zellen untereinander, was wiederum bei der Invasion des Trophoblasten in die Gebärmutterschleimhaut von Bedeutung sein könnte [56]. IGFBP-1 wird als das am ausgeprägtesten vorkommende IGF-Bindungsprotein im menschlichen Uterus beschrieben [79]. Bereits die hier vorgelegten Messungen der Faktoren IGFBP-1 und -2 lassen erkennen, dass dies so nicht auf den Weißbüschelaffen übertragbar ist. Inwiefern die bei der Frau durch IGFBP-1 hervorgerufenen bzw. erzielten Effekte beim Callithrichiden von anderen Bindungsproteinen übernommen werden, kann aufgrund der Datenlage nicht entschieden werden.

In der reifen Plazenta des Weißbüschelaffen konnte eine vergleichsweise hohe mRNA-Expression nachgewiesen werden. Da auch hier bisher keine Studien am Weißbüschelaffen vorliegen, die zu einem Vergleich herangezogen werden könnten, wird zunächst die Lage beim Menschen dargelegt. Bezogen auf die Expression in der Plazenta der Frau konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: Hills et al. stellten einen deutlichen Anstieg an IGFBP-1-mRNA in den letzten Wochen der Schwangerschaft fest, unabhängig davon, ob die Kinder vaginal oder per elektivem (geplantem) Kaiserschnitt geboren wurden [91]. Bei Notfallkaiserschnitten und Schwangerschaften mit sogenannter Fetal Growth Restriction (Intrauteriner Mangelentwicklung) jedoch war der IGFBP-1-Gehalt vergleichsweise deutlich erhöht [91, 181]. Ein Einfluss der hier bei den Weißbüschelaffen vorgenommenen geplanten Sectio caesareae bei gesunden Schwangerschaften auf den IGFBP-1-Gehalt kann also als unwahrscheinlich angesehen werden. Die Konzentration von IGFBP-1 und -2 war deutlich geringer als die von IGF-1 und -2 [181]. Auch in diesem Organ ist der Phosphorylierungsgrad von entscheidender Bedeutung für die Wirkung des IGFBP-1: die Untersuchungen von Gibson et al. an dezidualisierten Endometriumzellen des ersten Trimesters konnten einen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des von diesen Zellen sezernierten IGFBP-1 durch Zugabe von IGF-1, -2 und Insulin nachweisen, wobei nicht nur der zugeführte Faktor selber, sondern auch dessen Konzentration entscheidend für die Menge an produziertem IGFBP-1 war [67]. Beim Pavian konnte mit Hilfe der in situ-Hybridisierung sowohl mRNA als auch IGFBP-1-Protein im Inneren der Plazentazotten in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden [114]. Im Gegensatz zum IGF-2 sank die IGFBP-1-mRNA-Konzentration in der Plazenta im Trächtigkeitsverlauf deutlich [223]. Meist wurde IGFBP-1 ausschließlich im maternalen Teil der Plazenta (Deziduazellen) nachgewiesen [54, 80].

Die in dieser Studie festgestellte erhöhte Anzahl an mRNA-Amplifikaten wurde ausschließlich in reifen Plazenten zum Zeitpunkt der Geburt gemessen. Es steht außer Frage, dass die plazentären Werte höher als die des Uterus sind. Inwieweit jedoch eine Expressi-

onsdynamik im Verlauf der Schwangerschaft vorliegt, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten. Für eine weitergehende Beurteilung dieses Faktors hinsichtlich seiner Verwendbarkeit im Modelltier des *Callithrix jacchus* in der reproduktionsbiologischen Forschung sollte nun eine erste Grundlage bestehen.

Es kann festgehalten werden, dass der Faktor IGFBP-1 in allen untersuchten callithrichiden Proben nachgewiesen werden konnte, obschon nur in geringen Konzentrationen.

**6.4.3.2 IGFBP-2** Die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Real-Time-PCR gemessene IGFBP-2 mRNA-Expression zeigt ein insgesamt sehr inhomogenes Bild. Jedoch ist eine deutliche Verringerung der Expression in der Lutealphase und ein deutlicher Anstieg in der reifen Plazenta erkennbar. Die dritte Plazentaprobe zeigt eine vergleichsweise niedrige relative mRNA-Konzentration. Im Gesamtbild sind die IGFBP-2-Gehalte deutlich höher als jene des IGFBP-1. Dies stellt bereits eine deutliche Diskrepanz zu den Expressionsverhältnissen bei der Frau dar [70].

Durch Giudice et al. wurde in ihren Studien am Uterus der Frau ein geringgradiger Anstieg von IGFBP-2 im Zyklusverlauf von Tag 1 bis Tag 28 nachgewiesen [70, 71]. Eine aktuellere Studie, bei der umfangreiche Genexpressionsprofile mit Hilfe von Microarrays angefertigt wurden, konnte einen IGFBP-2 Expressionsanstieg um das 2,7-fache zum Zeitpunkt der Implantation (= späte Lutealphase) feststellen [102]. Da bisher keine Studien vorliegen, die einen direkten Konzentrationsvergleich zwischen Uterus und Plazenta zeigen, müssen die erhöhten mRNA-Konzentrationen für IGFBP-2 in der reifen Plazenta nicht unbedingt im Widerspruch mit den Ergebnissen dieser Arbeit stehen, da im Verlauf der Trächtigkeit beim Pavian eine Abnahme der IGFBP-2 Konzentration festgestellt wurde, wobei die Konzentrationsabnahme im reinen Synzytiotrophoblasten deutlicher messbar war, als in Zotten-Homogenaten [223]. Street stellte zudem einen Vergleich von IGF-1, -2 und IGFBP-1 sowie -2 in der menschlichen Plazenta an und konnte nachweisen, dass IGFBP-2 bei normalen Schwangerschaften deutlich geringer exprimiert war als IGF-1 und -2 [181]. Somit muss davon ausgegangen werden, dass das Expressionsprofil dieses Faktors im Zyklusverlauf beim Weißbüschelaffen deutlich von dem der Frau abweicht. Zukünftige Studien könnten die komplexen Zusammenhänge des IGF-Systems im Uterus des Weißbüschelaffen untersuchen, um die sich hier andeutende Diskrepanz zum menschlichen Expressionsprofil schlüssig zu verifizieren.

Die Aufgabe des IGF-Bindungsproteins-2 wird in der Regel in der Unterbindung von IGF-Effekten, besonders denen von IGF-2 gesehen, wobei das Protein z.B. beim Rind eine zweifach höhere Affinität zu IGF-2, als zu IGF-1 hat [27, 56]. Bei den hier festgestellten Expressionsunterschieden zwischen Frau, Pavian und Weißbüschelaffe stellt sich die Fra-

ge, inwieweit die bereits bekannten Aufgaben des IGFBP-2 auch beim Callithrichiden zum Tragen kommen, bzw. durch welche Mechanismen oder andere Proteine jene Aufgaben übernommen werden (müssen). Bei dem Versuch, die in der hier vorliegenden Arbeit gemessenen IGFBP-2 Konzentrationen in einen Zusammenhang mit den Verhältnissen beim Menschen oder anderen Affen zu bringen, muss ebenfalls bedacht werden, dass IGFBP-2 neben dem ihm üblicherweise zugeschriebenen Effekt der IGF-Inhibierung in der Lage ist, direkt an bestimmten Oberflächenstrukturen der Zelle zu binden, namentlich an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine und Glycosaminoglycane (Schütt et al., 2000 und Russo et al., 1997 wie zitiert in [56]).

Die hier festgestellte Diskrepanz in der mRNA-Expression einzelner Faktoren des IGF-Systems zwischen *Callithrix jacchus* und Mensch zeigt auf beeindruckende Weise, dass auch ein dem Menschen verwandter Primat wie der Weißbüschelaffe sich dennoch biochemisch und auf Genexpressionsebene vom Menschen deutlich unterscheiden kann.

Zusammenfassend lässt sich für *Callithrix jacchus* ein relativ komplettes IGF-System in Uterus und Plazenta feststellen. Alle notwendigen Komponenten (Liganden, Rezeptor, Bindungsprotein) können eindeutig anhand ihrer mRNA-Expression nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Probenzahl können aber valide physiologisch interessante Aussagen nur vermutet werden.

## 6.5 Ausblick

Diese Arbeit ist eine der ersten Studien, die neben den bereits dargestellten Östrogen-Rezeptoren die Faktoren eNOS, iNOS und Teile des IGF-Systems in Uterus und Plazenta des *Callithrix jacchus* erfolgreich nachgewiesen hat. Eine wichtige Erkenntnis der Studie ist, dass es mit den bekannten mRNA-Extraktions-Methoden möglich ist, die untersuchten Faktoren in den Reproduktionsorganen des Weißbüschelaffen nachzuweisen, auch wenn nur geringe Gewebemengen zur Verfügung stehen. Zudem ist die Sequenzierung der untersuchten Genabschnitte gelungen und ihr hoher Grad an Homologie zu bekannten menschlichen Sequenzen konnte bestätigt werden. Weiterhin gibt es bisher nur sehr wenige Studien, die die mRNA-Gehalte von Uterus und Plazenta derselben Primatenspezies direkt vergleichen und damit zum Beispiel die Frage des Ausmaßes der relativen Beteiligung der Faktoren an reproduktionsbiologischem Geschehen stellen. Die vergleichende Messung der Genexpression eines Faktors in unterschiedlichen Organen ermöglicht die relative Einordnung derselben und eröffnet damit eine Vergleichsmöglichkeit der Genexpression zwischen unterschiedlichen Spezies auch bei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Organe und Gewebe deuten bei einigen untersuchten Faktoren eine hormonabhängige Expressionsdynamik (z.B. ER- $\alpha$ , eNOS) und/oder einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen Uterus und Plazenta an (z.B.: ER- $\alpha$ , eNOS, IGF-1, IGF-2, IGF1-R).

Bei einigen Faktoren war zudem die gemessene Amplifikatzahl sehr niedrig, was eine Interpretation bei gegebener geringer Probenzahl erschwerte (z.B. iNOS, IGFBP-1). Gerade der Vergleich der beiden Organe Plazenta und Uterus in dieser Studie zeigt deutlich die unterschiedliche potentielle Responsivität eines Gewebes auf Hormoneinflüsse (z.B. ER- $\alpha$ ), bzw. die abweichenden Funktionen der Organe (z.B. IGF-2, IGF1-R) auf. Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse waren auch bei geringer Probenzahl in der Lage, einen ersten Eindruck über die Vergleichbarkeit der mRNA-Expression der untersuchten Faktoren bei der Frau und beim Weißbüschelaffen zu ermitteln. Deutlich Unterschiede, wie in der IGFBP-1- und IGFBP-2-Expression im Uterus konnten ebenso diskutiert werden, wie ähnliche Expressionsprofile (z.B. eNOS). Die Erkenntnis eben dieser Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Weißbüschelaffe und Mensch zeigen auf beeindruckende Weise, wie verschiedenartig auch nah verwandte Spezies sind. Trotz aller Diskrepanzen zwischen beiden Spezies kann davon ausgegangen werden, dass die NO-Synthasen und das IGF-System bei beiden von ähnlich entscheidender Bedeutung für die Reproduktion sind.

Aufbauend auf dieser ersten Studie wird es nun möglich sein, Expression, Aufgabe und Funktion der untersuchten Faktoren im *Callithrix jacchus* im Rahmen von zukünftigen Untersuchungen genauer zu beschreiben, um eine umfassendere Vorstellung des Reproduktionsgeschehens beim Weißbüschelaffen zu erhalten. Weitere Studien zum Nachweis der translatierten Proteine, die nicht nur deren generelle Anwesenheit, sondern auch ihre Aktivität, z.B. in Form von Untersuchungen zu ihrem Phosphorylierungsgrad (Bindungsproteine), könnten in Zukunft weitere Aufklärung bringen. Mit Hilfe dieser Studien wäre eine bessere Beurteilung der physiologischen Rolle und Effektivität der Faktoren, sowie ein genauer Vergleich mit den menschlichen Verhältnissen möglich. Zudem wären Untersuchungen zur genauen Lokalisation der Faktoren, ähnlich wie in dieser Arbeit vorgestellt für die sehr interessanten Faktoren ER- $\alpha$ , eNOS und iNOS im Uterus und der Plazenta gewinnbringend.

## 7 Zusammenfassung

Der Uterus und die Plazenta der Säugetiere spielen entscheidende Schlüsselrollen im Reproduktionsgeschehen. Sie stellen im Idealfall optimale Bedingungen für die Implantation und die weitere Entwicklung der befruchteten Eizelle zur Verfügung und ermöglichen mit der erfolgreichen Fortpflanzung die Grundvoraussetzung für das Fortbestehen einer Art. Viele der lokal ablaufenden Prozesse werden (potentiell) durch Östrogene, NO-Synthasen und Wachstumsfaktoren beeinflusst und reguliert. Insbesondere den Wachstumsfaktoren wird eine bedeutende Rolle im Fortpflanzungsgeschehen zugeschrieben. Man vermutet, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf die ideale Entwicklung und das Größenwachstum des ungeborenen Fetus haben. Gleichzeitig ist bekannt, dass besonders das IGF-System große tierartige Unterschiede aufweist. Dem NO-System wird einerseits eine Ruhigstellung des Myometriums während einer Trächtigkeit zugeschrieben (epitheliale NO-Synthase), andererseits haben Forscher die These aufgestellt, die induzierbare NO-Synthase sei maßgeblich an der Menstruation des Menschen und vielleicht auch an der Implantation des Konzeptus beteiligt, da beide Vorgänge Charakteristiken entzündlicher Prozesse zeigen. Die maßgebliche Steuerung beider Organe durch Steroidhormone wurde bereits mehrfach bewiesen.

Um einen ersten Einblick in die Expressionsprofile des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*), eines vielfach in der Reproduktionsforschung als Modelltier für den Menschen genutzten Tieres, zu erlangen, wurde zunächst versucht, die Faktoren von Interesse in unterschiedlichen callithrichiden Homogenaten nachzuweisen, um anschließend die zyklus- und hormonabhängigen globalen Veränderungen der mRNA-Expression in Uterus und Plazenta exemplarisch zu untersuchen. Das Untersuchungsmaterial wurde nach der Entnahme kryokonserviert und für diese Arbeit von Frau Prof. Einspanier, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um halbierte Gesamt-Uteri zu unterschiedlichen Zykluszeitpunkten, von denen einige der Tiere vor der Organentnahme mit den Hormonen FSH oder hCG behandelt wurden, zwei Schleimhautstanzen sowie drei Plazenten, die während geplanter Sectiones caesareae und einer natürlichen Geburt gewonnen wurden.

Bei den Organen konnte mittels Real-Time-PCR jeder der untersuchten Faktoren (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , eNOS, iNOS, IGF-1, IGF-2, IGF1-R, IGFBP-1 sowie IGFBP-2) nachgewiesen und mRNA-Expressionsunterschiede quantitativ gemessen werden. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden zudem die Housekeepingfaktoren Ubiquitin und 18 S-rRNA einbezogen. Transkripte aller untersuchten Faktoren konnten in allen Proben nachgewiesen werden, die entsprechenden Genabschnitte wurden erfolgreich sequenziert. Die neuen Sequenzen wurden mit bereits vorliegenden anderen callithrichiden oder humanen Sequenzen verglichen und zeigten zu diesen jeweils ein hohes Maß an Homologie.

Die hier vorliegende Studie ist eine der ersten, die einen direkten Vergleich der Genexpression zwischen Uterus und Plazenta beim Weißbüschelaffen anstellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Faktoren in den zwei unterschiedlichen Organen Uterus und Plazenta unabhängig voneinander exprimiert werden. Während die Expression der Housekeepinggene 18 S-rRNA und Ubiquitin in beiden Organen keine deutliche Diskrepanz zeigt, bestehen vor allem für die Faktoren ER- $\alpha$ , eNOS, IGF-1, IGF-2 und IGF1-R deutlich Expressionsunterschiede zwischen Plazenta und Uterus. Faktoren wie eNOS und IGF-1 zeigen eine deutlichere Zyklusdynamik als beispielsweise IGF-1, IGF1-R, IGFBP-1 und IGFBP-2, deren Expression teilweise trotz Normalisierung recht inhomogen war. Besonders bei den Faktoren iNOS und IGFBP-1 war die Anzahl der gemessenen Transkripte sehr gering und nahe der Nachweisgrenze, so dass bei diesen Faktoren davon ausgegangen werden muss, dass bereits minimale Veränderungen im Organismus des Donortieres eine augenscheinlich massive Variation des Messwertes im untersuchten Organ zur Folge haben kann.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich folgern, dass im Uterus und in der Plazenta des Weißbüschelaffen ein in vielen Faktoren ähnliches, nicht jedoch identisches, bei einigen Faktoren auch stark differierendes Expressionsprofil im Vergleich mit der Frau vorliegt. Die zyklus- und trächtigkeitsabhängig regulierten Faktoren lassen vermuten, dass sie am Reproduktionsgeschehen entscheidenden Einfluss nehmen. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die NO-Synthasen ebenso wie das IGF-System, wie bereits bei anderen Tierarten gezeigt, auch beim weiblichen Weißbüschelaffen eine essentielle Rolle bei der Reproduktion spielen. Ob und inwieweit sich *Callithrix jacchus* in Bezug auf diese Faktoren als Modelltier für die Reproduktionsforschung bei der Frau eignet, ist differenziert zu sehen und muss in weiteren Studien präzisiert werden.

---

## 8 Summary

### **Characterization of the expression of selected candidate genes in uterus and placenta of the marmoset (*Callithrix jacchus*) - a model for feto-maternal interaction**

In mammals uterus and placenta play a pivotal role in reproduction. Ideally they provide the optimal environment for the implantation and the further development of the fertilized zygote and build the foundation of the survival of a species by making successful breeding possible. Many of the locally occurring processes are potentially influenced/affected or even regulated by estrogens, NO-synthases and growth factors. Especially the growth factors are meant to play an important role in reproduction. It is assumed that they have a crucial influence on the ideal development and process of growth in the unborn fetus. At the same time it was experimentally verified that especially the insulin-like growth factor-system shows ample differences between species. The NO-System on the one hand is meant to be involved in uterine quiescence of the myometrium during pregnancy (eNOS), on the other some scientists hypothesize that iNOS play a substantial role in human menstruation and may participate in implantation since both processes show elements of inflammatory events. The control of both organs by steroid hormones has been scientifically proven many times.

To provide a first insight into the expression profiles of the marmoset *Callithrix jacchus*, a common model in reproductive research, initially the interesting factors were detected in tissue-homogenates of *Callithrix jacchus*. Afterwards the cycle and hormonally dependent global changes of mRNA-expression in uterus and placenta were examined exemplarily. To accomplish this, the harvested organs have been cryopreserved and been made available to me by our cooperational partner, Prof. Almuth Einspanier, Veterinary Faculty of Leipzig University. The organs were bisected whole uteri at different stages of the menstrual cycle, some of them treated with the hormones FSH or hCG prior to harvesting, two endometrial punches and three placentae at term (timed sectiones caesareae and one natural birth).

By using real-time-PCR it was possible to detect and quantify all examined factors (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , eNOS, iNOS, IGF-1, IGF-2, IGF1-R, IGFBP-1 and IGFBP-2) in the used organs. To be able to perform a normalization of the results, the housekeeping genes ubiquitin and 18 S-rRNA were also included into the study. Transcripts of all examined factors have been detected in all the tested organs, the corresponding gene segments have been successfully sequenced. The newly sequenced cDNA-templates were matched to corresponding callithrichid or human sequences and always showed similarities to a large extent.

This present study is one of the first drawing a direct comparison of the genetical expression between the uterus and placenta of the marmoset. The results clearly show that the examined factors are differently expressed within the two organs uterus and placenta.

While the expression of the housekeeping genes ubiquitin and 18 S-rRNA does not show a distinct discrepancy between the two types of organs, especially the factors ER- $\alpha$ , eNOS, IGF-1, IGF-2 and IGF1-R show a very marked variation between placenta and uterus. The factors eNOS und IGF-1 showed a clearer dynamic in the estrous cycle than for example those of the factors IGF-1, IGF1-R, IGFBP-1 and IGFBP-2, whose expression stayed quite inhomogeneous even despite normalization. Especially for the factors iNOS and IGFBP-1 the number of transcripts was exceptionally low and close to our detectable limits, therefore it has to be assumed that even minor changes in the intact living organism of the donor may lead to apparent variations in measurement in the examined organ.

This study leads to the result that uterus and placenta of the marmoset show an expressional profile that in some aspects resembles the human profile without being identical, but in others also varies distinctively from that of the human woman. The cycle- and pregnancy-regulated factors lead to the hypothesis that they are playing a major role in reproduction. Therefore it can be concluded that the NO-synthases and the IGF-system, as has already been shown in other species, also play an important role within the reproduction of the marmoset monkey. To validate the marmoset as a model for human reproduction on this factors, more differentiated studies are needed to define their role more precisely.

---

## Literatur

- [1] ABBOTT, D. H. und J. P. HEARN: *Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil, 53(1):155–66, 1978.
- [2] AKTAN, F.: *iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation*. Life Sci, 75(6):639–653, 2004.
- [3] AL-HIJJJI, J., E. ANDOLF, R. LAURINI und S. BATRA: *Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium*. Reprod Biol Endocrinol, 1:51, 2003.
- [4] ALDERTON, W. K., C. E. COOPER und R. G. KNOWLES: *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 357(Pt 3):593–615, 2001.
- [5] ALI, M., I. BUHIMSCHI, K. CHWALISZ und R. E. GARFIELD: *Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition*. Mol Hum Reprod, 3(11):995–1003, 1997.
- [6] ARIEL, I., A. HOCHBERG und M. SHOCHINA: *Endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity in early gestation and in trophoblastic disease*. J Clin Pathol, 51(6):427–31, 1998.
- [7] ASRM: *Assisted reproductive technology in the United States: 2001 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry*. Fertil Steril, 87(6):1253–66, 2007.
- [8] AURICH, J. E.: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Bd. 2, Kap. Endokrinpharmakologie, S. 280–318. Enke, Stuttgart, 2002.
- [9] BAEK, K. J., B. A. THIEL, S. LUCAS und D. J. STUEHR: *Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme*. J Biol Chem, 268(28):21120–9, 1993.
- [10] BARTOL, F. F.: *Uterus, Nonhuman*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, S. 950–960. Academic Press, San Diego, 1998.
- [11] BAYLIS, S. A., P. J. STRIJBOS, A. SANDRA, R. J. RUSSELL, A. RIJHSINGHANI, I. G. CHARLES und C. P. WEINER: *Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta*. Mol Hum Reprod, 5(3):277–86, 1999.
- [12] BENIRSCHKE, K.: *Placenta: Implantation and Development*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 3, S. 848–855. Academic Press, San Diego, 1998.
- [13] BENIRSCHKE, K., J. ANDERSON und L. BROWNHILL: *Marrow Chimerism in Marmosets*. Science, 138(3539):513–515, 1962.
- [14] BERDEAUX, A.: *Nitric oxide: an ubiquitous messenger*. Fundam Clin Pharm, 7(8):401–11, 1993.
- [15] BERG, J. M., J. L. TYMOCZKO und L. STRYER: *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York, 6. Aufl., 2007.
- [16] BERGA, S. L.: *Menstrual Cycle*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 3, S. 189–194. Academic Press, San Diego, 1998.

- 
- [17] BORON, W. F. und E. L. BOULPAEP: *Medical physiology: A cellular and molecular approach*. Saunders, Philadelphia, 1. Aufl., 2002.
- [18] BRATKE, K., D. MYRTEK, M. KÜPPER und W. LUTTMANN: *Der Experimentator: Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Aufl., 2009.
- [19] BRENNER, R. M. und O. D. SLAYDEN: *Steroid receptors in blood vessels of the rhesus macaque endometrium: a review*. Arch Histol Cytol, 67(5):411–6, 2004.
- [20] BRYNS, M., K. SZYLLO, H. ROMANOWICZ-MAKOWSKA, Z. DOBROWOLSKI, I. MASLOWSKA und W. KRAJEWSKA: *Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol*. Sao Paulo Med J., 127(3):128–133, 2009.
- [21] BUDRAS, K.-D., W. FRICKE und R. RICHTER: *Atlas der Anatomie des Hundes*. Schlütersche, Hannover, 6. Aufl., 2000.
- [22] BUHIMSCHI, I., M. ALI, V. JAIN, K. CHWALISZ und R. E. GARFIELD: *Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour*. Hum Reprod, 11(8):1755–66, 1996.
- [23] BUKOVSKY, A., M. CEKANOVA, M. R. CAUDLE, J. WIMALASENA, J. S. FOSTER, D. C. HENLEY und R. F. ELDER: *Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol*. Reprod Biol Endocrinol, 1:13, 2003.
- [24] BUTLER, A. A., S. YAKAR, I. H. GEWOLB, M. KARAS, Y. OKUBO und D. LEROITH: *Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology*. Comp Biochem Physiol B, 121(1):19–26, 1998.
- [25] BUTTERY, L. D., A. MCCARTHY, D. R. SPRINGALL, M. H. SULLIVAN, M. G. ELDER, T. MICHEL und J. M. POLAK: *Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface*. Placenta, 15(3):257–65, 1994.
- [26] CARR, B. R.: *Female Reproductive System, Humans*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 2, S. 205–214. Academic Press, San Diego, 1998.
- [27] CARRICK, F. E., B. E. FORBES und J. C. WALLACE: *BIACore analysis of bovine insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 identifies major IGF binding site determinants in both the amino- and carboxyl-terminal domains*. J Biol Chem, 276(29):27120–8, 2001.
- [28] CHAMBERS, P. L. und J. P. HEARN: *Peripheral plasma levels of progesterone, oestradiol-17 beta, oestrone, testosterone, androstenedione and chorionic gonadotrophin during pregnancy in the marmoset monkey, Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil, 56(1):23–32, 1979.
- [29] CHARLES, I. G., R. M. PALMER, M. S. HICKERY, M. T. BAYLISS, A. P. CHUBB, V. S. HALL, D. W. MOSS und S. MONCADA: *Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte*. P Natl Acad Sci USA, 90(23):11419–23, 1993.
- [30] CHWALISZ, K. und R. E. GARFIELD: *Role of nitric oxide in implantation and menstruation*. Hum Reprod, 15 Suppl 3:96–111, 2000.
-

- 
- [31] CHWALISZ, K., E. WINTERHAGER, T. THIENEL und R. E. GARFIELD: *Synergistic role of nitric oxide and progesterone during the establishment of pregnancy in the rat*. Hum Reprod, 14(2):542–52, 1999.
- [32] CLEMMONS, D. R.: *Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions*. Mol Cell Endocrinol, 140(1-2):19–24, 1998.
- [33] COAD, J. und M. DUNSTALL: *Anatomie und Physiologie für die Geburtshilfe*. Urban und Fischer, 2007.
- [34] CONRAD, K. P., M. VILL, P. G. MCGUIRE, W. G. DAIL und A. K. DAVIS: *Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi*. FASEB J, 7(13):1269–76, 1993.
- [35] COULTER, C. L. und V. K. HAN: *The pattern of expression of insulin-like growth factor (IGF). IGF-I receptor and IGF binding protein (IGFBP) mRNAs in the rhesus monkey placenta suggests a paracrine mode of IGF-IGFBP interaction in placental development*. Placenta, 17(7):451–60, 1996.
- [36] CRITCHLEY, H. O., R. M. BRENNER, T. A. HENDERSON, K. WILLIAMS, N. R. NAYAK, O. D. SLAYDEN, M. R. MILLAR und P. T. SAUNDERS: *Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium*. J Clin Endocr Metab, 86(3):1370–8, 2001.
- [37] CUI, K. H. und C. D. MATTHEWS: *Anatomy of adult female common marmoset (Callithrix jacchus) reproductive system*. J Anat, 185(3):481–486, 1994.
- [38] CUNHA-FILHO, J. S. L., N. A. LEMOS, F. M. FREITAS, K. KIEFER, M. FALLER und E. P. PASSOS: *Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis*. Hum Reprod, 18(2):423–8, 2003.
- [39] DAHLMAN-WRIGHT, K., V. CAVAILLES, S. A. FUQUA, V. C. JORDAN, J. A. KATZENELLENBOGEN, K. S. KORACH, A. MAGGI, M. MURAMATSU, M. G. PARKER und J.-A. GUSTAFSSON: *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors*. Pharmacol Rev, 58(4):773–81, 2006.
- [40] DÖCKE, F.: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer, Jena, 3. Aufl., 1994.
- [41] DIXIT, V. D. und N. PARVIZI: *Nitric oxide and the control of reproduction*. Anim Reprod Sci, 65(1-2):1–16, 2001.
- [42] EINSPANIER, A. und J. K. HODGES: *LH- and chorionic gonadotrophin-stimulated progesterone release in vitro by intact luteal tissue of the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. J Endocrinol, 141(3):403–9, 1994.
- [43] EINSPANIER, A., R. IVELL, G. RUNE und J. K. HODGES: *Oxytocin gene expression and oxytocin immunoactivity in the ovary of the common marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. Biol Reprod, 50(6):1216–1222, 1994.
- [44] EINSPANIER, A., A. JURDZINSKI und J. K. HODGES: *A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. Biol Reprod, 57(1):16–26, 1997.
- [45] EINSPANIER, A., K. LIEDER, A. BRUNS, B. HUSEN, H. THOLE und C. SIMON: *Induction of endometriosis in the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. Mol Hum Reprod, 12(5):291–299, 2006.
-

- 
- [46] EINSPANIER, A., K. LIEDER, R. EINSPANIER und B. HUSEN: *The common marmoset monkey as a model for implantation and early pregnancy research*. *Methods Mol Med*, 121:111–121, 2006.
- [47] EINSPANIER, A., K. LIEDER, B. HUSEN, K. EBERT, S. LIER, R. EINSPANIER, E. UNEMORI und M. KEMPER: *Relaxin supports implantation and early pregnancy in the marmoset monkey*. *Ann NY Acad Sci*, 1160:140–146, 2009.
- [48] EINSPANIER, A., R. NUBBEMEYER, S. SCHLOTE, M. SCHUMACHER, R. IVELL, K. FUHRMANN und A. MARTEN: *Relaxin in the marmoset monkey: secretion pattern in the ovarian cycle and early pregnancy*. *Biol Reprod*, 61(2):512–520, 1999.
- [49] EINSPANIER, A., M. R. ZARREH-HOSHYARI-KHAH, M. BALVERS, L. KERR, K. FUHRMANN und R. IVELL: *Local relaxin biosynthesis in the ovary and uterus through the oestrous cycle and early pregnancy in the female marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. *Hum Reprod*, 12(6):1325–1337, 1997.
- [50] ENDERS, A. C.: *Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human*. *Semin Reprod Med*, 18(3):255–263, 2000.
- [51] ENDERS, A. C. und A. LOPATA: *Implantation in the marmoset monkey: expansion of the early implantation site*. *Anat Rec*, 256(3):279–299, 1999.
- [52] ENMARK, E., M. PELTO-HUIKKO, K. GRANDIEN, S. LAGERCRANTZ, J. LAGERCRANTZ, G. FRIED, M. NORDENSKJOLD und J. A. GUSTAFSSON: *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. *J Clin Endocr Metab*, 82(12):4258–65, 1997.
- [53] FALLERT-MÜLLER, A. (Hrsg.): *Lexikon der Biochemie*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2000.
- [54] FAZLEABAS, A. T., K. M. DONNELLY, S. HILD-PETITO, H. M. HAUSERMANN und H. G. VERHAGE: *Secretory proteins of the baboon (Papio anubis) endometrium: regulation during the menstrual cycle and early pregnancy*. *Hum Reprod Update*, 3(6):553–559, 1997.
- [55] FAZLEABAS, A. T., R. C. JAFFE, H. G. VERHAGE, G. WAITES und S. C. BELL: *An insulin-like growth factor-binding protein in the baboon (Papio anubis) endometrium: synthesis, immunocytochemical localization, and hormonal regulation*. *Endocrinology*, 124(5):2321–9, 1989.
- [56] FIRTH, S. M. und R. C. BAXTER: *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins*. *Endocr Rev*, 23(6):824–54, 2002.
- [57] FITZPATRICK, R., O. M. CASEY, D. MORRIS, T. SMITH, R. POWELL und J. M. SREENAN: *Postmortem stability of RNA isolated from bovine reproductive tissues*. *Biochim Biophys Acta*, 1574(1):10–4, 2002.
- [58] FOWLER, D. J., K. H. NICOLAIDES und J. P. MIELL: *Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract*. *Hum Reprod Update*, 6(5):495–504, 2000.
- [59] FRASER, H. und S. LUNN: *Nonhuman primates and female reproductive medicine*. In: WEINBAUER, G. und R. KORTE (Hrsg.): *Reproduction in nonhuman primates: A model system for human reproductive physiology and toxicology*, S. 27–59. Waxmann, Münster, 1999.
-

- 
- [60] FUJIMOTO, J., Y. NAKAGAWA, H. TOYOKI, H. SAKAGUCHI, E. SATO und T. TAMAYA: *Estrogen-related receptor expression in placenta throughout gestation*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 94(1-3):67–69, 2005.
- [61] FULTON, D., J. P. GRATTON und W. C. SESSA: *Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?*. J Pharmacol Exp Ther, 299(3):818–24, 2001.
- [62] GABLER, C., A. PLATH-GABLER, A. EINSPANIER und R. EINSPANIER: *Insulin-like and fibroblast growth factors and their receptors are differentially expressed in the oviducts of the common marmoset monkey (Callithrix jacchus) during the ovulatory cycle*. Biol Reprod, 58(6):1451–7, 1998.
- [63] GARVEY, E. P., J. V. TUTTLE, K. COVINGTON, B. M. MERRILL, E. R. WOOD, S. A. BAYLIS und I. G. CHARLES: *Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta*. Arch Biochem Biophys, 311(2):235–41, 1994.
- [64] GAUGHAN, J.: *National Center for Biotechnology Information GenBank: C.jacchus mRNA for estrogen receptor beta; Accession number Y09372*, 1996.
- [65] GEISSMANN, T.: *Vergleichende Primatologie*. Springer, Berlin, 2003.
- [66] GELLER, D. A., C. J. LOWENSTEIN, R. A. SHAPIRO, A. K. NUSSLER, M. D. SILVIO, S. C. WANG, D. K. NAKAYAMA, R. L. SIMMONS, S. H. SNYDER und T. R. BILLIAR: *Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes*. P Natl Acad Sci USA, 90(8):3491–5, 1993.
- [67] GIBSON, J. M., J. D. APLIN, A. WHITE und M. WESTWOOD: *Regulation of IGF bioavailability in pregnancy*. Mol Hum Reprod, 7(1):79–87, 2001.
- [68] GILCHRIST, R. B., P. L. NAYUDU und J. K. HODGES: *Maturation, Fertilization, and Development of Marmoset Monkey Oocytes In Vitro*. Biol Reprod, 56:238–246, 1997.
- [69] GIUDICE, L. C.: *Endometrium*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 1, S. 1067–1078. Academic Press, San Diego, 1998.
- [70] GIUDICE, L. C. und J. C. IRWIN: *Roles of the insulinlike growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface*. Semin Reprod Endocrinol, 17(1):13–21, 1999.
- [71] GIUDICE, L. C., S. P. MARK und J. C. IRWIN: *Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface*. J Reprod Immunol, 39(1-2):133–48, 1998.
- [72] GOUGE, R. C., P. MARSHBURN, B. E. GORDON, W. NUNLEY und Y. M. HUET-HUDSON: *Nitric oxide as a regulator of embryonic development*. Biol Reprod, 58(4):875–9, 1998.
- [73] GOUSTIN, A. S., E. B. LEOF, G. D. SHIPLEY und H. L. MOSES: *Growth factors and cancer*. Cancer Res, 46(3):1015–29, 1986.
- [74] GRAINGER, D. A.: *Uterus, Human*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 4, S. 942–950. Academic Press, San Diego, 1998.
-

- 
- [75] GRAY, A., A. W. TAM, T. J. DULL, J. HAYFLICK, J. PINTAR, W. K. CAVENEE, A. KOUFOS und A. ULLRICH: *Tissue-specific and developmentally regulated transcription of the insulin-like growth factor 2 gene*. DNA, 6(4):283–95, 1987.
- [76] GROVES, C.: *Primate Taxonomy*. Smithsonian Series in Comparative Evolutionary Biology. Smithsonian, Washington, 1. Aufl., 2001.
- [77] GRZIMEK, B. und W. FIEDLER (Hrsg.): *Grzimeks Tierleben. Enzyklopädie des Tierreiches*, Bd. 10: Säugetiere. dtv, München, 1979.
- [78] HALL, A. V., H. ANTONIOU, Y. WANG, A. H. CHEUNG, A. M. ARBUS, S. L. OLSON, W. C. LU, C. L. KAU und P. A. MARSDEN: *Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1)*. J Biol Chem, 269(52):33082–90, 1994.
- [79] HAMMOND, J. M.: *IGF (Insulin-like Growth Factor)*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 2, S. 781–789. Academic Press, San Diego, 1998.
- [80] HAN, V. K., N. BASSETT, J. WALTON und J. R. CHALLIS: *The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface*. J Clin Endocr Metab, 81(7):2680–93, 1996.
- [81] HAN, V. K. und A. M. CARTER: *Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals*. Placenta, 21(4):289–305, 2000.
- [82] HAN, V. K., A. J. D'ERCOLE und P. K. LUND: *Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus*. Science, 236(4798):193–7, 1987.
- [83] HANDWERGER, S.: *Placental and Decidual Protein Hormones, Human*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 3, S. 855–863. Academic Press, San Diego, 1998.
- [84] HEARN, J. P.: *Reproduction in new world primates: New models in medical science*. MTP Press, Lancaster, 1983.
- [85] HEARN, J. P., S. F. LUNN, F. J. BURDEN und M. M. PILCHER: *Management of marmosets for biomedical research*. Lab Anim, 9(2):125–34, 1975.
- [86] HEGER, W. und D. NEUBERT: *Maintenance and Breeding of Callithrix jacchus in a Colony in Berlin*. In: NEUBERT, D., H.-J. MERKER und A. G. HENDRICKX (Hrsg.): *Non-Human Primates - Developmental Biology and Toxicology*, S. 53–67. Ueberreuter Wissenschaft, Wien, 1988.
- [87] HEISTERMANN, M., S. TARI und J. K. HODGES: *Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae*. J Reprod Fertil, 99(1):243–51, 1993.
- [88] HEWITT, S. C., B. J. DEROO, K. HANSEN, J. COLLINS, S. GRISSOM, C. A. AFSHARI und K. S. KORACH: *Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen*. Mol Endocrinol, 17(10):2070–83, 2003.
- [89] HEWITT, S. C., E. H. GOULDING, E. M. EDDY und K. S. KORACH: *Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent*. Biol Reprod, 67(4):1268–77, 2002.
-

- 
- [90] HILL, D. J., D. R. CLEMMONS, S. C. RILEY, N. BASSETT und J. R. CHALLIS: *Immunohistochemical localization of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins -1, -2 and -3 in human placenta and fetal membranes*. *Placenta*, 14(1):1–12, 1993.
- [91] HILLS, F. A., L. K. GUNN, P. HARDIMAN, S. THAMARATNAM und T. CHARD: *IGFBP-1 in the placenta, membranes and fetal circulation: levels at term and preterm delivery*. *Early Hum Dev*, 44(1):71–6, 1996.
- [92] HODGES, J. K.: *The Detection of Ovulation and Timing of Pregnancy*. In: NEUBERT, D., H.-J. MERKER und A. G. HENDRICKX (Hrsg.): *Non-Human Primates - Developmental Biology and Toxicology*, S. 83–90. Ueberreuter Wissenschaft, Wien, 1988.
- [93] HOLT, W. V. und H. D. MOORE: *Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (Callithrix jacchus)*. *J Anat*, 138 ( Pt 1):175–88, 1984.
- [94] HWA, V., Y. OH und R. G. ROSENFELD: *The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily*. *Endocr Rev*, 20(6):761–87, 1999.
- [95] IMAKAWA, K., K. T. CHANG und R. K. CHRISTENSON: *Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation*. *J Reprod Develop*, 50(2):155–169, 2004.
- [96] INIGUEZ, G., C. A. GONZÁLEZ, F. ARGANDONA, E. KAKARIEKA, M. C. JOHNSON und F. CAS-SORLA: *Expression and protein content of IGF-I and IGF-I receptor in placentas from small, adequate and large for gestational age newborns*. *Horm Res Paediatr*, 73(5):320–7, 2010.
- [97] IRWIN, J. C. und L. C. GIUDICE: *Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures*. *Growth Horm IGF Res*, 8(1):21–31, 1998.
- [98] IRWIN, J. C., L. F. SUEN, G. H. FAESSEN, R. M. POPOVICI und L. C. GIUDICE: *Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua:trophoblast interface during human implantation*. *J Clin Endocr Metab*, 86(5):2060–4, 2001.
- [99] JANSSENS, S. P., A. SHIMOUCI, T. QUERTERMOUS, D. B. BLOCH und K. D. BLOCH: *Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase*. *J Biol Chem*, 267(21):14519–22, 1992.
- [100] JONES, J. I. und D. R. CLEMMONS: *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. *Endocr Rev*, 16(1):3–34, 1995.
- [101] KAISERMAN-ABRAMOF, I. R. und H. A. PADYKULA: *Ultrastructural epithelial zonation of the primate endometrium (rhesus monkey)*. *Am J Anat*, 184(1):13–30, 1989.
- [102] KAO, L. C., S. TULAC, S. LOBO, B. IMANI, J. P. YANG, A. GERMAYER, K. OSTEN, R. N. TAYLOR, B. A. LESSEY und L. C. GIUDICE: *Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation*. *Endocrinology*, 143(6):2119–2138, 2002.
-

- 
- [103] KHORRAM, O., M. GARTHWAITE und R. R. MAGNESS: *Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women*. J Clin Endocr Metab, 84(6):2226–32, 1999.
- [104] KILEN, S. M. und N. B. SCHWARTZ: *Estrous Cycle*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 2, S. 127–136. Academic Press, San Diego, 1998.
- [105] KÜTTLER, T.: *Kurzlehrbuch Allgemeine Pharmakologie und Toxokologie*, Bd. 18, Kap. Eingriffe in Sekretion und Wirkung von Sexualhormonen, S. 415–437. Urban & Fischer, München, 2002.
- [106] KUIPER, G. G., E. ENMARK, M. PELTO-HUIKKO, S. NILSSON und J. A. GUSTAFSSON: *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. P Natl Acad Sci USA, 93(12):5925–30, 1996.
- [107] LECCE, G., G. MEDURI, M. ANCELIN, C. BERGERON und M. PERROT-APPLANAT: *Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells*. J Clin Endocr Metab, 86(3):1379–86, 2001.
- [108] LEE, K. Y. und F. J. DEMAYO: *Animal models of implantation*. Reproduction, 128(6):679–695, 2004.
- [109] LEONHARDT, H.: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Georg Thieme, Stuttgart, 8. Aufl., 1990.
- [110] LEROITH, D., R. BASERGA, L. HELMAN und C. T. J. ROBERTS: *Insulin-like growth factors and cancer*. Ann Intern Med, 122(1):54–9, 1995.
- [111] LESSEY, B. A., A. P. KILLAM, D. A. METZGER, A. F. HANEY, G. L. GREENE und K. S. J. MCCARTY: *Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle*. J Clin Endocr Metab, 67(2):334–40, 1988.
- [112] LEVIN, E. R.: *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. Mol Endocrinol, 19(8):1951–9, 2005.
- [113] LÖFFLER, G., P. E. PETRIDES und P. C. HEINRICH (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 233 Tabellen*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 8. Aufl., 2007.
- [114] LI, C., M. LEVITZ, G. B. HUBBARD, S. L. JENKINS, V. HAN, R. J. J. FERRY, T. J. McDONALD, P. W. NATHANIELSZ und N. E. SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH: *The IGF axis in baboon pregnancy: placental and systemic responses to feeding 70ad libitum diet*. Placenta, 28(11-12):1200–10, 2007.
- [115] LIAO, Q. P., I. A. BUHIMSCHI, G. SAADE, K. CHWALISZ und R. E. GARFIELD: *Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post-partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones*. Hum Reprod, 11(12):2777–84, 1996.
- [116] LIEBICH, H.-G.: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 11 Tabellen*. Schattauer, Stuttgart, 4. Aufl., 2004.
- [117] LINDZEY, J. und K. S. KORACH: *Estrogen Action on the Female Reproductive Tract*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 2, S. 79–86. Academic Press, San Diego, 1998.
- [118] LIU, Q. und S. GROSS: *Binding sites of nitric oxide synthases*. Method Enzymol, 268:311–24, 1996.
-

- 
- [119] LOWENSTEIN, C. J., E. W. ALLEY, P. RAVAL, A. M. SNOWMAN, S. H. SNYDER, S. W. RUSSELL und W. J. MURPHY: *Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide*. P Natl Acad Sci USA, 90(20):9730–4, 1993.
- [120] LOWENSTEIN, C. J., C. S. GLATT, D. S. BREDT und S. H. SNYDER: *Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme*. P Natl Acad Sci USA, 89(15):6711–5, 1992.
- [121] LOWENSTEIN, C. J. und E. PADALCO: *iNOS (NOS2) at a glance*. J Cell Sci, 117(Pt 14):2865–2867, 2004.
- [122] LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER: *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, Kap. S: Hormone und hormonell wirksame Pharmaka, S. 308–320. Parey, Berlin, 5. Aufl., 2002.
- [123] LUNN, S. F.: *The Relative Merits of the Marmoset as a Model in Reproductive Medicine*. In: PRYCE, C., L. SCOTT und C. SCHNELL (Hrsg.): *Marmosets and Tamarins in Biological and Biomedical Research, Workshop*, S. 192–207, Salisbury, 1997. DSSD Imagery.
- [124] MAKKER, A. und M. M. SINGH: *Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility*. Med Res Rev, 26(6):699–746, 2006.
- [125] MARSDEN, P. A., K. T. SCHAPPERT, H. S. CHEN, M. FLOWERS, C. L. SUNDELL, J. N. WILCOX, S. LAMAS und T. MICHEL: *Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase*. FEBS Lett, 307(3):287–93, 1992.
- [126] MATSUZAKI, S., T. FUKAYA, T. SUZUKI, T. MURAKAMI, H. SASANO und A. YAJIMA: *Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle*. Mol Hum Reprod, 5(6):559–64, 1999.
- [127] MERKER, H.-J., D. BREMER, W. CSATO, W. HEGER und R. GOSSRAU: *Development of the Marmoset Placenta*. In: NEUBERT, D., H.-J. MERKER und A. G. HENDRICKX (Hrsg.): *Non-Human Primates - Developmental Biology and Toxicology*, S. 245–271. Ueberreuter Wissenschaft, Wien, 1988.
- [128] MERKER, H.-J., K. SAMES, W. CSATO, W. HEGER und D. NEUBERT: *The Embryology of Callithrix jacchus*. In: NEUBERT, D., H.-J. MERKER und A. G. HENDRICKX (Hrsg.): *Non-Human Primates - Developmental Biology and Toxicology*, S. 217–239. Ueberreuter Wissenschaft, Wien, 1988.
- [129] MERTENS, H. J., M. J. HEINEMAN, P. H. THEUNISSEN, F. H. DE JONG und J. L. EVERS: *Androgen, estrogen and progesterone receptor expression in the human uterus during the menstrual cycle*. Eur J Obstet Gyn R B, 98(1):58–65, 2001.
- [130] MOORE, H. D., S. GEMS und J. P. HEARN: *Early implantation stages in the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. Am J Anat, 172(4):265–278, 1985.
- [131] MOSSELMAN, S., J. POLMAN und R. DIJKEMA: *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett, 392(1):49–53, 1996.
- [132] MYATT, L., D. E. BROCKMAN, A. L. EIS und J. S. POLLOCK: *Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta*. Placenta, 14(5):487–95, 1993.
-

- 
- [133] NARKAR, M., S. KHOLKUTE, S. CHITLANGE und T. NANDEDKAR: *Expression of steroid hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium*. Mol Cell Endocrinol, 246(1-2):107–13, 2006.
- [134] NARKAR, M., S. KHOLKUTE und T. NANDEDKAR: *Hormonal regulation of apoptosis in the endometrium of common marmosets (Callithrix jacchus)*. Theriogenology, 66(5):1194–1209, 2006.
- [135] NICKEL, R., A. SCHUMMER und E. SEIFERLE: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Parey, Berlin, 8. Aufl., 1999.
- [136] NIEMITZ, C.: *Review on the Phylogenetic Relationships among Primates with Special Reference to Callithrichidae*. In: NEUBERT, D., H.-J. MERKER und A. G. HENDRICKX (Hrsg.): *Non-Human Primates - Developmental Biology and Toxicology*, S. 3–15. Ueberreuter Wissenschaft, Wien, 1988.
- [137] NIKLAUS, A. L., C. R. MURPHY und A. LOPATA: *Characteristics of the uterine luminal surface epithelium at preovulatory and preimplantation stages in the marmoset monkey*. Anat Rec, 264(1):82–92, 2001.
- [138] NUBBEMEYER, R., M. HEISTERMANN, A. K. OERKE und J. K. HODGES: *Reproductive efficiency in the common marmoset (Callithrix jacchus): a longitudinal study from ovulation to birth monitored by ultrasonography*. J Med Primatol, 26(3):139–46, 1997.
- [139] OGDEN, C. L., C. D. FRYAR, M. D. CARROLL und K. M. FLEGAL: *Mean Body Weight, Height, and Body Mass Index, United States 1960-2002*. Advance Data from Vital and Health Statistics, U.S. Department of Health and Human Services, Number 347, October 2004.
- [140] ORTIZ, P. A. und J. L. GARVIN: *Trafficking and activation of eNOS in epithelial cells*. Acta physiol Scand, 179(2):107–114, 2003.
- [141] OTA, H., S. IGARASHI, N. OYAMA, Y. SUZUKI und T. TANAKA: *Optimal levels of nitric oxide are crucial for implantation in mice*. Reprod Fert Develop, 11(3):183–8, 1999.
- [142] PADYKULA, H. A., L. G. COLES, J. A. MCCrackEN, N. W. J. KING, C. LONGCOPE und I. R. KAISERMAN-ABRAMOF: *A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge*. Biol Reprod, 31(5):1103–18, 1984.
- [143] PANDA, K., R. J. ROSENFELD, S. GHOSH, A. L. MEADE, E. D. GETZOFF und D. J. STUEHR: *Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III*. J Biol Chem, 277(34):31020–30, 2002.
- [144] PELLETIER, G., V. LUU-THE, A. CHARBONNEAU und F. LABRIE: *Cellular localization of estrogen receptor beta messenger ribonucleic acid in cynomolgus monkey reproductive organs*. Biol Reprod, 61(5):1249–55, 1999.
- [145] PICKART, C. M. und M. J. EDDINS: *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 1695(1-3):55–72, 2004.
- [146] PLUMB, D. C.: *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. Nr. Ames. Blackwell, 6. Aufl., 2008.
-

- 
- [147] PRESS, M. F., N. A. NOUSEK-GOEBL, M. BUR und G. L. GREENE: *Estrogen receptor localization in the female genital tract*. Am J Pathol, 123(2):280–92, 1986.
- [148] PÖTZSCH, O. und D. EMMERLING: *Geburten und Kinderlosigkeit in Deutschland*. Statistisches Bundesamt, 2008.
- [149] PURCELL, T. L., R. GIVEN, K. CHWALISZ und R. E. GARFIELD: *Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse*. Mol Hum Reprod, 5(5):467–75, 1999.
- [150] QIU, X., X. SUN, A. CHRISTOW, B. STABI und K. GEMZELL-DANIELSSON: *The effect of mifepristone on the expression of insulin-like growth factor binding protein-1, prolactin and progesterone receptor mRNA and protein during the implantation phase in human endometrium*. Mol Hum Reprod, 8(11):998–1004, 2002.
- [151] RADOMSKI, M. W.: *Nitric oxide: biological mediator, modulator and effector*. Ann Med, 27(3):321–9, 1995.
- [152] RAMSAY, B., S. R. SOORANNA und M. R. JOHNSON: *Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast throughout pregnancy*. Obstet Gynecol, 87(2):249–53, 1996.
- [153] RASWEILER, J. J. und N. K. BADWAIK: *Discoidal Placenta*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, S. 890–902. Academic Press, San Diego, 1998.
- [154] REGAN, C. L.: *Pregnancy in Humans, Overview*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 3, S. 986–991. Academic Press, San Diego, 1998.
- [155] REY, J. M., P. PUJOL, H. DECHAUD, E. EDOUARD, B. HEDON und T. MAUDELONDE: *Expression of oestrogen receptor-alpha splicing variants and oestrogen receptor-beta in endometrium of infertile patients*. Mol Hum Reprod, 4(7):641–7, 1998.
- [156] RICHTER, J. und R. GÖTZE: *Tiergeburtshilfe*. Parey, Berlin, 4. Auflage. Aufl., 1993.
- [157] ROHEN, J. W. und E. LÜTJEN-DRECOLL: *Funktionelle Histologie: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten*. Schattauer, Stuttgart, 4. Aufl., 2000.
- [158] ROSSMANITH, W. G., U. HOFFMEISTER, S. WOLFAHRT, B. KLEINE, M. MCLEAN, R. A. JACOBS und A. B. GROSSMAN: *Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta*. Mol Hum Reprod, 5(5):487–94, 1999.
- [159] ROWE, N.: *The pictorial guide to the living primates*. Pogonias Press, East Hampton, NY, 1. Aufl., 1996.
- [160] RÜSSE, I. und F. SINOWATZ: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey, Berlin, 2. Aufl., 1998.
- [161] RUNE, G. M., U. LEUCHTENBERG, C. SCHROTER-KERMANI und H. J. MERKER: *Zonal differentiation of the marmoset (Callithrix jacchus) endometrium*. J Anat, 181 ( Pt 2):301–312, 1992.
- [162] RUTHERFORD, J. N., A. EKLUND und S. TARDIF: *Placental insulin-like growth factor II (IGF-II) and its relation to litter size in the common marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. Am J Primatol, 71(12):969–75, 2009.
-

- 
- [163] SANGER, F., S. NICKLEN und A. R. COULSON: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Biotechnology*, 24:104–108, 1977.
- [164] SCHIESSL, B., I. MYLONAS, P. HANTSCHMANN, C. KUHN, S. SCHULZE, S. KUNZE, K. FRIESE und U. JESCHKE: *Expression of endothelial NO synthase, inducible NO synthase, and estrogen receptors alpha and beta in placental tissue of normal, preeclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies*. *J Histochem Cytochem*, 53(12):1441–9, 2005.
- [165] SCHIESSL, B., I. MYLONAS, C. KUHN, S. KUNZE, S. SCHULZE, K. FRIESE und U. JESCHKE: *Expression of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta and placental endothelial and inducible NO synthase in intrauterine growth-restricted and normal placentas*. *Arch Med Res*, 37(8):967–75, 2006.
- [166] SCHLAFKE, S. und A. C. ENDERS: *Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation*. *Biol Reprod*, 12(1):41–65, 1975.
- [167] SENGER, P. L.: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions, Pullman, 2. Aufl., 2005.
- [168] SESSA, W. C.: *The nitric oxide synthase family of proteins*. *J Vasc Res*, 31(3):131–43, 1994.
- [169] SESSA, W. C., J. K. HARRISON, C. M. BARBER, D. ZENG, M. E. DURIEUX, D. D. D'ANGELO, K. R. LYNCH und M. J. PEACH: *Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase*. *J Biol Chem*, 267(22):15274–6, 1992.
- [170] SHEIKH, S., P. SATOSKAR und D. BHARTIYA: *Expression of insulin-like growth factor-I and placental growth hormone mRNA in placentae: a comparison between normal and intrauterine growth retardation pregnancies*. *Mol Hum Reprod*, 7(3):287–92, 2001.
- [171] SHI, L., S. Q. SHI, R. L. GIVEN, H. H. VON und R. E. GARFIELD: *Synergistic effects of antiprogesterins and iNOS or aromatase inhibitors on establishment and maintenance of pregnancy*. *Steroids*, 68(10-13):1077–1084, 2003.
- [172] SILBERNAGL, S. und A. DESPOPOULOS: *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme, Stuttgart, 5. Aufl., 2001.
- [173] SILVESTRI, A. und H. M. FRASER: *Oestrogen and progesterone receptors in the marmoset endometrium: changes during the ovulatory cycle, early pregnancy and after inhibition of vascular endothelial growth factor, GnRH or ovariectomy*. *Reproduction*, 134(2):341–53, 2007.
- [174] SIMON, C.: *Die hormonelle Induktion der zervikalen Erweichung beim Weißbüschelaffen (Callithrix jacchus)*. Doktorarbeit, Universität Leipzig, Leipzig, 2005.
- [175] SMITH, C. A., H. D. MOORE und J. P. HEARN: *The ultrastructure of early implantation in the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. *Anat Embryol*, 175(3):399–410, 1987.
- [176] SMITH, C. L.: *Estrogens, Overview*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 2, S. 119–126. Academic Press, San Diego, 1998.
- [177] SMUCNY, D. A., D. H. ABBOTT, K. G. MANSFIELD, N. J. SCHULTZ-DARKEN, M. E. YAMAMOTO, A. I. ALENCAR und S. D. TARDIF: *Reproductive output, maternal age, and survivorship in captive common marmoset females (Callithrix jacchus)*. *Am J Primatol*, 64(1):107–21, 2004.
-

- 
- [178] SNIJDERS, M. P., A. F. DE GOEIJ, M. J. D.-T. BAERTS, M. J. ROUSCH, J. KOUDSTAAL und F. T. BOSMAN: *Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause*. J Reprod Fertil, 94(2):363–71, 1992.
- [179] STATISTISCHES BUNDESAMT: *Alter der Mutter*. [http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Bevoelkerung/GeburtenSterbefaelle/Tabellen/Content75/GeburtenMutterBiologisches\\_20Alter](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Bevoelkerung/GeburtenSterbefaelle/Tabellen/Content75/GeburtenMutterBiologisches_20Alter). abgerufen am 21.03.2011.
- [180] STATISTISCHES BUNDESAMT: *Lebenserwartung in Deutschland*. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Bevoelkerung/GeburtenSterbefaelle/Tabellen/Content50/LebenserwartungDeutschland>. abgerufen am 21.03.2011.
- [181] STREET, M. E., P. SEGHINI, S. FIENI, M. A. ZIVERI, C. VOLTA, D. MARTORANA, I. VIANI, D. GRAMELLINI und S. BERNASCONI: *Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls*. Eur J Endocrinol, 155(4):567–74, 2006.
- [182] STROWITZKI, T., G. A. SINGER, I. RETTIG und E. CAPP: *Characterization of receptors for insulin-like growth factor type I on cultured human endometrial stromal cells: downregulation by progesterone*. Gynecol Endocrinol, 10(4):229–240, 1996.
- [183] STUEHR, D. J., H. J. CHO, N. S. KWON, M. F. WEISE und C. F. NATHAN: *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein*. P Natl Acad Sci USA, 88(17):7773–7, 1991.
- [184] STUEHR, D. J. und M. IKEDA-SAITO: *Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like hemeproteins that contain a flavin semiquinone radical*. J Biol Chem, 267(29):20547–50, 1992.
- [185] SUMMERS, P. M., C. J. WENNINK und J. K. HODGES: *Cloprostenol-induced luteolysis in the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. J Reprod Fertil, 73(1):133–8, 1985.
- [186] SWINDLER, D. R. und C. D. WOOD: *Atlas of Primate Gross Anatomy: Baboon, Chimpanzee, and Man*. Krieger, Malabar, 1982.
- [187] TAGUCHI, M., J. ALFER, K. CHWALISZ, H. M. BEIER und I. CLASSEN-LINKE: *Endothelial nitric oxide synthase is differently expressed in human endometrial vessels during the menstrual cycle*. Mol Hum Reprod, 6(2):185–90, 2000.
- [188] TALAVERA, F., R. K. REYNOLDS, J. A. ROBERTS und K. M. MENON: *Insulin-like growth factor I receptors in normal and neoplastic human endometrium*. Cancer Res, 50(10):3019–24, 1990.
- [189] TAMAYA, T., T. MURAKAMI und H. OKADA: *Concentrations of steroid receptors in normal human endometrium in relation to the day of the menstrual cycle*. Acta Obstet Gyn Scand, 65(3):195–8, 1986.
- [190] TARDIF, S. D., D. A. SMUCNY, D. H. ABBOTT, K. MANSFIELD, N. SCHULTZ-DARKEN und M. E. YAMAMOTO: *Reproduction in captive common marmosets (Callithrix jacchus)*. Comp Med, 53(4):364–8, 2003.
-

- 
- [191] TELFER, J. F., G. A. IRVINE, G. KOHNEN, S. CAMPBELL und I. T. CAMERON: *Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium*. Mol Hum Reprod, 3(1):69–75, 1997.
- [192] TELFER, J. F., F. LYALL, J. E. NORMAN und I. T. CAMERON: *Identification of nitric oxide synthase in human uterus*. Hum Reprod, 10(1):19–23, 1995.
- [193] THELLIN, O., W. ZORZI, B. LAKAYE, B. D. BORMAN, B. COUMANS, G. HENNEN, T. GRISAR, A. IGOUT und E. HEINEN: *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 75(2-3):291–5, 1999.
- [194] THOMSON, A. J., J. F. TELFER, G. KOHNEN, A. YOUNG, I. T. CAMERON, I. A. GREER und J. E. NORMAN: *Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition*. Hum Reprod, 12(11):2546–52, 1997.
- [195] TORII, R., H. KOIZUMI, Y. TANIOKA, T. INABA und J. MORI: *Serum LH, Progesterone and Estradiol-17beta Levels throughout the Ovarian Cycle, During the early Stage of Pregnancy and after the parturition and the Abortion in the Common Marmoset, Callithrix jacchus*. Primates, 28(2):229–238, 1987.
- [196] TORII, R., H. N. H. KOIZUMI und YOSHIKUNI TANIOKA: *Serum chorionic gonadotropin, progesterone, and estradiol-17 beta levels during pregnancy in the common marmoset, Callithrix*. Primates, 30(2):207–215, 1989.
- [197] TOXIKOLOGIE, U. Z. VETPHARM INFORMATIONSSYSTEM CLINIPHARM CLINITOX; INSTITUT FÜR VETERINÄRPHARMAKOLOGIE UND: *HCG*, Januar 2011.
- [198] TREMBLAY, G. B., A. TREMBLAY, N. G. COPELAND, D. J. GILBERT, N. A. JENKINS, F. LABRIE und V. GIGUERE: *Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta*. Mol Endocrinol, 11(3):353–65, 1997.
- [199] TRICARICO, C., P. PINZANI, S. BIANCHI, M. PAGLIERANI, V. DISTANTE, M. PAZZAGLI, S. A. BUSTIN und C. ORLANDO: *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies*. Anal Biochem, 309(2):293–300, 2002.
- [200] TSCHUGGUEL, W., C. SCHNEEBERGER und ET AL: *Die Rolle des Stickstoffmonoxids bei der Reproduktion*. Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau, 38(1):44–46, 1998.
- [201] TSCHUGGUEL, W., C. SCHNEEBERGER, G. UNFRIED, G. BRAUTIGAM, F. STONEK, F. WIESER, E. VYTISKA-BINSTORFER, K. CZERWENKA, W. WENINGER, A. KAIDER, W. BURSCH, H. BREITSCHOPF und J. C. HUBER: *Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation*. Biol Reprod, 60(2):297–304, 1999.
- [202] TSCHUGGUEL, W., C. SCHNEEBERGER, G. UNFRIED, K. CZERWENKA, W. WENINGER, M. MILDNER, J. R. BISHOP und J. C. HUBER: *Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium*. Hum Reprod, 13(2):436–44, 1998.
- [203] TSENG, L., J. ZHANG und M. S. GOLIGORSKY: *Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glands of human endometrium*. J Soc Gynecol Invest, 3(1):33–8, 1996.
-

- 
- [204] UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION: *World Population Prospects: The 2008 Revision*. New York, 2009.
- [205] VANDESOMPELE, J., K. D. PRETER, F. PATTYN, B. POPPE, N. V. ROY, A. D. PAEPE und F. SPELEMAN: *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 3(7):RESEARCH0034, 2002.
- [206] VOORHIS, B. J. V., K. MOORE, P. J. STRIJBOS, S. NELSON, S. A. BAYLIS, D. GRZYBICKI und C. P. WEINER: *Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo*. *J Clin Invest*, 96(6):2719–26, 1995.
- [207] WADSWORTH, P. F., D. A. BUDGETT und M. L. FORSTER: *Organ weight data in juvenile and adult marmosets (Callithrix jacchus)*. *Lab Anim*, 15(4):385–8, 1981.
- [208] WANG, H. S. und T. CHARD: *IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function*. *J Endocrinol*, 161(1):1–13, 1999.
- [209] WANG, X., D. A. BARBER, D. A. LEWIS, C. G. MCGREGOR, G. C. SIECK, L. A. FITZPATRICK und V. M. MILLER: *Gender and transcriptional regulation of NO synthase and ET-1 in porcine aortic endothelial cells*. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 2):H1962–7, 1997.
- [210] WEIHUA, Z., S. SAJI, S. MAKINEN, G. CHENG, E. V. JENSEN, M. WARNER und J. A. GUSTAFSSON: *Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus*. *P Natl Acad Sci USA*, 97(11):5936–41, 2000.
- [211] WEINER, C. P. und L. P. THOMPSON: *Nitric oxide and pregnancy*. *Semin Perinatol*, 21(5):367–380, 1997.
- [212] WHITE, K. A. und M. A. MARLETTA: *Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein*. *Biochemistry*, 31(29):6627–31, 1992.
- [213] WIEDMANN, C., H. L. SCHULZ und B. H. F. WEBER: *Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung*. *BIOspektrum*, 10(1):99–102, 2004.
- [214] WISLOCKI, G. B.: *Placentation in the Marmoset (Oedipomidas geoffroyi), with remarks on twinning in monkeys*. *Anat Rec*, 52(4):381–399, 1932.
- [215] WISLOCKI, G. B.: *Observations on Twinning in Marmosets*. *Am J Anat*, 64(3):445–483, 1939.
- [216] WU, J. J., E. GEIMONEN und J. ANDERSEN: *Increased expression of estrogen receptor beta in human uterine smooth muscle at term*. *Eur J Endocrinol*, 142(1):92–9, 2000.
- [217] WULFF, C., M. WEIGAND, R. KREIENBERG und H. M. FRASER: *Angiogenesis during primate placentation in health and disease*. *Reproduction*, 126(5):569–577, 2003.
- [218] XIE, K., S. HUANG, Z. DONG, S. H. JUANG, Y. WANG und I. J. FIDLER: *Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene*. *J Natl Cancer I*, 89(6):421–7, 1997.
- [219] YING, S.-Y. und Z. ZHANG: *Ovarian Hormones, Overview*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, Bd. 3, S. 578–582. Academic Press, San Diego, 1998.
-

- [220] YOSHIKI, N., T. KUBOTA und T. ASO: *Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early pregnant endometrium*. Mol Hum Reprod, 6(3):283–7, 2000.
- [221] YOSHINAGA, K.: *Estrogen Secretion, Regulation of*. In: KNOBIL, E. und J. D. NEILL (Hrsg.): *Encyclopedia of Reproduction*, S. 108–118. Academic Press, San Diego, 1998.
- [222] ZHOU, J., B. A. DSUPIN, L. C. GIUDICE und C. A. BONDY: *Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle*. J Clin Endocr Metab, 79(6):1723–34, 1994.
- [223] ZOLLERS, W. G. J., J. S. BABISCHKIN, G. J. PEPE und E. D. ALBRECHT: *Developmental regulation of placental insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein-1 and -2 messenger RNA expression during primate pregnancy*. Biol Reprod, 65(4):1208–14, 2001.
- [224] ZYGMUNT, M., D. M. MAZZUCA, J. WALTON und V. K. HAN: *Local fetal signal is not required for maintaining IGFBP gene expression in the human decidua: evidence from extrauterine pregnancies*. Mol Hum Reprod, 6(10):959–965, 2000.

## A Anhang

### A.1 18 S-rRNA

#### A.1.1 Nukleotid-Sequenz

AGG CGC GCA AAT TAC CCA CTC CCG ACC CGG GGA GGT AGT GAC GAA AAA TAA CAA TAC  
AGG ACT CTT TCG AGG CCC TGT AAT TGG AAT GAG TCC ACT TTA AAT CCT TTA ACG AGG ATC  
CAT TGG AGG GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATT CCA GCT CCA ATA GCG TAT  
ATT AAA GTT GCT GCA GTT AAA AAG CTC GTA GTT GGA TCT TGG GAG CGG GCG GGC GGT  
CCG CCG CGA GGC GAG CCA CCG CCC GTC CCC GCC CCT TGC CTC TCG GCG CCC CCT CGA  
TGC TCT TAG CTG AGT GTC

### A.2 Ubiquitin

#### A.2.1 Nukleotid-Sequenz

ATG CAG ATC TTT GTG AAG ACC CTC ACA GGC AAG ACC ATC ACC CTT GAG GTC GAG CCC  
AGT GAC ACC ATT GAG AAT GTC AAA GCC AAA ATT CAA GAC AAG GAG GGT ATC CCA CCT  
GAC CAG CAG CGT CTG ATA TTT GCC GGC AAA CAG CTA GAG GAT GGC CGC ACG CTC TCA  
GAC TAC AAC ATC CAG AAA GA

#### A.2.2 Aminosäuren-Sequenz

MQIFVKTLTG KTITLEVEPS DTIENVKAKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL EDGRTLSDYN IQK

### A.3 Östrogen-Rezeptor-alpha - ER- $\alpha$

#### A.3.1 Nukleotid-Sequenz

T TTG GAT TTG ACC CTC CAT GAT CAG GTC CAC CTT CTA GAA TGT GCC TGG CTA GAG ATC  
CTG ATG ATT GGT CTC GTC TGG CGC TCC ATG GAG CAC CCA GGG AAA CTC CTG TTT GCT CCT  
AAC TTG CTC TTG GAC AGG AAC CAG GGA AAA TGT GTA GAG GGC ATG GTG GAG ATC AA

#### A.3.2 Aminosäuren-Sequenz

LDLTLHDQVH LLECAWLEIL MIGLVWRSME HPGKLLFAPN LLLDRNQGKC VEGMVEI

## **A.4 Östrogen-Rezeptor-beta - ER- $\beta$**

### **A.4.1 Nukleotid-Sequenz**

GTG GAG CTC AGC CTG TTG GAC CAA GTG CGG CTC TTG GAG AGC TGC TGG TTG GAG GTG  
TTA ATG GTG GGG CTG ATG TGG CGC TCA ATT GAC CAC CCC GGC AAG CTC ATC TTT GCT CCA  
AAT CTC ATT CTG GAC AGG GAT GAG GGG AAA TGC GTA GAA GGA ATT CTG GAA GTC TTT  
GAC ATG CTC CTG GCA ACT ACT TCA AGG TTT CGA GAG TTG AAA CTC CAA CAC AAA GAG  
TAT CTC TGT GTC AAG GC

### **A.4.2 Aminosäuren-Sequenz**

VELSLLDQVR LLESCWLEVL MVGLMWRSID HPGKLIFAPN LILDRDEGKC VEGILEVFD  
M LLATTSRFRE LKLQHKEYLC VKA

## **A.5 eNOS - EMBL Acc. No. AM712437**

### **A.5.1 Nukleotid-Sequenz**

G AAG CAC CTG GAG AAT GAG CAG AAG GCC AGG GGG GGC TGC CCT GCA GAC TGG GCC TGG  
ATC GTG CCC CCC ATC TCA GGC AGC CTC ACT CCT GTC TTC CAT CAG GAG ATG GTC AAC TAT  
TTC CTG TCC CCT GCC TTC CGC TAC CAG

### **A.5.2 Aminosäuren-Sequenz**

KHLENEQKAR GGCPADWAWI VPPISGSLTP VFHQEMVNYF LSPAFRYQ

## **A.6 iNOS - EMBL Acc. No. AM712438**

### **A.6.1 Nukleotid-Sequenz**

GC CAA GGT CTG AGC TAC CTG CCA GGG GAG CAC CTC GGG GTT TGC CCA GGC AAC CAG  
CCA GCC CTG GTT CAA GGC ATC CTG GAG CGA GTG GTG GAC GGC CCT GAG CCC CAC CAG  
ACA GTG CGC CTG GAG GCC CTG GAT GAG AGT GGC AGC TAC TGG GTC AGA GAC AAG AGG  
CTG CCC CCC TGC TCA CTC AGC CAG GCA CT

### **A.6.2 Aminosäuren-Sequenz**

QGLSYLPGEH LGVCPGNQPA LVQGILERVV DGPEPHQTVR LEALDESGSY WVRDKRLPPC  
SLSQA

## A.7 IGF-1

### A.7.1 Nukleotid-Sequenz

TAT CTG GCC CTG TGC CTG CTC ACC TTC ACC AGC TCT GCC ACA GCT GGA CCG GAG ACG  
CTC TGC GGG GCT GAG CTG GTG GAT GCT CTC CAG TTC GTG TGT GGA GAA AGA GGC TTT  
TAT TTC AAC AAG CCC ACT GGG TAT GGC TCC AGC AGT CGG AGG GTG CCT CAG ACA GGC  
ATC GTG AAT GAG TGC TGC TTC CGG AGC TGT GAT CTG AGG AGG CTG GAG ATG TAC TGC

### A.7.2 Aminosäuren-Sequenz

YLALCLLTFT SSATAGPETL CGAELVDALQ FVCGERGFYF NKPTGYGSSS RRVPTGIVN  
ECCFRSCDLR RLEMYC

## A.8 IGF-2

### A.8.1 Nukleotid-Sequenz

GAC CGC GGC TTC TAC TTC AGC AGG CCC GCA AGC CGT GTG AGC CGT CGC AGC CGT GGC  
ATC GTC GAG GAG TGC TGC TTC CGC AGC TGC GAC CTG GCC CTC CTG GAG ACC TAC TGT  
GCC ACC CCC GCC AAG TCC GAG AGG GAC GTG TCG ACC TCT CCG ACC GTG CTT CCG GAC  
AAC TTC CCC AGA TAC CCC GTG GGC AAG TTC TTC

### A.8.2 Aminosäuren-Sequenz

AAYRPRETLC GGELVDTLQF VCGDRGFYFS RPASRVSRRS RGIVECCFR SCDLALLETY  
CATPAKSERD VSTSPTVLPD NFPRYPVGKF F

## A.9 IGF1-R

### A.9.1 Nukleotid-Sequenz

TTA AAA TGG CCA GAA CCT GAG AAT CCC AAT GGA TTG ATC CTA ATG TAT GAA ATA AAG TAC  
GGA GCA CAA GTT GAG GAT CAG CGG GAA TGT GTG TCC AGA CAG GAC TAC AGG AAG TAC  
GGA GGG GCC AAG CTA AAC CGG CTA AAC CCG GGG AAC TAC ACA GCC CGG ATT CAG GCC  
ACG TCT CTC TCT GGG AAT GGG TCG TGG ACA GAG CCT GTG TTC TTC TAT GTC CAG GCC  
AAA ACG GGA TAC GAA AAC TTC ATC CAT CTG ATC ATC GCT CTG CCC ATC GCC GTC CTG TTG  
ATC GTG GGA GGC TTG GTT ATA AT

### A.9.2 Aminosäuren-Sequenz

LKWPEPENPN GLILMYEIKY GAQVEDQREC VSRQDYRKYG GAKLNRLNPG NYTARIQATS  
LSGNQSWTEP VFFYVQAKTG YENF

## **A.10 IGFBP-1**

### **A.10.1 Nukleotid-Sequenz**

TC AAG AAG TGG AAG GAG CCC TGC CGA AGA GAA CTC TAC AGA GTC CTA GAT AAT TTA GCC  
AAG ATC GAG GAG TCA ACA GGA GAA CGA GTT TAC AGA TTT TAT CTG CCA AAC TGC AAC  
AAG AAT GGA TT

### **A.10.2 Aminosäuren-Sequenz**

KKWKEPCRRE LYRVLDNLAK IEESTGERVY RFYLPNCNKN G

## **A.11 IGFBP-2**

### **A.11.1 Nukleotid-Sequenz**

CAC CGG CAG ATG GGC AAG GGC AGC AAA CAT CAC CTT GGC GCG GAG GAG CCC AAG ATA  
CTG CGA CCA CCC CCT GCC AGG ACC CCC TGC CAG CAG GAG CTG GAC CAG GTC CTG GAG  
CGG ATC TCC ACC ATG CGC CTT C

### **A.11.2 Aminosäuren-Sequenz**

HRQMGKGSKH HLGAEHPKIL RPPPARTPCQ QELDQVLERI STMRL

## A.12 Vergleich der PCR-Produkte

Gen	Größe des Amplicons	EMBL Acc. No. der Vergleichssequenz	Spezies	Position des Amplicons	Homologie-Grad z. Vergleichssequenz
18 S-rRNA	305 bp	NR_003286.2	(h)	476 - 781 (1871)	100 %
		AB571241.1	(cj)	114 - 419 (1364)	100 %
Ubiquitin	191 bp	NM_003333.3	(h)	93 - 282 (2801)	97,8 %
		Z49056.1	(cj)	1 - 189 (189)	99,5 %
ER- $\alpha$	173 bp	NM_000125.3	(h)	1206 - 1379 (2879)	97,1 %
		XM_002747115.1	(cj)	1284 - 1457 (1984)	98,3 %
ER- $\beta$	247 bp	AF393816	(h)	Basen 1 - 134: 39005 - 39139 (65245)	94,8 %
				Basen 135 - 247: 46696 - 46809 (65245)	97,3 %
		Y09372.2	(cj)	1009 - 1256 (1651)	100 %
eNOS	145 bp	BC069465.1	(h)	1302 - 1446 (3679)	98,0 %
		XM_002807048.1	(cj)	1185 - 1329 (3411)	99,3 %
iNOS	199 bp	NM_000625.4	(h)	2549 - 2747 (4206)	93,5 %
		XM_002806845.1	(cj)	2195 - 2393 (3372)	98,0 %
IGF-1	228 bp	NM_001111283.1	(h)	319 - 546 (7370)	95,2 %
		XM_002752911.1	(cj)	364 - 591 (872)	98,7 %
		Z49055.1	(cj)	1 - 183 (210)	93,4 %
IGF-2	204 bp	NM_000612.4	(h)	891 - 1094 (5182)	97,1 %
		AJ001297.1	(cj)	73 - 215 (215)	99,3 %
		XM_002755669.1	(cj)	373 - 576 (777)	99,5 %
IGF1-R	314 bp	NM_000875.3	(h)	2598 - 2911 (11242)	94,2 %
		AJ001298.1	(cj)	1 - 314 (314)	100 %
IGFBP-1	127 bp	NM_000596.2	(h)	799 - 925 (1660)	85,8 %
		XM_002751403.1	(cj)	434/445 - 560 (708)	91,3 %
IGFBP-2	136 bp	BC004312.1	(h)	689 - 833 (1440)	92,7 %
		XM_002749735.1	(cj)	595 - 730 (978)	98,5 %

## **Publikationsverzeichnis**

EINSPANIER, A., K. LIEDER, B. HUSEN, K. EBERT, S. LIER, R. EINSPANIER, E. UNEMORI und M. KEMPER: *Relaxin supports implantation and early pregnancy in the marmoset monkey*. Ann NY Acad Sci, 1160:140–146, 2009.

# Danksagung

Frau und Herrn Professor Einspanier möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Insbesondere möchte ich Herrn Einspanier für die Bereitstellung von Laborräumen und -utensilien, interessante Diskussionen und einen stets kritisch-hilfreichen Blick auf meine Arbeit danken.

Frau Professor Einspanier möchte ich danken für die lehrreiche Zusammenarbeit bereits während meines Studiums, welche mir intensive Einblicke in die wissenschaftliche und tierexperimentelle Arbeit mit Weißbüschelaffen ermöglicht hat und mein Interesse an der Reproduktionsforschung nachhaltig vertiefte. Weiterhin danke ich ihr für ihr stets großes Verständnis und ihre Begeisterung an der Arbeit mit Doktoranten, welche mich immer wieder bestärkte.

Besonders sei dankend erwähnt, dass mir Frau Professor Einspanier, Penelope Nayudu, Robert Gilchrist und Michael Wicherek die Möglichkeit zur Dissertation gaben, in dem sie mir freundlicherweise das Organmaterial und die immunhistologischen Organschnitte zur Verfügung stellten.

Frau Professor Plendl sei gedankt, dass sie sich zur Erstellung des Drittgutachtens bereit erklärt hat.

Einen lieben Dank möchte ich auch den vielen Menschen im Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin, namentlich Jutta Sharbati, Christoph Holder und Simone Odau sowie allen übrigen Mitarbeitern aussprechen, die mir bei meinen Fragen stets mit Rat, Tat und viel Geduld zur Seite standen.

Stets offene Ohren für meine Fragen hatten zudem Katja Ebert, Christina Simon und Susanne Tätzner an der Universität Leipzig, auch ihnen sei herzlich gedankt.

Große Geduld brachten auch meine gesammelte Familie und meine Freunde auf, die sich immer wieder meine Probleme anhören mussten, zum Korrekturlesen gebeten wurden und bei denen ich die eine oder andere Festivität zu Gunsten dieser Arbeit geschwänzt habe. Insbesondere danke ich meiner Mutter und meinem verstorbenen Vater, die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin – und ohne die nicht nur diese Arbeit nicht wäre.

Mein größter Dank gilt allerdings meinem Mann Max Lier, ohne dessen Computerkenntnisse ich die vorliegende Arbeit wohl handgeschrieben hätte abgeben müssen, ohne dessen persönliche Unterstützung, Verständnis, Haushalts- und Babysitterdienste an unserer wunderbaren Tochter Judith ich wahrscheinlich nie fertig geworden wäre und natürlich für den gegenseitigen Antrieb, eine Doktorarbeit zu schreiben.

Die Fragen eines Kindes sind schwerer zu beantworten  
als die Fragen eines Wissenschaftlers.

*Alice Miller (\*1923)*

Dann steht mir die schwerere Aufgabe ja noch bevor... Nicht wahr, Judith?

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Susanne Lier, geb. Püttmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Meinersen, den 06.Mai 2011

Susanne Lier