

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Auswahlkriterien

Verwendet wurden 23 geschlechtsreife, nongravide, nullipare weibliche Mäuse, im Alter von 12 - 19 Wochen des Auszuchtstammes NMRI (Schönwalde, Deutschland) mit einem Gewicht von $41,10 \pm 2,85$ g. Die Tiere wurden zu 4 oder 5 Mäusen in Käfigen (42 cm * 25 cm * 14 cm) auf staubfreien Sägespänen bei einer Raumtemperatur von $22 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 %, einer Belichtungszeit von 07:00 bis 17:00 h mit einer Lichtintensität von 900 lux gehalten. Das pelletierte und autoklavierte Alleinfuttermittel Altromin 1324 FORTI (Altromin GmbH, Lange, Deutschland) sowie Leitungswasser über Tränkeflaschen stand ständig zur Verfügung.

Inhaltsstoffe des Futters:

Rohprotein	19,0 %	Kalzium	0,9 %
Rohfett	4,0 %	Phosphor	0,7 %
Rohfaser	6,0 %	Vitamin A	25.000 IE/kg
Rohasche	7,0 %	Vitamin D ₃	1.000 IE/kg
		Vitamin E	250 mg/kg
		Kupfer	5 mg/kg

Voraussetzung für die Einbeziehung der Mäuse in die Studie war eine physiologische zyklische Aktivität des weiblichen Geschlechtstraktes. Nach täglicher Zykluskontrolle durch einen Vaginalabstrich, wurden die Mäuse verwendet, die sich im Östrus befanden.

3.2 Methoden

3.2.1 Die Zyklusbestimmung der Maus

Materialgewinnung

Um das Zyklusstadium zu erkennen, wurde im 24-Stundenrhythmus ein vaginaler Abstrich angefertigt. Ein Mandrin (22 G * 33 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) wurde verkürzt, am vorderen Ende verbreitert und abgerundet. Nach Desinfektion mit 70 % Alkohol und Befeuchtung des vorderen Endes mit Aqua dest. konnte der Mandrin ca. 2 - 3 mm in die Vagina eingeführt werden. Es wurde Zellmaterial vom Scheidenboden und Scheidendach gewonnen. Anschließend wurde der Mandrin auf einem Objektträger (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ausgestrichen und mit Giemsa-Farblösung angefärbt.

Färbung des Abstriches

Herstellung der Grundlösung nach Wohlback's Methode

1 g Giemsa-Pulver (ICN, Eschwege, Deutschland) wurde mit 66 ml Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und bei 60 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 66 ml Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt.

Herstellung der Gebrauchslösung

5 ml Aqua dest.

150 µl Methanol

125 µl Giemsa-Grundlösung

Die Gebrauchslösung war vor jedem Färben neu anzusetzen.

Der Objektträger wurde 4 mal für 4 min mit der Gebrauchslösung vollständig bedeckt. Nach den letzten 4 min wurde der Objektträger mit Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und die Abstriche mikroskopisch ausgewertet.

Auswertung des Abstriches

Die Auswertung der gefärbten Abstriche erfolgte mit einem Mikroskop der Fa. Olympus. Abhängig vom Zyklusstadium waren verschiedene Zellen vorhanden, die durch Allen (1922) und Dreier (1997) als vaginale Epithelzellen beschrieben wurden.

3.2.2 Die Superfusion des Mäuseuterus

Lösungen und Puffer

Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4)

9,6 g Krebs-Henseleit-Puffer (Sigma, Steinheim, Deutschland) und

2,1 g Natriumbikarbonat (Sigma, Steinheim, Deutschland) ad 1000 ml Aqua dest.

Physiologische NaCl-Lösung

0,85 g NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 100 ml Aqua dest.

Hormonlösungen

Es wurden Hormonlösungen benutzt, die aus β -Östradiol (17- β -Estradiol, Sigma, Steinheim, Deutschland) bzw. Progesteron (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma, Steinheim, Deutschland) hergestellt wurden (Tab. 3.1). Die Hormone wurden mit DMSO (Sigma, Steinheim,

Deutschland) verdünnt. Um eine Endkonzentration von 0,1 % DMSO im Puffer nicht zu überschreiten, wurde der letzte Verdünnungsschritt mit Krebs-Henseleit-Puffer durchgeführt.

Tabelle 3.1 Benutzte Superfusionslösungen mit dazugehöriger Bezeichnung

Superfusionslösung	Bezeichnung
5 ng Östradiol/ml Medium	Ö-5
0,5 ng Östradiol/ml Medium	Ö-0,5
0,05 ng Östradiol/ml Medium	Ö-0,05
0,005 ng Östradiol/ml Medium	Ö-0,005
0,0005 ng Östradiol/ml Medium	Ö-0,0005
5 µg Progesteron /ml Medium	P ₄ -5
0,5 µg Progesteron /ml Medium	P ₄ -0,5
0,05 µg Progesteron /ml Medium	P ₄ -0,05
0,005 µg Progesteron /ml Medium	P ₄ -0,005
0,0005 µg Progesteron /ml Medium	P ₄ -0,0005
0,1 % DMSO in Krebs-Henseleit-Puffer	K (Kontrolle)

(Medium = Krebs-Henseleit-Puffer)

Durchführung (modifiziert nach Campos et al., 1980)

Die Mäuse, die dem Östrus zugeordnet werden konnten, wurden mit Diethylether (Roth, Karlsruhe, Deutschland) narkotisiert. Zur Langzeitnarkose wurde Ketamin (Gräub AG, Bern, Schweiz)/Xylazin (Medistar, Holzwickede, Deutschland) im Verhältnis 2:1 gemischt. Jeder Maus wurden 0,05 ml i.p. appliziert. Nach der Entnahme beider Uterushörner wurden die Mäuse durch eine Inzision in die A. abdominalis getötet.

Nach der Eröffnung des Abdomens in der Linea alba wurde eines der beiden Cornua uteri freipräpariert. Das freipräparierte Horn wurde durch zwei Inzisionen zwischen Ovar und Corpus uteri herausgetrennt. An beiden Enden wurde je eine gebogene Knopfkanüle (Ø 0,7 * 30 mm, Heiland, Hamburg, Deutschland) mittels Ligatur (Dermafil-Faden, Schmitz-KG, Hünningen, Belgien) befestigt. Das Uterushorn wurde zuerst mit physiologischer NaCl-Lösung superfundiert und in eine Küvette mit 37 °C warmem Krebs-Henseleit-Puffer verbracht. Der Puffer in der Küvette wurde mit Carbogen (Messer Griesheim GmbH, Griesheim, Deutschland) bei einem Druck von 1 bar begast. Die Spüllösung wurde über die Schlauchpumpe (Modell 132100, Desaga, Heidelberg,

Deutschland) mit passendem Schlauchsystem (Silikonschlauch, \varnothing 0,5 mm, Desaga, Heidelberg, Deutschland) durch den Uterus transportiert. Die Pumpe gewährleistete eine konstante Durchflußrate von 6 ml/h. Nach ca. 5 minütiger Superfusion mit 0,85 % NaCl wurde die eigentliche Superfusion mit der entsprechend konzentrierten Hormonlösung begonnen. Dabei wurden in den ersten 60 min Fraktionen von jeweils 5 min (\approx 0,5 ml) aufgefangen, von der 60. bis zur 90. Minute Fraktionen von jeweils 10 min (\approx 1,0 ml). Mit dem zweiten Uterushorn wurde genauso verfahren. Die Zeitdauer zwischen der Entnahme des ersten und zweiten Hornes betrug ca. 5 min.

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3.1 dargestellt.

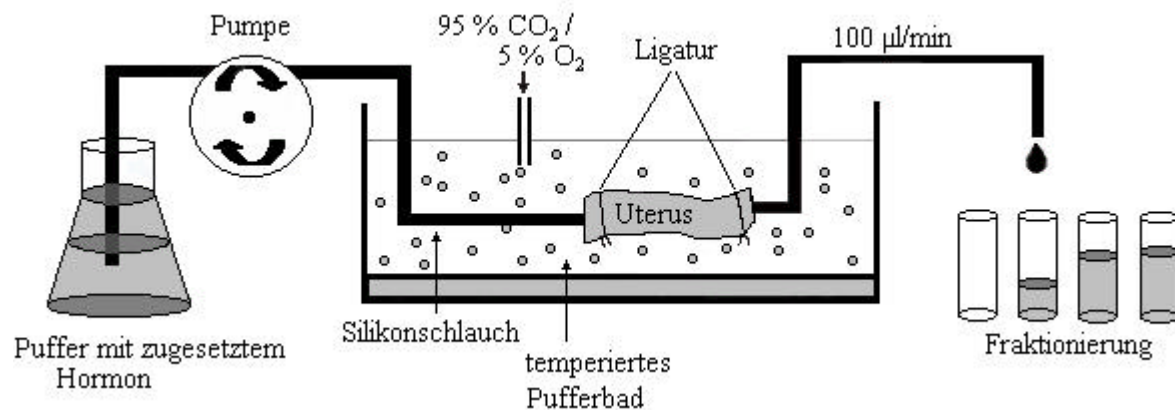


Abbildung 3.1 Aufbau des Superfusions-Systemes

Nach beendeter Superfusion wurden die Uteri folgender Behandlung geteilt:

Ö-5	P4-5	K
Ö-0,05	P4-0,05	
Ö-0,0005	P4-0,0005	

Eine Hälfte des Organs wurde für die immunhistologische Darstellung des Progesteronrezeptors (PR) genutzt, der andere Teil für den Nachweis von CytochromP26 (CYP26) mittels *in situ*-Hybridisierung.

Alle nicht geteilten Uteri wurden nur für den PR-Nachweis verwendet.

Proteinbestimmung im Superfusat

Die Proteinkonzentration in den fraktioniert aufgefangenen Superfusaten wurde mit der BCA (Bichinonsäure)-Methode bestimmt. Es wurden 10 µl Probe + 150 µl Arbeitsreagenz eingesetzt (*Reagenz A*: 1 % BCA-Na₂, 2 % Na₂CO₃ * H₂O, 0,16 % Na-Tartrat, 0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO₃; *Reagenz B*: 4 % CuSO₄ * 5 H₂O – Lösung; *Arbeitsreagenz*: 100 Volumenteile Reagenz A mit 2 Volumenteilen Reagenz B mischen). Die Messung erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten (Greiner-Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland). Die Platten wurden 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm im Mikrotiterplattenmeßgerät (Microplate ReaderTM, Modell 550, BIO-RAD) nach 5-minütiger Abkühlung der Platten auf Zimmertemperatur.

Die Proteinkonzentration konnte aus der Standardkurve computergestützt ermittelt werden. Es wurde eine geometrische Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA, Serva, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die Ausgangsmenge betrug 5 mg BSA/ml Aqua dest. Der Leerwert entsprach einer Messung gegen 10 µl Aqua dest. + 150 µl Arbeitsreagenz.

Da der Krebs-Henseleit-Puffer mit der Reagenz-Lösung eine eigene Absorption entwickelte, mußte dieser Wert bei allen Proben subtrahiert werden, um eine genaue Proteinkonzentration zu erhalten. Alle Proteinkonzentrationen, die daraufhin negativ waren, wurden mit null definiert, da die Empfindlichkeit des Meßgerätes für diese Konzentrationen nicht ausreichend war.

3.2.4 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der fraktioniert aufgefangenen Superfusate

Vorbereitung

Alle Proben der gleichen Hormonkonzentration und des gleichen Zeitpunktes wurden jeweils zu einer 40 µl Sammelprobe gepoolt. Diese wird mit 20 µl Probenpuffer (125 mM Tris; 20 % Glycerol; 2 % SDS; 2 % 2-Mercaptoethanol; pH 6,8) versetzt und bei 100 °C im Wasserbad 5 min erhitzt.

Anschließend wurden die Proben bei 60 °C (ca. 45 min) im Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf-Nathaler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland) durch Trocknen eingengt und danach in 15 µl Aqua dest. aufgenommen.

Durchführung

Die Elektrophoresen wurden in Vertikalkammer-Systemen (Bio-Rad, München, Deutschland) mit 0,5 mm dicken Gelen durchgeführt. Die Trennung der Proteine erfolgte

unter denaturierenden Bedingungen mit 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen und 3 %-igen Sammelgelen (Laemmli, 1970).

Pro Slot wurden 15 µl Probe bzw. 4 µl Molekulargewichtsstandard (Low Range Silver Stain Standard, BIO-RAD, München, Deutschland) aufgetragen.

Laufbedingungen (BIO-RAD, Power Pac 300) für die Elektrophorese:

- 60 mA
- ca. 1,5 Stunden

Die Proteinbanden wurden mit der Silbernitratfärbung dargestellt (Heukeshoven, 1991). Die Auswertung erfolgte mit dem Fluor-STM Multimager System (BIO-RAD, München, Deutschland).

3.2.5 Massenspektrometrische Untersuchung

Die Untersuchung der Peptidzusammensetzung wurde am Interdisziplinären Forschungszentrum für Biopolymere der Universität Potsdam mittels der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) durchgeführt. Die Massenanalyse erfolgte durch einen Flugzeitanalysator (TOF-Analysator, engl. time of flight).

Für die Bestimmung wurden zwei Proteinbanden aus den silbergefärbten Gelen sorgfältig ausgeschnitten. Anschließend wurden sie zweimal für 20 min in einem Gemisch aus 40 % Acetonitril und 60 % 50 mM Ammoniumbikarbonat (pH 7,8; v/v) gewaschen. Nach der Trocknung der Gelstücke unter Vakuum erfolgte der Proteinabbau durch Trypsin. Dazu wurde modifiziertes Trypsin in 50 mM Ammoniumbikarbonat gelöst und den Gelstücken solange zugegeben, bis diese es vollständig absorbiert hatten. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Die Extraktion der Peptide aus dem Gel erfolgte nach zweimaliger Zugabe von 100 µl eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (60 : 40; v/v).

Zur massenspektroskopischen Peptidanalyse wurden die vereinigten Extrakte lyophilisiert und in 10 µl eines Gemisches aus 2 % Trifluoressigsäure in Wasser und 30 % Acetonitril (v/v) aufgenommen. Als Matrix diente α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (4-HCCA) in einer Konzentration von 15 g/l in 70 % Acetonitril und 30 % Wasser (v/v). Die Probe wurde in 0,5 µl 2 % Trifluoressigsäure in Wasser und 0,3 µl der 4-HCCA-Lösung vermischt, auf einen metallischen Probenhalter verbracht und luftgetrocknet. Die Analyse erfolgte mit einem Reflektor MALDI-TOF-Massenspektrometer.

3.2.6 Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) im Uterus der Maus

Histologische Präparation

Für die Darstellung des Progesteronrezeptors im Uterus wurden formalinfixierte, paraffineingebettete Uteri verwendet. Nach der Fixation der Uteri in 4 %-igem neutral gepuffertem Formalin wurden die Organproben über eine aufsteigende Alkoholreihe für die Einbettung in Tissue PrepTM (Fisher scientific Company, New Jersey, USA) vorbereitet. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms konnten 3 µm dicke Schnitte angefertigt werden, die, wie unten beschrieben, weiter bearbeitet wurden.

Lösungen und Puffer

Tris-buffered saline (TBS, 0,5 M, pH 7,6)

Stammlösung

60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 1000 ml Aqua dest.

pH 7,6 mit 1 N HCl einstellen

Gebrauchslösung

Stammlösung 1:10 mit 0,85 % NaCl-Lösung verdünnen

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)

2,10 g Zitronensäure-Monohydrat (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 1000 ml Aqua dest.

pH 6,0 mit 2 N NaOH einstellen

Imidazol-HCl-Puffer (60 mM, pH 7,1)

4,08 g Imidazol (Merck, Darmstadt, Deutschland) ad 1000 ml Aqua dest.

mit 1 N HCl auf pH 7,1 einstellen

Seren und Antikörper

Serum

Kommerziell verfügbares Ziegen Serum (Code-Nr. 005-000-001, Dianova, Hamburg, Deutschland)

Primärankörper

monoklonaler (mouse) anti-Progesteron-Rezeptor-Antikörper (IgG₁; Clone PR-AT 4.14, Dianova, Hamburg, Deutschland)

Sekundärantikörper

Ziege-Anti-Maus IgG, (Code-Nr. 115-035-164, Dianova, Hamburg, Deutschland)

Antigen-Nachweis mittels monoklonalen Antikörpern

Die Durchführung des Antigen-Nachweises für Progesteronrezeptoren erfolgte in den nachfolgend aufgeführten Schritten:

1. Aufziehen von 3 µm dicken Schnitten auf Super-Frost^{®*}/Plus - Objektträger (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Objektträger 15 min auf einer 37 °C warmen Platte trocknen lassen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C lagern.

2. Entparaffinierung und Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe:

Roti [®] -Histol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	10 min
Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	2 * 3 min
96 % Rotisol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
80 % Rotisol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
70 % Rotisol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
Aqua dest.	3 min

3. Besondere Verfahren

Diese beide Verfahren bewirken eine Demaskierung der Proteine, die durch die Formalinfixation entstanden ist (Sierralta und Thole, 1996). Eine bessere Antigen-Antikörper-Reaktion wird möglich.

3.1 Behandlung mit Zitratpuffer

Die Objektträger wurden in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) 3 * 5 min bei 100 °C in der Mikrowelle behandelt und anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach waschen der Schnitte mit TBS, 2 min.

3.2 Trypsin-Behandlung

200 ml TBS wurde in einer Küvette auf 37 °C im Wärmeschrank erwärmt. Kurz vor dem Einbringen der Schnitte wurde 1 ml 10-mal Trypsin (Sigma, Steinheim, Deutschland) frisch zugesetzt. Die Schnitte wurden bei 37 °C 6 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Objektträger 2 min mit Aqua dest. gewaschen.

-
4. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in Methanol zusammen mit frisch zugesetztem 0,5 % H_2O_2 (30% H_2O_2 p.a., Roth, Karlsruhe, Deutschland). 45 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 2 min mit TBS waschen.
 5. Überführung der Schnitte aus der Küvette in die Coverplates[®] (Fa. Shandon, Frankfurt/Main, Deutschland)
 6. Einbringen von 100 μl 5 % Ziegen Serum, verdünnt in 1 % BSA in TBS, zur Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung
20 min bei Raumtemperatur inkubieren
 7. Zugabe von 100 μl des in 1 % BSA in TBS verdünnten Primärantikörpers bzw. 100 μl 1 % BSA in TBS (Kontrolle) je Coverplate[®]
Verdünnung des Primärantikörpers 1:50
20 Stunden bei 4 °C inkubieren
anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur stehenlassen
 8. 10 min mit je 2 ml TBS waschen
 9. Zugabe von 100 μl des in 1 % BSA in TBS verdünnten Sekundärantikörpers
Verdünnung des Sekundärantikörpers 1:200
Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur
 10. 10 min mit je 2 ml TBS waschen
 11. wechseln der Schnitte aus den Coverplates[®] in eine Küvette
 12. 5 min in TBS waschen
 13. Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren in 200 ml 60 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,1), versetzt mit 100 mg 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Dihydrat (DAB, Flucka, Neu-Ulm, Deutschland). Kurz vor dem Einbringen 70 μl 30 % H_2O_2 zusetzen.
10 min bei Raumtemperatur inkubieren

14. 3 * 5 min in TBS waschen

15. 5 min mit Aqua dest. waschen

16. 10 Sekunden mit Papanicolaous Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegenfärben
und danach mit Leitungswasser spülen

17. 5 min in Leitungswasser waschen

18. 2 min in Aqua dest. waschen

19. Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe
je 3 min in 50 %, 70 %, 90 % und 96 % Rotisol
2*3 min in Isopropanol
2*5 min in Roti[®]-Histol

20. Eindecken der Objektträger mit Canadabalsam (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und
Deckgläschen

Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde bereits definiertes Organgewebe eines graviden Uterus der Maus mitgeführt.

Als Negativkontrollen dienten die jeweils mit 1 % BSA in TBS inkubierten Schnitte.

Auswertung der immunhistologischen Untersuchung zum Progesteronrezeptor

Es wurde die Expression des PR im Epithel des Endometriums und den Drüsen sowie die PRs im Stroma des Endometriums und dem Myometrium ermittelt. Die Expression erscheint als Braunfärbung in den Kernen in verschiedener Intensität. Folgende Uteri wurden mikroskopisch ausgewertet:

Ö-5	P ₄ -5	K
Ö-0,05	P ₄ -0,05	
Ö-0,0005	P ₄ -0,0005	

Die Ermittlung des Hormonrezeptorstatus erfolgte semiquantitativ durch die Berechnung des Immun Reactive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987):

$$\boxed{\text{IRS} = \text{PP} * \text{SI}}$$
 mit PP - Prozentsatz positiver Zellenkerne
SI - vorherrschender Intensitätsgrad der Färbung

Tabelle 3.2 Beurteilung der Farbreaktion der Zellkerne für den PR-Nachweis bezogen auf den vorherrschenden Intensitätsgrad der gefärbten Zellkerne (SI-Wert; Remmele und Stegner, 1987)

Farbreaktion	SI-Wert
keine	0
schwach	1
mäßig	2
stark	3

Tabelle 3.3 Anzahl der positiven PR-Zellkerne und deren Zuordnung zum entsprechenden Prozentsatz (PP-Wert; Remmele und Stegner, 1987)

Anzahl positiver Zellen	PP-Wert
keine	0
< 10%	1
10 – 50%	2
51 – 80%	3
> 80%	4

Der IRS kann einen Wert zwischen 0 - 12 annehmen.

Zur Bestimmung der positiven Zellen wurden

500 Zellen im Myometrium

500 Zellen im Stroma

50 Drüsenzellen und

50 Epithelzellen des Endometriums ausgezählt.

Eine statistische Auswertung der Expression des PR konnte nicht durchgeführt werden, da zu wenige Proben für die Untersuchung vorhanden waren.

3.2.7 Molekularbiologischer Nachweis von CytochromP26 (CYP 26) mittels *in situ*-Hybridisierung

(White et al., 1996, modifiziert nach Schmiedeberg (2001))

Bei der *in situ*-Hybridisierung verbindet sich die mRNA eines Gewebeschnittes mit der *in vitro* transkribierten cRNA.

Vorbereitung

Die für den molekularbiologischen Nachweis von CYP26 definierten halben Uteri (3.2.2, S. 36) wurden nach der Superfusion 3 Stunden in Bouin'scher-Lösung (Sigma, St.Louis, USA) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie für weitere 12 Stunden bei 4 °C in steriler 30 %iger Saccharose-PBS-Lösung aufbewahrt. Nachdem die Organe in Tissue-freezing-Medium (Jung, Nussloch, Deutschland) eingebettet waren, wurde sie mittels Gefriermikrotom in 10 µm dicke Schnitte geschnitten.

Die CYP26-sense und -antisense-RNA wurde freundlicherweise von Dr. Martin Petkovich, Queens University, Kanada, zur Verfügung gestellt.

Vorbereitung der Schnitte

Die Objektträger mit den Schnitten wurden bei 50 °C 30 min getrocknet. Nach dem Überführen der Schnitte in Coverplates[®] wurde mehrmals mit 2 ml 1×PBS-Puffer (pH 7,4) in DEPC gewaschen. Mit 10 µl Proteinkinase K (19 µg/µl) wurden die Schnitte bei Raumtemperatur inkubiert (15 min), um alle Proteine, die die RNA umgeben, zu destruieren. Damit wird ein besseres Binden der transkribierten RNA an die RNA des Gewebes möglich. Danach wurden die Schnitte mit 2 ml PBS-Puffer in DEPC gewaschen. Anschließend wurden sie mit PBS und Bouin'scher-Lösung behandelt und nochmals gewaschen (2 ml PBS-Puffer in DEPC).

Alle unspezifischen Bindungen wurden durch eine Prähybridisierung abgesättigt. Es wurden je 500 µl Hybridisierungslösung (5 ml 50×Denhardt's Lösung, 12,5 ml 20×NaCl-Zitrat-Puffer, 2,5 µl Heringssperma-DNA (10mg/ml), 625 µl t-RNA (20 mg/ml)), 50 µl Tween 20, 25 ml Formamid ad 50 ml DEPC-H₂O) für 2 Stunden auf die Schnitte aufgetragen.

Durchführung der *in situ*-Hybridisierung

Die oben hergestellte RNA-Lösung wurde im Thermocycler aufgeschmolzen. Eine auf 65 °C vorgewärmte Hybridisierungslösung wurde mit der RNA-Lösung versetzt. Die aufgearbeiteten Gewebeschnitte wurden für 14 Stunden bei 65 °C mit der Sense- oder Antisense-Hybridisierungslösung inkubiert. Nur die Antisense-Proben konnten mit der RNA im Gewebeschnitt hybridisieren.

Immunhistochemie

Die hybridisierten Schnitte wurden mit 1 ml 5×NaCl-Zitrat-Puffer gewaschen, wodurch alle ungebundenen RNA-Stücke entfernt wurden. Um eine unspezifische Bindung der zum positiven Nachweis für CYP26 dienenden Antikörper zu vermeiden, wurden zwei Blockierungslösungen aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte mit Anti-Digoxigenin-Alkalischer-Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim, Deutschland) 14 Stunden bei 4 °C inkubiert, damit sich der Antikörper an die markierte RNA (UTP*) bindet. Nach der spezifischen Bindung des Antikörpers reagierte die am Antikörper befindliche Alkalische Phosphatase mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Toluidine-Salz) und Nitroblautetrazoliumchlorid, einer Farblösung, zu einem dunkelblau-schwarzen Farbkomplex, der mikroskopisch in den Zellen nachweisbar war. 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und Nitroblautetrazoliumchlorid wurden als Tablette (Roche, Mannheim, Deutschland) in 10 ml deionisiertem Reinstwasser + 100 µl Levamisol-Stocklösung (24 mg Levamisolhydrochlorid/ml) gelöst.

Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde der gravide Uterus einer Maus mitgeführt.

Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die mit Hybridisierungslösung der RNA-Sense inkubiert wurden.

Auswertung der Untersuchung von CytochromP26

Wenn die RNA des CYP26-Enzyms vorhanden ist, färben sich die entsprechenden Zellen dunkelblau bis schwarz. Bei der Beurteilung der Schnitte, wurde die Farbintensität und die Anzahl der gefärbten Zellen des Drüsen- und Endometriumepithels betrachtet.

Die Farbintensität wird wie folgt beschrieben:

Tabelle 3.4 Einteilung der Farbintensität für CYP26

Farbintensität	Einteilung
keine	-
schwach	+
mäßig	++
stark	+++

Aufgrund der geringen Anzahl an Präparaten konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

3.2.8 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Während der mikroskopischen Betrachtung der superfundierten Uteri fiel auf, daß verschiedene Uteri große, zellfreie Bereiche im Stroma endometrii und dem Myometrium zeigten. Um diese Veränderung darzustellen wurde eine HE-Färbung durchgeführt.

Durchführung

Unabhängig von der Behandlung wurden zwei superfundierte Uteri und ein unbehandelter Uterus untersucht. Die 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden mit der oben beschriebenen Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend 2 min mit Aqua dest. gespült. Die Kernfärbung erfolgte mit einer Hämalaun-Lösung nach Mayers (1920), in die die Schnitte 3 min verbracht wurden. Anschließend wurde 2 min mit Aqua dest. gespült und mit Leitungswasser 10 min gebläut. Die Gegenfärbung wurde mit 0,5 % Eosin (Chroma-Schmidt GmbH & Co, Köngen, Deutschland) durchgeführt. Das restliche Eosin wurde 2 min mit Aqua dest. ausgewaschen. Nachfolgend wurde je 10 Sekunden mit 70 % bzw. 80 % Rotisol, 3 min mit absolutem Rotisol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und nochmals 3 min mit Roti[®]-Histol differenziert. Anschließend wurden die Schnitte mit Canadabalsam und Deckgläschen eingedeckt.

Auswertung

Die HE-Färbung zeigt die Zellkerne, Kalk, sauren Schleim und grampositive Bakterien blau, alles übrige erscheint in verschiedenen Tonabstufungen rot. Die Gewebestruktur des Uterus kann beurteilt werden.

3.2.9 Statistische Auswertung

Alle statistisch auswertbaren Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel (MW) mit der dazugehörigen Standardabweichung ($\pm s$) angegeben. Die Überprüfung der Gruppenunterschiede erfolgte durch einen Mittelwertvergleich in Form eines t-Tests (Student'sche Test). Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,050$ festgelegt.