

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft Bergholz–Rehbrücke der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Uterus-Superfusion - ein Modell zur Beurteilung lokaler
steroidaler Effekte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE (Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Afra Geißler
Tierärztin aus Meiningen

Berlin 2002
Journal-Nummer 2638

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Florian J. Schweigert

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Florian J. Schweigert

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ortwin Simon

Deskriptoren

Tag der Promotion: 6. November 2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Uterus und Vagina bei der Maus	3
2.1.1	Anatomie	3
2.1.2	Histologie	3
2.1.3	Umbauvorgänge im Verlauf des Zyklus	5
2.1.4	Der Zyklus der Maus	8
2.2	Die Uterusflüssigkeit	9
2.2.1	Die Proteine der Uterusflüssigkeit	9
2.2.2	Proteinveränderungen in der Uterusflüssigkeit	12
2.2.2.1	Veränderungen der Proteine während des Zyklus und der Gravidität	12
2.2.2.2	Veränderungen der Proteine unter Östradiol- und Progesteroneinfluß	15
2.3	Steroidhormone	16
2.3.1	Östradiol	17
2.3.2	Progesteron	17
2.3.3	Der Progesteronrezeptor (PR)	18
2.4	Verschiedene Techniken der Organdurchspülung	24
2.4.1	Allgemeine Betrachtung	24
2.4.2	Das Modell der Superfusion	24
2.4.3	Das Modell der Perfusion	27
2.4.4	Das Modell der Mikrodialyse	28

3	Material und Methoden	30
3.1	Tiere und Auswahlkriterien	30
3.2	Methoden	30
3.2.1	Die Zyklusbestimmung der Maus	30
3.2.2	Die Superfusion des Mäuseuterus	31
3.2.3	Proteinbestimmung im Superfusat	34
3.2.4	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der fraktioniert aufgefangenen Superfusate	34
3.2.5	Massenspektrometrische Untersuchung	35
3.2.6	Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) im Uterus der Maus	36
3.2.7	Molekularbiologischer Nachweis von CytochromP26 (CYP26) mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	41
3.2.8	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	43
3.2.9	Statistische Auswertung	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Der Vaginalabstrich der Maus	45
4.2	Proteinbestimmung in den Superfusaten	47
4.2.1	Allgemeine Betrachtung	47
4.2.2	Beurteilung der Uterusspülung (Ut.)	48
4.2.3	Beurteilung der Kontrolle (K)	48
4.2.4	Beurteilung der Östradiolbehandlungen	49
4.2.5	Beurteilung der Progesteronbehandlungen	49
4.2.6	Elektrophoretische Proteinmusterbestimmung der Superfusate	55
4.2.7	Auswertung der massenspektroskopischen Untersuchung	58
4.3	Die Expression des Progesteronrezeptors (PR) im Uterus der Maus	59
4.3.1	Progesteronrezeptorstatus der Lamina epithelialis mucosae	60

4.3.2	Progesteronrezeptorstatus der Glandulae uterinae der Lamina propria mucosae	60
4.3.3	Progesteronrezeptorstatus des Stroma endometrii	60
4.3.4	Progesteronrezeptorstatus des Myometriums	61
4.4	Nachweis von CytochromP26 (CYP26) im Uterus	66
5	Diskussion	69
5.1	Die Superfusionslösungen	69
5.2	Die Proteine der Uterusflüssigkeit unter Steroidhormon-Einfluß	70
5.3	Elektrophoretische und massenspektrometrische Betrachtung	76
5.3.1	Maus-Serumalbumin	76
5.3.2	Laktoferrin	77
5.4	Die Expression des Progesteronrezeptors (PR)	78
5.4.1	Der Progesteronrezeptor unter Östradioleinfluß	79
5.4.2	Der Progesteronrezeptor unter Progesteroneinfluß	82
5.5	Retinsäure und CytochromP26 (CYP26)	85
5.6	Das Modell der Superfusion	86
6	Schlußfolgerung	89
7	Zusammenfassung	91
7.1	Summary	93
	Literaturverzeichnis	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
CYP26	CytochromP26
DAB	3,3`-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Dihydrat
DEPC	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	engl. epidermal growth factor
ER/ERs	Östradiolrezeptor/en
h	Stunde
HB-EGF	engl. heparin-binding epidermal growth factor
hcG	humanes Choriongonadotropin
HRE	Hormon-Responsives-Element
HSP	heat-shock-protein
Ig G	Immunglobulin G
IGF	engl. insulin-like growth factor
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF-MS	engl. matrix-assisted laser-desorption/ ionisation-time of flight-mass spectrometrie; Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisations-Massenspektrometrie
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert
p. c.	post coitum
p. o.	post ovulationem
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PMSG	engl. pregnant mare serum gonadotropin
PR/PRs	Progesteronrezeptor/en

RAR	Retinsäure-Rezeptor
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAF	transkriptionsaktivierender Faktor
TBS	Tris-Puffer
Ut.	Uterusspülung mit NaCl
v/v	Volumen zu Volumen

Abstract

Uterus Superfusion – A Model for the Assessment of Local Steroidal Effects

115 p., 27 fig., 7 tab., 165 ref.

The aim of this study was the development of an *ex - vitro* model for the investigation of the effects of various estradiol and progesterone concentrations on the isolated uterus of the mouse. 45 uteri of estrous mice were superfused with or without the hormones after the stage of estrous cycle had been determined by vaginal smear. The eluate was collected in 5-minute fractions for 60 minutes and in 10-minute fractions for another 30 minutes, respectively. The protein concentration of the fractions was determined, and the protein pattern was characterised by SDS-PAGE. Two striking protein bands appearing upon superfusion with the hormones could be analysed by MALDI-TOF. The pattern of progesterone- receptor (PR) distribution in the tissue was shown immunohistochemically after treatment of the uteri with physiological, overdosed and underdosed hormone concentrations, respectively. CytochromeP26 (CYP26) was determined by *in-situ* hybridisation.

The following results were obtained:

The protein concentration changes dependent on the hormone and its concentration. Estradiol stimulates the release of proteins in all concentrations tested. The physiological concentration has the smallest influence. All other estradiol concentrations significantly increase the amount of protein in the superfusate compared to the control. The augmentation is more distinct from the 70th minute on. Progesterone leads to enhanced protein concentration only with overdosed concentrations. Physiological and underdosed concentrations, respectively, have no stimulating effect on the protein release by the superfused uteri

The first flushing shows the most varied protein pattern. Treatment with estradiol strongly increases the concentrations of mice serum albumin and lactoferrin partly within 90 minutes. Progesterone enhances mouse serum albumin only.

Mouse serum albumin seems to be responsible for the biphasic manifestation of the protein concentration. Very likely the amount of mouse serum albumin elevates due to an increased permeability of blood vessels.

Lactoferrin is a uterus specific protein and is present in the first flushing. It can be electrophoretically detected only in the 10- minute fraction of the treatment with the highest estradiol concentration.

The expression of PRs depends on tissue, hormone and hormone concentration. No PR can be detected with any treatment in epithelium of the endometrium. In glands, PR content increases with rising estradiol concentrations in the medium. Slight progesterone effects can be seen with highest dosed and lowest dosed concentrations. The physiologic concentration leads to the highest PR content in the tissue. In stroma, all estradiol concentrations cause an increase in PR amount, regardless of the concentration. The most striking effect can be observed in the myometrium. Physiological and high dosed estradiol concentrations have the strongest positive influence on PR expression.

No CYP26 could be found by *in - situ* hybridization within 90 minutes of exogenous addition of estradiol and progesterone, respectively

Taking all these results into consideration, we can conclude that the superfusion is a good *ex - vitro* model to investigate the effects of soluble substances on the organ. Because of the direct contact of the active substance with the surface of the tissue, the various effects are reached sooner. Furthermore, the transformation and disassembly of the active substance may be decreased or wholly prevented.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. J. Schweigert möchte ich für die Überlassung des Themas danken, das sich nach anfänglichen Schwierigkeiten als sehr interessant erwiesen hat. Des weiteren danke ich ihm für die stets freundliche Unterstützung sowie die wertvollen fachlichen Anregungen und Hinweise bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Frau Dr. A. Flechner danke ich für die Einarbeitung in das Thema, die jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft, die zahlreichen praktischen Anregungen bei der Einführung in die Technik der Superfusion, der Elektrophorese und der Immunhistologie sowie der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Dr. S. Haebel vom Interdisziplinären Forschungszentrum für Biopolymere der Universität Potsdam für die Bearbeitung der Proben durch die MALDI-TOF-MS-Analytik.

Mein besonderer Dank gilt Frau U. Neumann und Frau. K. Schmiedeberg bei der Durchführung der *in situ*-Hybridisation zur Untersuchung des CytochromP26.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam möchte ich mich für die Unterstützung und nette Zusammenarbeit während der Erstellung meiner Arbeit bedanken.

Meiner Familie und Guntram danke ich für die stetige Bereitschaft, mich in jeder Hinsicht zu unterstützen, ohne die mir die Anfertigung meiner Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name Afra Geißler
geboren am 8.11.1972
in Meiningen

Schulische Ausbildung

Sep. 1979 – Aug. 1989 Polytechnische Oberschule „Theodor Neubauer“ in Jena
Abschluß 10. Klasse

Berufliche Ausbildung

Sep. 1989 – Feb. 1993 Biologielaborantin mit IHK-Abschluß an der Friedrich Schiller
Universität Jena

Abitur

Sep. 1991 – Juni 1994 Kurs zur Vorbereitung auf des Abitur an der Volkshochschule
Jena
Juli 1994 Abitur am Ernst Abbe Gymnasium Jena

Studium

Okt. 1994 – März 2000 Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Universität Leipzig

Berufserfahrung

seit Juli 2001 praktische Tierärztin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur, erstellt habe.

Berlin, 10.05.2002

.....

Afra Geißler