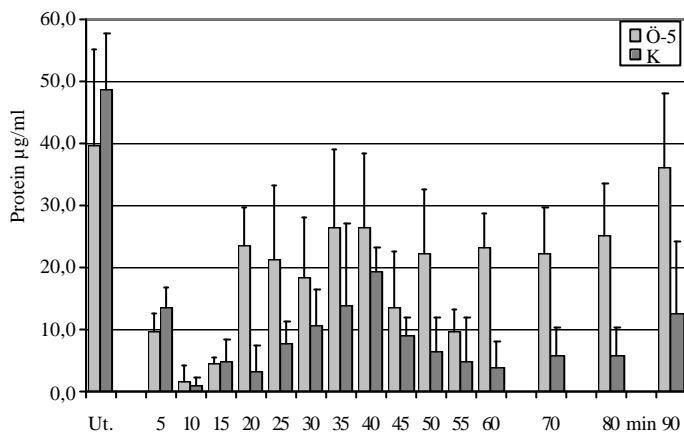


Tabelle 4.1 Konzentration des Gesamtproteins ($\mu\text{g/ml}$) in den Superfusaten nach verschiedenen Östradiolbehandlungen (Ut. - Uteruspülung mit NaCl; MW - Mittelwert; s - Standardabweichung; \emptyset - mittlere Proteinkonzentration der jeweiligen Behandlung (ohne Ut.); unterstrichene Konzentrationen wurden elektrophoretisch bearbeitet)

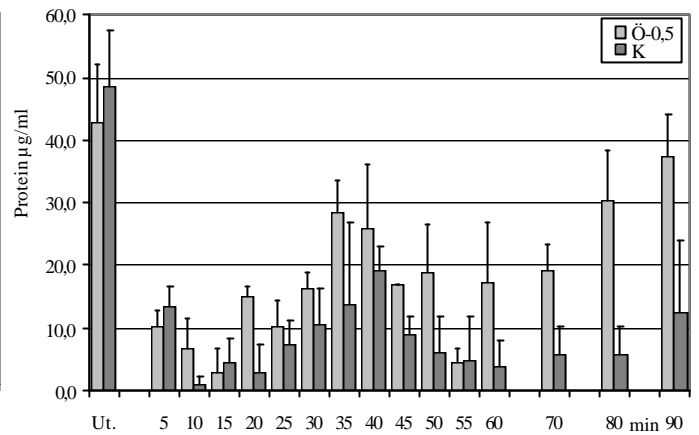
Zeit min	μg Gesamtprotein/ml Superfusat											
	MW K	s	MW Ö-5	s	MW Ö-0,5	s	MW Ö-0,05	s	MW Ö- 0,005	s	MW Ö- 0,0005	s
Ut.	<u>48,7</u>	9,0	<u>39,5</u>	15,5	<u>42,8</u>	9,3	<u>27,3</u>	16,3	<u>28,3</u>	3,7	<u>32,8</u>	5,5
5	13,3	3,3	9,5	3,0	10,3	2,7	18,0	11,3	20,3	10,2	10,8	2,9
10	1,0	1,1	<u>1,7</u>	2,4	6,7	4,8	14,3	10,3	11,0	7,5	9,8	9,0
15	4,7	3,7	4,5	0,9	<u>3,0</u>	3,7	6,7	5,3	<u>4,0</u>	2,9	<u>5,3</u>	4,5
20	<u>3,0</u>	4,2	23,3	6,3	15,0	1,6	<u>6,0</u>	4,2	8,3	2,5	7,7	1,9
25	7,5	3,8	21,3	11,9	10,3	4,1	10,0	7,3	9,7	4,1	8,0	3,6
30	10,5	5,7	18,3	9,5	16,3	2,5	11,3	8,0	11,7	4,1	20,8	5,4
35	13,8	13,3	26,3	12,5	<u>28,3</u>	5,2	21,0	11,3	<u>26,7</u>	2,5	28,5	4,6
40	<u>19,3</u>	3,7	<u>26,3</u>	12,0	25,8	10,4	<u>23,5</u>	4,2	20,0	2,9	<u>29,0</u>	12,7
45	9,0	2,8	13,3	9,1	17,0	0,0	15,3	9,0	10,3	7,4	27,0	4,5
50	6,3	5,4	22,0	9,1	19,0	7,4	12,0	9,2	11,7	5,0	23,5	12,8
55	4,8	7,1	<u>9,7</u>	3,4	<u>4,3</u>	2,5	<u>2,0</u>	1,4	<u>3,0</u>	2,0	<u>2,3</u>	3,9
60	<u>3,8</u>	4,3	23,0	5,7	17,3	9,5	7,3	5,4	9,7	4,1	21,7	6,3
70	5,6	4,5	22,0	7,6	19,3	4,1	8,3	3,8	19,7	14,3	23,9	2,5
80	5,8	4,7	25,0	8,5	30,5	7,9	18,0	1,0	21,3	3,7	8,8	5,1
90	<u>12,5</u>	11,5	<u>36,0</u>	12,0	<u>37,5</u>	6,5	<u>24,5</u>	11,7	<u>31,0</u>	13,9	<u>22,3</u>	10,5
\emptyset	8,1	4,9	18,8	9,2	17,4	9,9	13,2	6,8	14,6	8,2	16,6	9,3

Tabelle 4.2 Konzentration des Gesamtproteins ($\mu\text{g/ml}$) in den Superfusaten nach verschiedenen Progesteronbehandlungen (Ut. - Uterusspülung mit NaCl; MW - Mittelwert; s - Standardabweichung; \emptyset - mittlere Proteinkonzentration der jeweiligen Behandlung (ohne Ut.); unterstrichene Konzentrationen wurden elektrophoretisch bearbeitet)

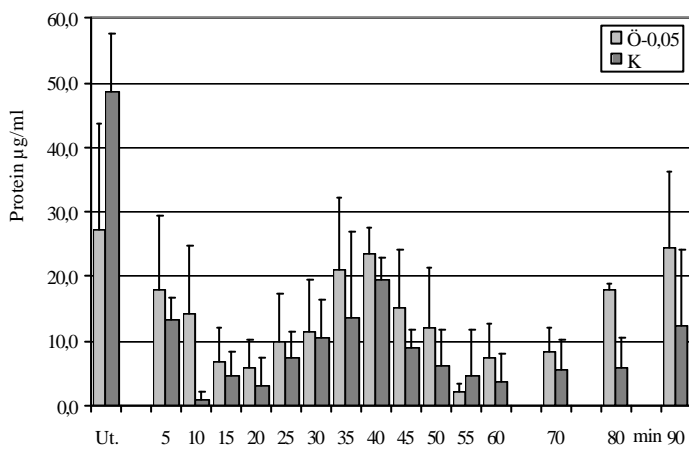
Zeit min	$\mu\text{g Totalprotein/ml Superfusat}$											
	MW K	s	MW P ₄₋₅	s	MW P _{4-0,5}	s	MW P _{4-0,05}	s	MW P _{4-0,005}	s	MW P _{4-0,0005}	s
Ut.	<u>48,7</u>	9,0	<u>43,0</u>	7,0	<u>51,0</u>	3,3	<u>44,3</u>	5,9	<u>47,3</u>	10,5	<u>35,0</u>	5,8
5	13,3	3,3	17,3	5,9	32,3	13,0	30,5	6,8	24,0	5,5	20,7	7,6
10	1,0	1,1	<u>2,3</u>	0,9	<u>5,0</u>	3,3	5,0	7,0	2,0	2,2	13,0	11,5
15	4,7	3,7	4,7	4,6	6,0	4,2	<u>0,3</u>	0,5	<u>0,0</u>	0,0	<u>0,0</u>	0,0
20	<u>3,0</u>	4,2	7,0	6,0	10,3	2,5	1,3	1,2	0,3	0,5	4,0	5,0
25	7,5	3,8	6,3	1,9	11,7	0,9	0,3	0,5	1,0	1,4	2,3	3,9
30	10,5	5,7	12,3	4,1	17,0	2,4	2,7	2,1	2,3	0,9	0,3	0,5
35	13,8	13,3	18,3	4,9	<u>27,7</u>	6,1	21,3	13,3	<u>12,5</u>	3,8	10,8	12,3
40	<u>19,3</u>	3,7	<u>19,3</u>	4,0	25,7	6,9	<u>26,3</u>	11,9	11,7	5,0	<u>23,0</u>	15,3
45	9,0	2,8	6,5	3,0	14,3	2,5	1,0	1,4	2,8	2,3	5,3	3,9
50	6,3	5,4	14,7	7,0	27,7	9,0	18,3	11,2	8,3	6,6	15,3	9,5
55	4,8	7,1	<u>0,5</u>	0,5	<u>3,7</u>	1,9	0,8	1,3	<u>0,0</u>	0,0	<u>0,0</u>	0,0
60	<u>3,8</u>	4,3	14,0	7,8	11,7	5,7	<u>0,3</u>	0,5	5,0	7,0	4,3	2,5
70	5,6	4,5	18,7	6,6	17,0	3,3	5,5	6,9	6,0	7,8	6,0	7,8
80	5,8	4,7	15,0	4,3	14,0	4,6	1,7	2,4	13,0	7,1	5,0	7,0
90	<u>12,5</u>	11,5	<u>23,5</u>	7,2	<u>31,0</u>	4,1	<u>21,5</u>	11,7	<u>17,8</u>	8,6	<u>11,7</u>	5,2
\emptyset	8,1	4,9	12,0	7,0	17,0	9,6	9,1	11,0	7,1	7,3	8,1	7,3



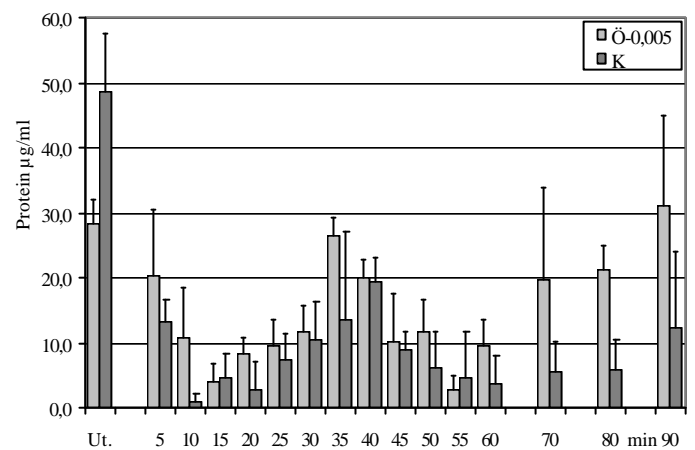
(1) Östradiol 5 ng/ml



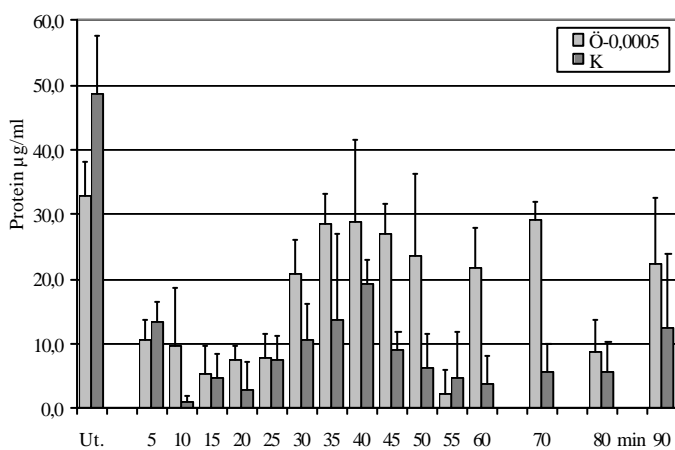
(2) Östradiol 0,5 ng/ml



(3) Östradiol 0,05 ng/ml



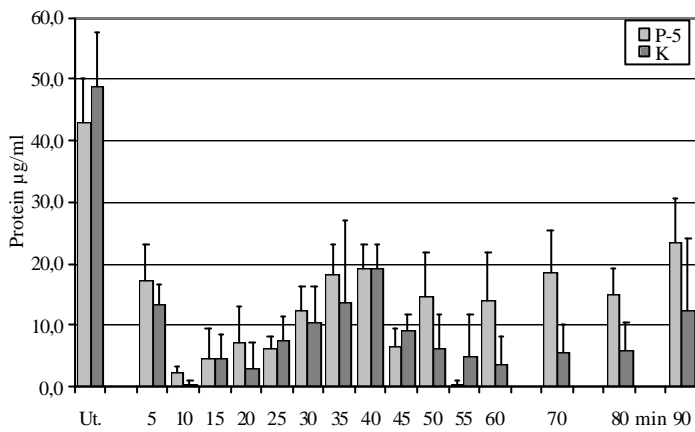
(4) Östradiol 0,005 ng/ml



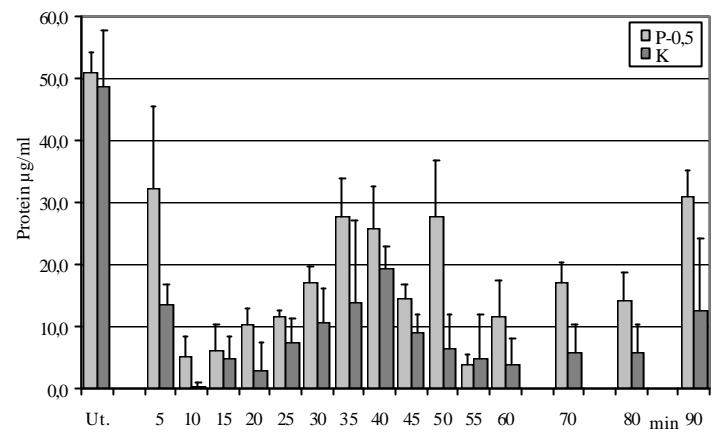
(5) Östradiol 0,0005 ng/ml

Abbildung 4.3

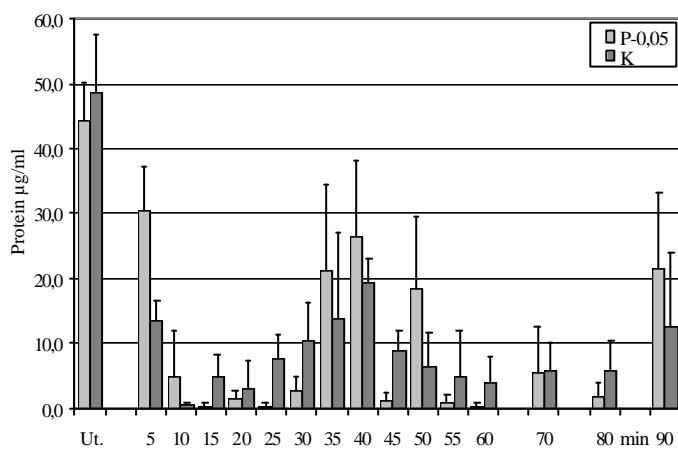
Proteinkonzentration in den Superfusaten nach Östradiolbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (K)



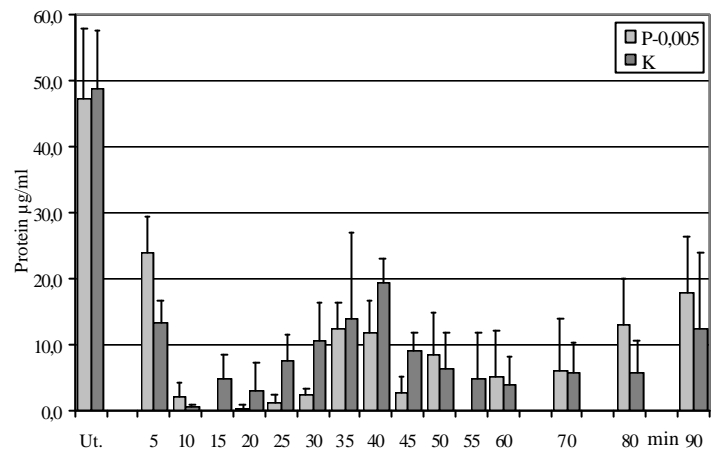
(1) Progesteron 5 µg/ml



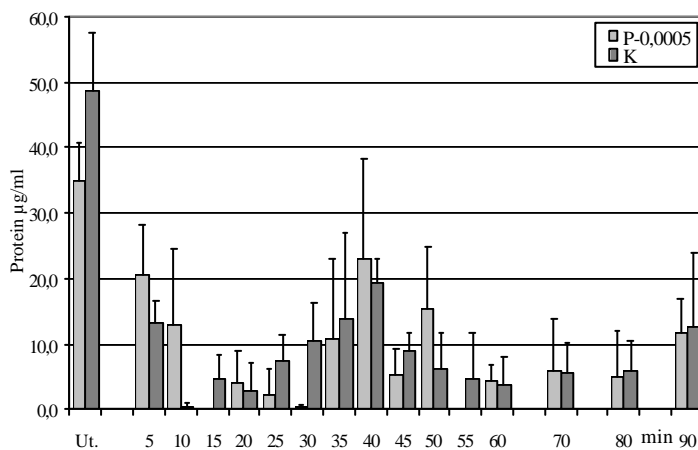
(2) Progesteron 0,5 µg/ml



(3) Progesteron 0,05 µg/ml



(4) Progesteron 0,005 µg/ml



(5) Progesteron 0,0005 µg/ml

Abbildung 4.4

Proteinkonzentration in den Superfusaten nach Progesteronbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen, im Vergleich zur Kontrolle (K)

4.2.6 Elektrophoretische Proteinmusterbestimmung der Superfusate

Mit der SDS-PAGE kann nachgewiesen werden, ob die biphasische Schwankung der Proteinkonzentration durch spezifische Proteine hervorgerufen wird oder ob in Abhängigkeit vom Hormon und dessen Konzentration mehrere Proteine verschieden stark auftreten.

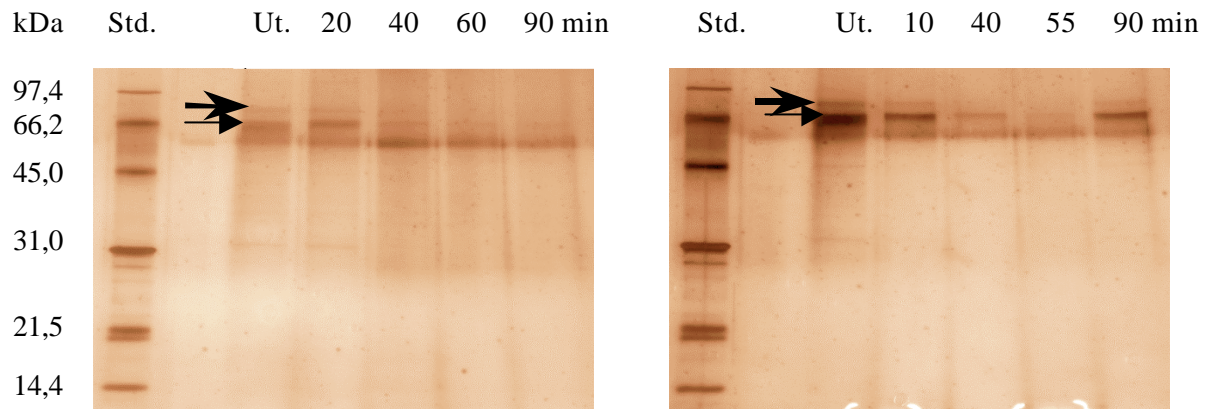
Nach der Konzentrierung der Proben ist die elektrophoretische Darstellung der Proteine möglich.

Bei jeder Behandlung wird die Uteruspülprobe aufgetrennt. Weiterhin werden die Proben mit den niedrigsten und den höchsten Proteinkonzentrationen bearbeitet (Tab. 4.1; Tab. 4.2; unterstrichene Proteinkonzentrationen). Die Darstellung der elektrophoretischen Aufspaltung erfolgt im Molekulargewichtsbereich zwischen 14,4 - 97,3 kDa (Abb. 4.5, Abb. 4.6).

Bei allen aufgetrennten Proben zeigt sich, daß in der Uteruspülprobe das Proteinmuster am vielfältigsten ist. Zwischen 66,2 - 97,3 kDa tritt ein Protein (Protein 1) auf, das sich schwach darstellt. Protein 1 ist in den behandelten Superfusaten meistens nicht zu finden, so daß es vermutlich unter Östradiol- oder Progesteroneinfluß nicht oder nur in geringen Mengen gebildet wird, die mit der Silberfärbung nicht nachweisbar sind.

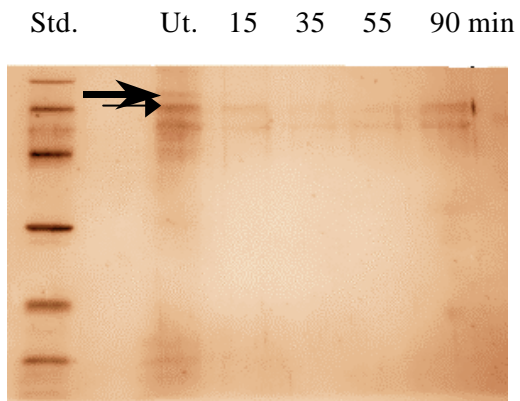
Die meisten Proteine in den übrigen Superfusaten sind im Bereich 45,0 - 97,3 kDa nachweisbar. Unabhängig von der Behandlung ist in allen Gelen in Höhe 66,2 kDa ein weiteres Protein (Protein 2) zu finden, das mit unterschiedlicher Bandenbreite relativ stark auftritt. Es ist anzunehmen, daß dieses Protein für die biphasische Schwankung verantwortlich ist.

Bei Ö-0,05 ist das Proteinmuster im Gegensatz zu den anderen Behandlungen vielfältiger. Besonders bei der 40 Minuten-Fraktion sind im Bereich zwischen 66,2 – 44 kDa viele Proteinbanden darstellbar.

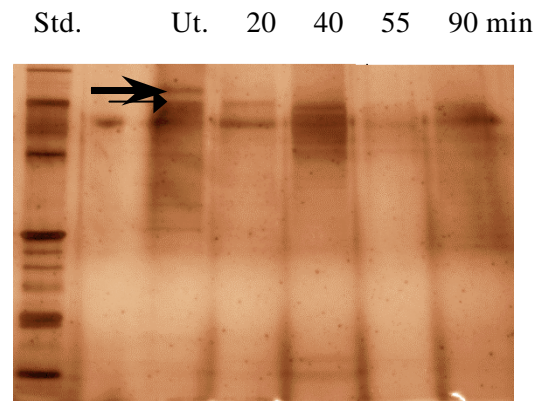


(1) Kontrolle

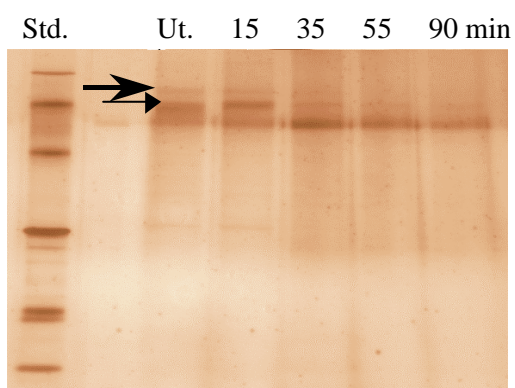
(2) Östradiol 5 ng/ml



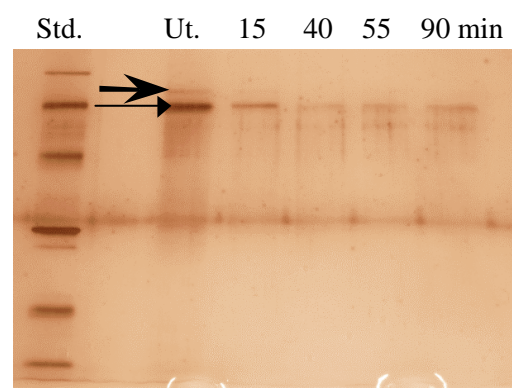
(3) Östradiol 0,5 ng/ml



(4) Östradiol 0,05 ng/ ml



(5) Östradiol 0,005 ng/ml



(6) Östradiol 0,0005 ng/ ml

Abbildung 4.5 Proteinmuster in der Uterusflüssigkeit der Maus nach Behandlung mit verschiedenen Östradiolkonzentrationen, SDS-PAGE, Silbernitratfärbung

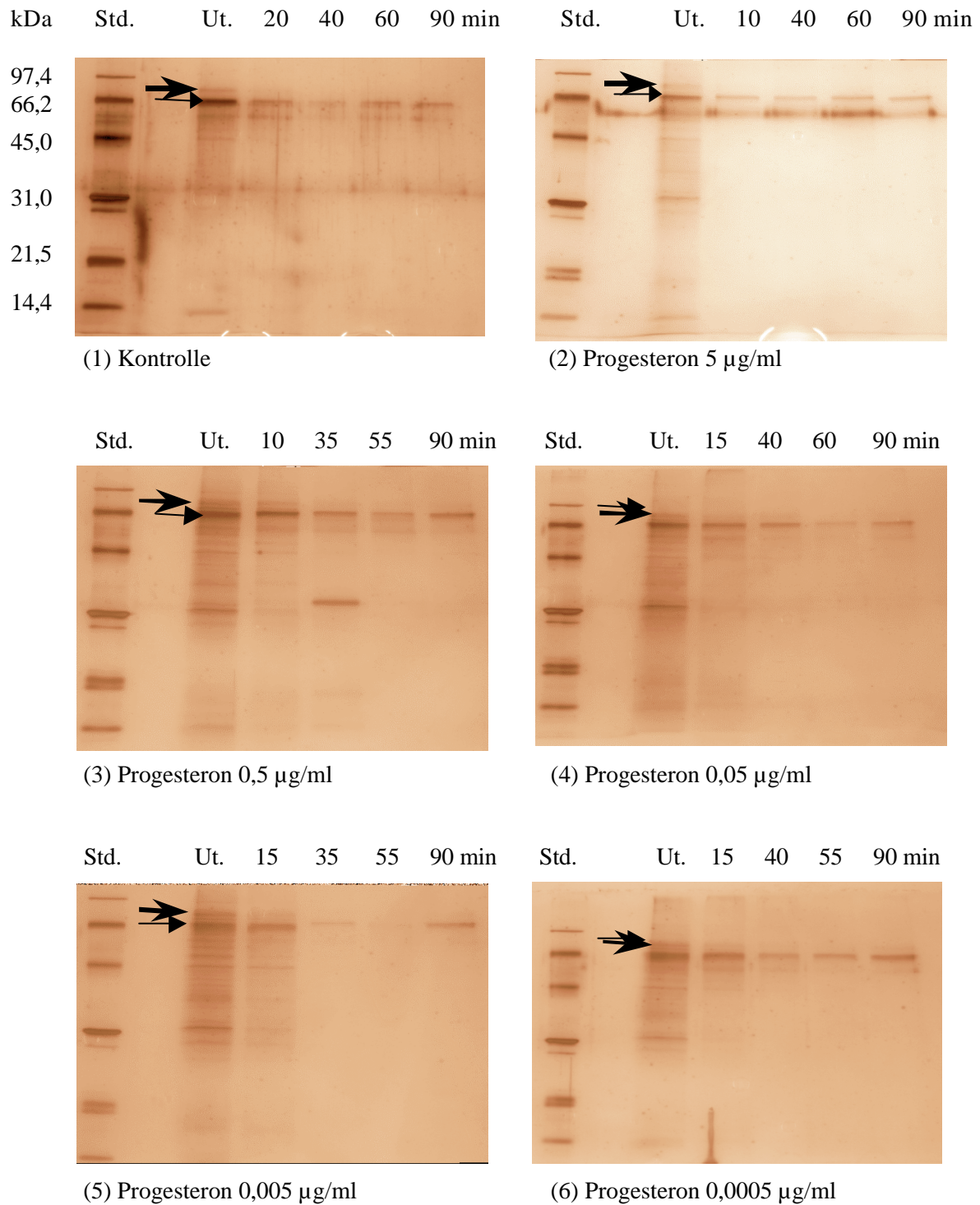


Abbildung 4.6 Proteinmuster in der Uterusflüssigkeit der Maus nach Behandlung mit verschiedenen Progesteronkonzentrationen, SDS-PAGE, Silbernitratfärbung
 → - Protein 1; → - Protein 2; Std. – Molekulargewichtsstandard;
 Ut. – Uterusspülung mit NaCl

4.2.7 Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchung

Zur Analyse der Peptidzusammensetzung wurden zwei dominierende Proteinbanden (Protein 1 und Protein 2) nach der elektrophoretischen Aufspaltung mittels SDS-PAGE ausgeschnitten und massenspektrometrisch im MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 4.7, Abb. 4.8).

Protein 1 (Abb. 4.5, Abb. 4.6, →)

Nach der Aufspaltung und einer vergleichenden Analyse mit Peptidmustern bekannter Proteine wurde Protein 1 als Laktoferrin identifiziert. Die Molekülgröße beträgt ca. 65 – 70 kDa. Die Laktoferrin-Bande ist meistens nur in der Uterusspülung vorhanden. Bei Ö-5 (Abb. 4.5 (2)) ist sie ganz schwach in der 10 Minuten Fraktion sichtbar. In Abb. 4.7 ist eine massenspektroskopische Auftrennung der einzelnen Peptide des Laktoferrins dargestellt.

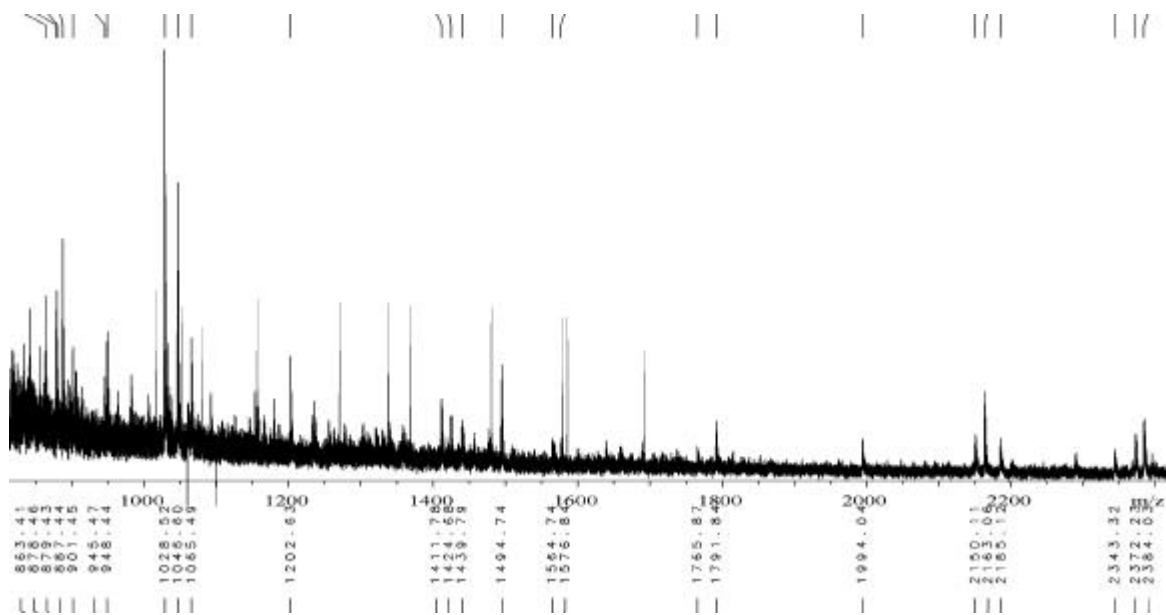


Abbildung 4.7 Peptidmuster des Laktoferrins aus dem Superfusat der Uterusflüssigkeit der Maus, analysiert durch MALDI-TOF-MS

Protein 2 (Abb. 4.5, Abb. 4.6, →)

Dieses Protein hat eine Molekülmasse von ca. 66 kDa und entspricht Maus-Serumalbumin. Es ist in allen Proben deutlich vorhanden und hauptsächlich für die Änderung der Proteinkonzentrationen verantwortlich, da sich die Banden in den einzelnen Spüllösungen mit unterschiedlicher Intensität darstellen. Konzentrationsänderungen dieses Proteins treten bei

beiden Behandlungen auf. Es ist kein deutlicher Unterschied zwischen der Östrogen- und Progesterongabe sichtbar. In Abb. 4.8 ist eine massenspektroskopische Auftrennung einzelner Peptide des Maus-Serumalbumins dargestellt.

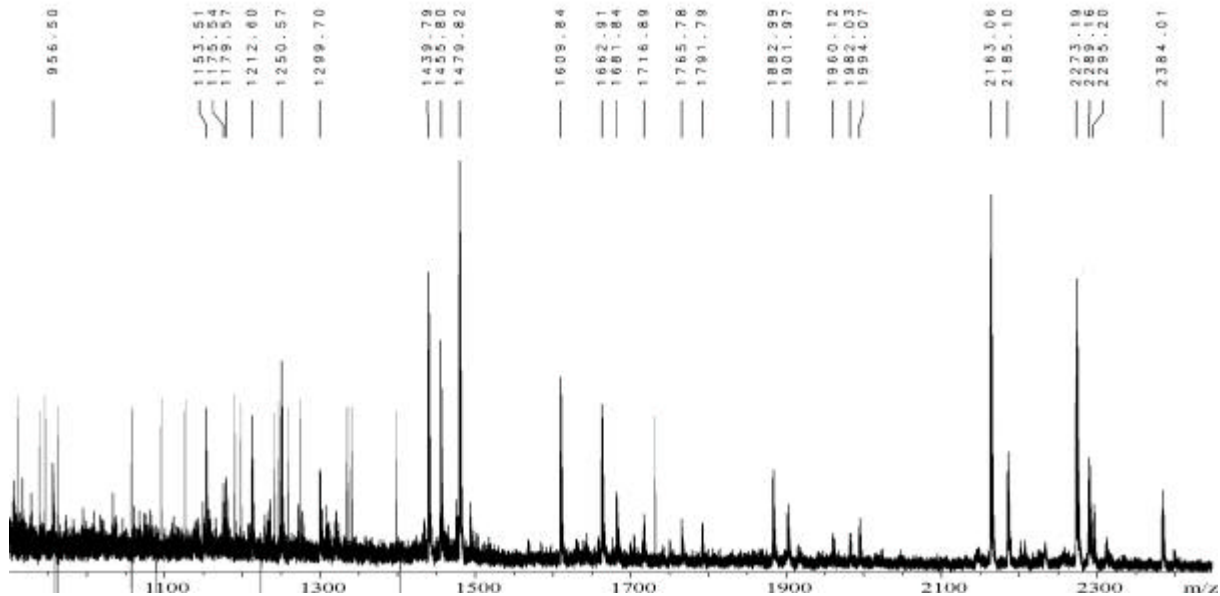


Abbildung 4.8 Peptidmuster des Maus-Serumalbumins aus dem Superfusat des Uterus der Maus, analysiert durch MALDI-TOF-MS

4.3 Die Expression des Progesteronrezeptors (PR) im Uterus der Maus

Der PR-Nachweis wurde an je 2 Uteri einer Behandlungsgruppe durchgeführt (3.2.6). Die Auswertung erfolgt durch die Ermittlung des Immun-Reactiv-Score (IRS), der semiquantitativ am Prozentsatz positiver Zellen und der Farbintensität bestimmt wird. Der IRS kann einen Wert zwischen 0 – 12 annehmen. Als spezifische Färbung wird eine Reaktion beurteilt, bei der sich braune Granula im Zellkern darstellen.

Hellbraune, homogene Färbungen im Zytoplasma des Epithels sind als unspezifische Reaktionen zu werten, da diese auch in den Negativ-Kontrollen vorkommen.

Folgende aufgeführte Gewebelokalisationen werden getrennt voneinander beurteilt:

Endometrium Lamina epithelialis mucosae

Stroma der Lamina propria mucosae

Glandulae uterinae der Lamina propria mucosae

Myometrium

Die PRs zeigen sich mit dem hier verwendeten monoklonalen Antikörper ausschließlich im Zellkern. Bei den verschiedenen Hormonbehandlungen treten Veränderungen der Qualität und Quantität der PRs auf.

4.3.1 Progesteronrezeptorstatus der Lamina epithelialis mucosae

Unabhängig vom Hormon und dessen Konzentration ist der IRS des luminalen Uterusepithels während des Östrus bei allen Präparaten null (Abb. 4.9, Abb. 4.10). Es ist kein PR nachweisbar.

4.3.2 Progesteronrezeptorstatus der Glandulae uterinae der Lamina propria mucosae

In Abhängigkeit vom superfundierten Hormon und dessen Konzentration zeigen sich Veränderungen des IRS in den uterinen Drüsenzellen.

Die Superfusion mit Ö-5 und Ö-0,05 hat als Ergebnis einen IRS von 1 bzw. 2, der höher als bei Ö-0,0005 und der K ist (Abb. 4.9). Bei diesen beiden Behandlungen ist der IRS null. Sowohl bei Ö-5 als auch bei Ö-0,05 wird die Anzahl der PRs gesteigert, wobei die Anzahl bei Ö-0,05 ca. 2,5 mal höher ist als bei Ö-5. Die Kernfärbung ist bei Ö-0,05 ebenfalls kräftiger.

Bei der Progesteronbehandlung entsteht ein ähnliches Bild wie bei Östradiol. Bei P₄-5 und P₄-0,0005 ist der IRS = 1. Die Zellkerne der Drüsen sind schwach gefärbt. Unter P₄-0,0005 färben sich mehr Kerne als bei P₄-5. Bei P₄-0,05 steigt der IRS auf 4, was durch eine starke quantitative Erhöhung der Rezeptoren in den Zellkernen zu erklären ist (Abb. 4.10). Die Farbintensität ist mäßig.

4.3.3 Progesteronrezeptorstatus des Stroma endometrii

Bei Ö-5 sind ca. 32 % der Zellkerne stark braun gefärbt, wodurch sich ein IRS von 6 errechnet. Unter Ö-0,05 sinkt der IRS auf 4. Hier sind ca. 27 % der Zellkerne mäßig braun gefärbt (Abb. 4.9). Bei Ö-0,0005 und K sind keine PRs im Stroma zu finden.

Bei P₄-5 färben sich die meisten Zellkerne des Stromas (ca. 37 %) kräftig an (IRS = 6). Bei den geringeren Progesteronkonzentrationen sinkt der IRS ab, wobei P₄-0,0005 (IRS = 4) einen höheren IRS als P₄-0,05 (IRS = 2) besitzt, da sich die Zellen intensiver anfärben (Abb. 4.10).

4.3.4 Progesteronrezeptorstatus des Myometriums

Hier sind das einzige Mal PRs (IRS = 2) bei der Kontrollbehandlung nachweisbar (Abb. 4.11 (1), Abb. 4.12 (1)).

Bei der Behandlung mit Östradiol schwankt der IRS zwischen 0 – 6. Dabei haben Ö-5 und Ö-0,05 den höchsten IRS (IRS = 6). Bei beiden Behandlungen ist die Farbintensität kräftig (Abb. 4.11). Bei 0,0005 ng Östradiol/ml Medium ist der IRS = 0, d.h. es sind keine PRs sichtbar.

Unter Progesteron kommt es bei sinkender Konzentration zur Steigerung der PRs im Myometrium (Abb. 4.12). Der IRS hat bei P₄-0,0005 einen Wert von 6, was den höchsten IRS-Wert innerhalb dieser Behandlungsgruppe im Myometrium darstellt. Ca. 46 % der Zellen sind stark gefärbt. Bei den beiden anderen Konzentrationen (P₄-5; P₄-0,05) sinkt der IRS auf 4 ab. Die Anzahl der gefärbten Zellkerne sinkt geringfügig. Die Farbintensität ist schwächer.