

---

## 5 Diskussion

### Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines *ex vitro*-Modells, um den Einfluß von Östradiol und Progesteron in verschiedenen Konzentrationen am isolierten Uterus der Maus zu untersuchen. Nach der Superfusion mit verschiedenen Hormonkonzentrationen wurde in den fraktioniert aufgefangenen Superfusaten die Proteinkonzentration bestimmt und durch eine Gelelektrophorese das Proteinmuster ermittelt. Zwei Proteinbanden wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert. Die durchspülten Uteri wurden für die immunhistologische Bestimmung des Progesteronrezeptors (PR) und für den molekularbiologischen Nachweis des CytochromP26 (CYP26) genutzt.

Für die Untersuchungen standen 45 Uterushörner von NMRI-Mäusen zur Verfügung, die sich im Östrus befanden. Die Bestimmung des Zyklusstadiums erfolgte durch einem vaginalen Abstrich.

Um mehrere Hormonkonzentrationen untersuchen zu können, wurden die Uteri in 11 Gruppen geteilt. Aufgrund der geringen Gruppengröße sind bei der Bewertung der PRs und des CYP26 keine statistisch gesicherten Rückschlüsse möglich. Die kleinen Gruppen und die Individualität der Versuchstiere führten zudem zu großen Standardabweichungen.

### 5.1 Die Superfusionslösungen

Die methodische Grundlage der Untersuchung bildete die Superfusion des Uterus der Maus. Die Superfusionslösungen wurden an die Serumkonzentration der Maus im Östrus angepaßt, so daß annähernd eine physiologische Konzentration (Ö-0,05 bzw. P<sub>4</sub>-0,05), je eine 10- (Ö-0,5 bzw. P<sub>4</sub>-0,5) und 100-fach-(Ö-5 bzw. P<sub>4</sub>-5) höher dosierte Lösung sowie eine 10- (Ö-0,005 bzw. P<sub>4</sub>-0,005) und 100-fach-(Ö-0,0005 bzw. P<sub>4</sub>-0,0005) niedriger dosierte Lösung benutzt wurde.

Die Serumkonzentrationen beider Hormone schwanken, abhängig vom Zyklusstadium, so daß unterschiedliche Konzentrationen in der Literatur angegeben sind. Die Ursache der Schwankung ist zum Teil rassebedingt (Allen, 1922; DeLeon et al., 1990). Zwischen dem späten Östrus und dem späten Metöstrus liegt die Östradiolkonzentration im Serum bei etwa 20 pg/ml. Danach steigt sie steil an und erreicht zum Proöstrus die höchste Konzentration (88 pg/ml Serum). Zu Beginn des Östrus beträgt die Konzentration ca. 25 pg/ml (Butcher et al., 1974). Walmer et al. (1992) beschrieben im Östrus eine Östradiolkonzentration von 40 pg/ml Serum. Die Progesteronkonzentration im Serum der Maus zeigt im Zyklus einen

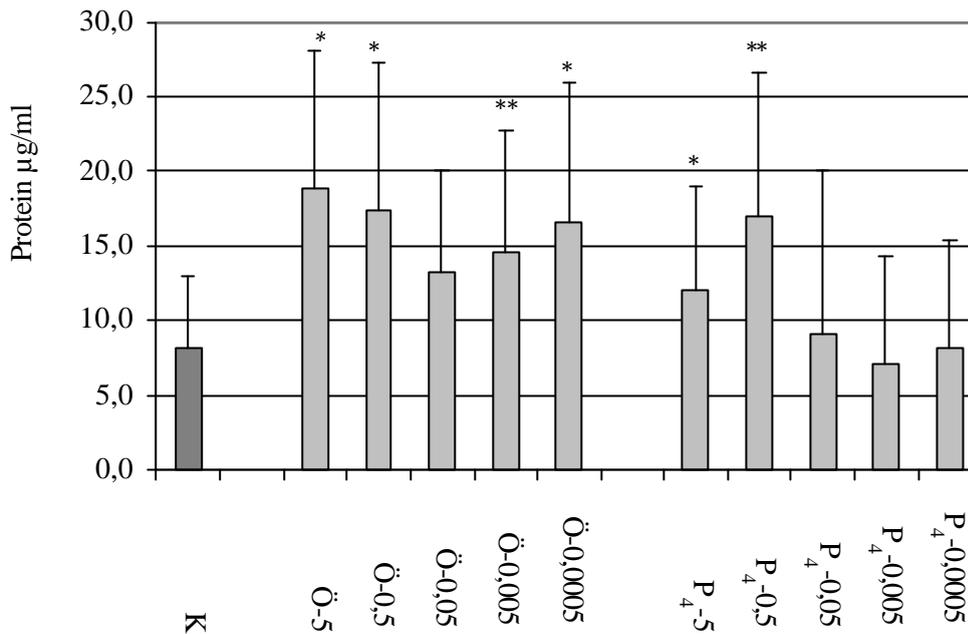
---

biphasischen Verlauf (Bailey, 1987; Michael, 1976). Der erste Gipfel, mit ca. 24 ng/ml tritt im Diöstrus auf und repräsentiert die kurze Tätigkeit der Corpora lutea. Danach sinkt die Konzentration auf ca. 5 ng/ml Serum ab. Beim präovulatorischen Peak im Proöstrus (46 ng/ml) steigt die Konzentration stark an und sinkt zum Östrus hin langsam auf 6 ng/ml Serum ab (Butcher et al., 1974). Walmer et al. (1992) gaben die Progesteronkonzentration im Östrus mit 6 ng/ml Serum an. DeLeon et al. (1990) fanden in der frühen Phase des Östrus ca. 43 ng/ml Serum.

## **5.2 Die Proteine der Uterusflüssigkeit unter Steroidhormon-Einfluß**

Die endometriale Sekretion ist für die Entwicklung der Zygote über die Morula zur Blastozyste und für den Prozeß der Implantation wichtig (MacLaughlin und Richardson, 1983). Dabei unterscheiden sich die endometrial sekretierten Proteine von denen im Blutplasma. Das Proteinmuster im Uterus korreliert mit den zyklischen Konzentrationsänderungen der im Blut zirkulierenden Steroidhormone (MacLaughlin et al., 1986; Roberts und Bazer, 1988). Östrogene und Progesteron regulieren Synthese und Sekretion der uterinen Proteine sowie die Aufnahme und den Transport von Serumproteinen in den Uterus durch das Endometrium (Aitken, 1977; Finlay et al., 1981; Roberts und Bazer, 1988).

Aus den durchgeführten Untersuchungen ist ersichtlich, daß die Gesamtproteinkonzentration in Abhängigkeit vom Hormon und dessen Konzentration variiert. Bei den hoch und niedrig dosierten Östradiol- bzw. den hoch dosierten Progesteronkonzentrationen ist eine signifikante Steigerung der Proteinmenge im Vergleich zur Hormon-freien Behandlung (K) nachweisbar (Abb. 5.1).



**Abbildung 5.1** Mittlere Gesamtproteinkonzentration der aufgefangenen Superfusat der superfundierten Mäuseuteri in Abhängigkeit vom Hormon und dessen Konzentration (MW  $\pm$  s), siehe Tab. 4.1; Tab. 4.2

\*:  $p \leq 0,050$  gegenüber K; \*\*:  $p \leq 0,010$  gegenüber K

**Östrogene** stimulieren verschiedene intrazelluläre Mechanismen im humanen Endometrium, z.B. die Synthese der Alkalischen Phosphatase oder der Kreatinkinase (Holinka und Gurpide, 1981; Kaye et al., 1981). Bei graviden Mäusen, Mäusen mit verzögerter Implantation, ovariectomierten Ratten und Ponystuten kommt es unter Östradioleinfluß zur Steigerung der luminalen Proteine in der uterinen Flüssigkeit (Surani, 1975; Aitken, 1977; McDowell et al., 1987). Bei graviden Mäusen wird die steigende intrauterine Proteinkonzentration bis zum sechsten Tag der Trächtigkeit durch Östradiol induziert, dessen Konzentration einen Tag vor der Implantation im Serum am höchsten ist (McCormack und Greenwald, 1974; Gore-Langton und Surani, 1976). Weiterhin steigert Östradiol die Proteinkonzentration der uterinen Flüssigkeit während der Diapause (Aitken, 1977). In humanen Endometrium-Zellkulturen führt die Zugabe von Östradiol zu einer dosisabhängigen Freisetzung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  im sekretorischen, aber nicht im proliferativen Endometrium (Abel und Baird, 1980).

Bei allen Östradiolbehandlungen wurde im Versuch nachgewiesen, daß die Proteinkonzentration in den Spülflüssigkeiten anstieg. In Abb. 5.1 ist ein U-förmiger Verlauf der Gesamtproteinkonzentration bei den verschiedenen Östradiolkonzentrationen (Ö-5 bis Ö-0,0005)

---

erkennbar. Hoch und niedrig dosierte Östradiolkonzentrationen beeinflussten die Proteinkonzentration stark positiv. Ö-0,05 hatte den schwächsten anregenden Effekt. Die Steigerung kann durch verschiedene Effekte hervorgerufen werden. Östradiol hat einen direkten Einfluß auf die Drüsenzellen und das Epithel des Endometriums (Martin und Finn, 1970a; Oettel, 1985), was die Sekretion verschiedener Proteine steigern könnte (Beier und Beier-Hellwig, 1973). Weiterhin ist es möglich, daß die Proteine durch *de novo*-Synthese entstehen. So konnte das „induced protein“ (IP), ein uterines Protein der ovariectomierten Ratte, 40 min nach Östradiolgabe im Uterus nachgewiesen werden. IP wird in dieser Zeit neu synthetisiert (Barnea und Gorski, 1970). Es ist nicht auszuschließen, daß die Proteine ebenfalls aus einwandernden Entzündungszellen, die durch Östradiol vermehrt aktiviert werden, ansteigen (De et al., 1992).

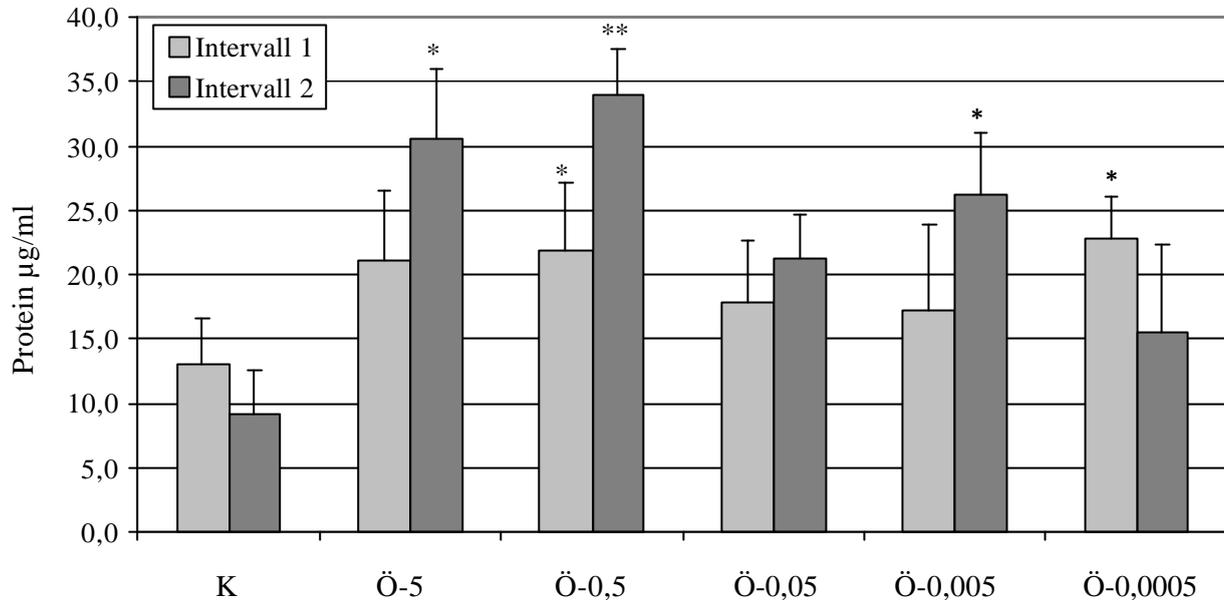
Östradiol diffundierte bei Ö-5 und Ö-0,5 schnell ins Gewebe. Intrazellulär wirksame Konzentrationen wurden in kürzester Zeit erreicht und eine schnellere und/oder stärkere Freisetzung der Proteine war möglich. Bei Ö-0,05, Ö-0,005 und Ö-0,0005 wurde der physiologische Hormonspiegel im Blut annähernd erreicht bzw. unterschritten. Die Steigerung der Proteinkonzentration bei diesen Östradiolkonzentrationen resultierte wahrscheinlich aus einer positiv unterstützenden Hormonwirkung.

Anhand des biphasischen Verlaufes der Proteinkonzentration der einzelnen Superfusatfraktionen (Abb. 4.3) wird deutlich, daß die stärksten Veränderungen bei Östradiol in den letzten 20 min der Behandlung auftraten. Zwischen der 26. – 45. Minute (Intervall 1) bewirkte jede Östradiolkonzentration eine ca. 1,5-fache Steigerung der Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5.2). In dieser Zeit hatten alle Konzentrationen annähernd den selben anregenden Effekt auf den Uterus. Bei Ö-0,5 ( $p=0,043$ ) und Ö-0,0005 ( $p=0,011$ ) ist die Wirkung im Vergleich zur Kontrolle signifikant und die Proteinkonzentrationen stiegen um etwa das 1,7-fache.

In den letzten 20 min (Intervall 2, 71. – 90. Minute) führten unterschiedliche Östradiolkonzentrationen zu einer variierenden Proteinerhöhung. Geringe Östradiolkonzentrationen (Ö-0,05 bis Ö-0,0005) bewirkten einen 2 – 2,5-fachen Proteinanstieg. Bei den hoch dosierten Konzentrationen erfolgte eine ca. 3,7-fache Steigerung der Proteinmenge. Die ermittelte Proteinkonzentration im Intervall 2 ist bei Ö-5 ( $p=0,017$ ), Ö-0,5 ( $p=0,006$ ) und Ö-0,005 ( $p=0,050$ ) signifikant. Der Anstieg der Proteinkonzentration deutet darauf hin, daß in den

letzten 20 min des Versuches Östradiol einen verstärkt positiven Effekt auf den Uterus hatte. Höhere Konzentrationen hatten in dieser Zeit eine stärkere Wirkung (Abb. 5.2).

Die erhöhte Gesamtproteinkonzentration erlaubt keine Aussage über den Ursprung der Proteine. Sie können durch Sekretion, *de novo*-Synthese oder zunehmende Permeabilität der Gefäße steigen.



**Abbildung. 5.2** Gesamtproteinkonzentration in den Superfusaten der Intervalle 1 und 2 nach Östradiolbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu K (MW  $\pm$  s)

Intervall 1: 26. – 45. Minute; Intervall 2: 71. – 90. Minute

\*:  $p \leq 0,050$  gegenüber K; \*\*:  $p \leq 0,010$  gegenüber K

**Progesteron** bewirkt bei der Maus den Verschluss des uterinen Lumens und hemmt die Zellteilung des luminalen Epithels (Martin et al., 1970b).

In der ersten Hälfte der Lutealphase wird die Proliferation der epithelialen- und Stromazellen durch steigende Progesteronkonzentrationen gehemmt. In der späten Lutealphase proliferiert das Stroma. Die Proliferation wird durch hohe Progesteronspiegel verursacht und vermutlich durch eine kontinuierliche Expression der PRs in diesen Zellen vermittelt (Press et al., 1988). Die Proliferation erfolgt über eine zellspezifische Expression und Regulation der Rezeptoren der Wachstumsfaktoren. So wird die Bildung der mRNA des EGF in den uterinen Stromazellen durch Progesteron gefördert, während sie im glandulären und luminalen Epithel gehemmt wird (Zhang et al., 1994).

---

Progesteronbehandlungen bei Ponystuten mit verschiedenen Konzentrationen führen zu einer Steigerung des Gesamtproteins. Es wird keine Dosisabhängigkeit festgestellt (McDowell et al., 1987).

Progesteron hatte keine bis mittelgradig positive Effekte auf die Proteinkonzentration (Abb. 5.1). Höhere Konzentrationen führten zu einer Steigerung der Proteinmenge im Superfusat. Die 10-fach hoch dosierte Progesteronlösung hatte den stärksten Einfluß. Die hohen Progesteronkonzentrationen könnten den präovulatorischen Peak bei der Maus nachahmen (Butcher et al., 1974). Steigende Progesteronkonzentrationen führen während des Sexualzyklus zur Umwandlung des proliferativen Endometriums in ein sekretorisches, um den Uterus auf eine Implantation vorzubereiten (Silbernagel, 2001). Dadurch werden vermehrt Proteine frei, die für die Entwicklung der Blastozyste genutzt werden (Graham und Clarke, 1997). Weiterhin ermöglicht Progesteron die Stimulation von Enzymen, die für die Lyse der Zona pellucida verantwortlich sind (Rothchild, 1993). Die Zellproliferation des Uterus in der frühen Gravidität wird durch lokal gebildete Wachstumsfaktoren vermittelt, die unter Progesteronkontrolle stehen. Die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren dienen als Promotor der Proliferation und Differenzierung von Endometrium und embryonalen Zellen. Die Sekretion des Wachstumsfaktors durch luminales und glanduläres Epithel im Endometrium der Maus unterstützt die Proliferation der EGF-Rezeptor-positiven Blastozyste, um eine Implantation zu gewährleisten (Das et al., 1994).

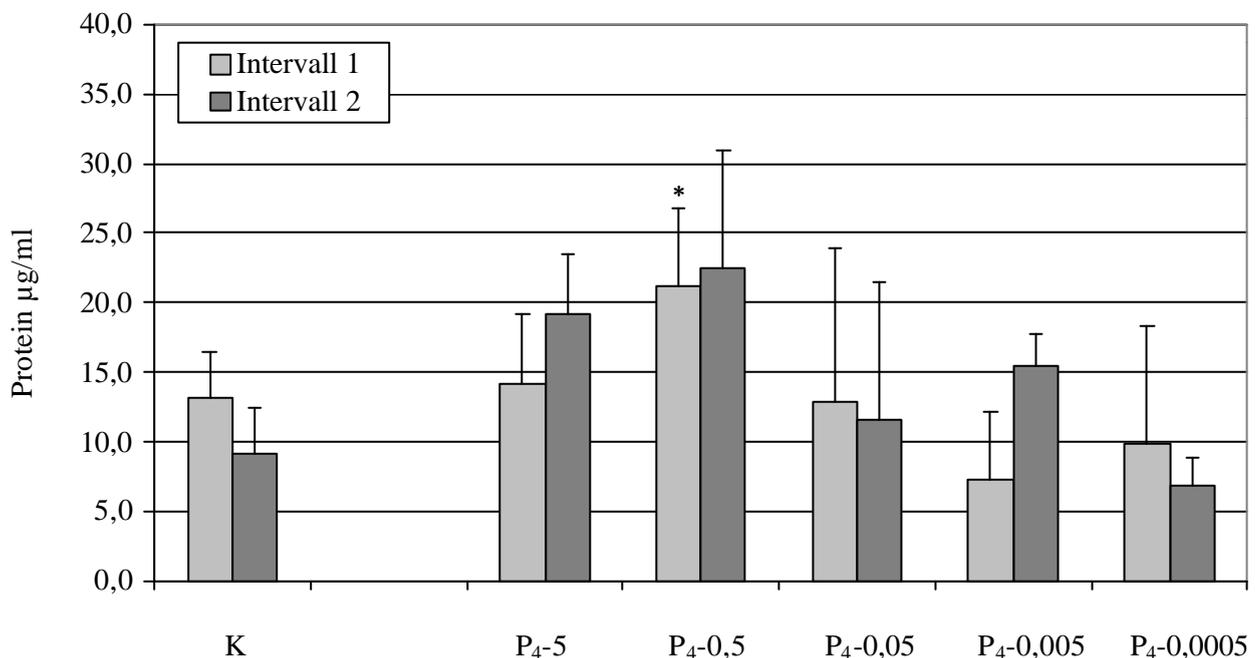
Die physiologische Konzentration bewirkte im Versuch einen sehr schwachen Proteinanstieg. Niedrig dosierte Konzentrationen ( $P_4-0,005$ ;  $P_4-0,0005$ ) zeigten fast keine steigenden Effekte (Abb. 5.1). Es wurden vergleichbare Mengen an Protein wie in der Kontrolle gebildet.

Im Östrus ist der Uterus sensibel für Östradiol und bereitet sich auf steigende Progesteronkonzentrationen vor. Vermutlich hatten diese drei Behandlungen zu geringe Progesteronkonzentrationen, um einen positiven Effekt auszulösen. Bei diesen Konzentrationen ist die Anflutung gering und wirksame Progesteronkonzentrationen werden sehr spät bzw. gar nicht erreicht. Es könnte eine stark verzögerte oder keine Wirkung eintreten. Bei höheren Progesteronkonzentrationen wurden wirksame Hormonspiegel schnell erreicht. Drüsenepithel und Stroma endometrii könnten schneller aktiviert werden, wodurch mehr Protein freigesetzt werden könnte.

Morphologische Veränderungen werden bei steigenden Progesterongaben zuerst in den Drüsen beobachtet. Es folgt eine gesteigerte Sekretion von Proteinen (Bergeron et al., 1988). Andere Autoren finden im Uterus der Maus bei kombinierter Östradiol- und Progesterongabe eine gesteigerte Mitoserate im Epithel des Endometriums. (Martin und Finn, 1970a).

Da sich die Mäuse im Östrus befanden ist es möglich, daß Östradiol und exogenes Progesteron die Konzentration an Gesamtprotein synergistisch beeinflussten. Östradiol- und Progesteron in Kombination führen bei ovariectomierten Stuten zu einer starken Zunahme der Gesamtproteinkonzentration (McDowell et al., 1987).

Durch die verschiedenen Progesteronkonzentrationen wird eine annähernd kontinuierliche Proteinfreisetzung im Östrus hervorgerufen (Abb. 5.3). Intervall 1 und Intervall 2 sind bei den einzelnen Progesteronbehandlungen nahezu gleich und unterscheiden sich bei  $P_4$ -0,05 bis  $P_4$ -0,0005 von der Hormon-freien Kontrolle nur gering. Bei  $P_4$ -5 und  $P_4$ -0,005 steigt die Proteinkonzentration im Intervall 2 vermehrt.  $P_4$ -0,5 weist bei beiden Intervallen einen erhöhten Proteinanstieg auf. Dieser ist bei Intervall 1 ( $p=0,041$ ) signifikant zur Kontrolle.



**Abbildung. 5.3** Gesamtproteinkonzentration in den Superfusaten der Intervalle 1 und 2 nach Progesteronbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu K (MW  $\pm$  s)  
Intervall 1: 26. – 45. min; Intervall 2: 71. – 90. Min

\*:  $p \leq 0,050$  gegenüber K

---

### 5.3 Elektrophoretische und massenspektrometrische Betrachtung

Der Hauptteil der Proteine in der uterinen Flüssigkeit stammt aus dem Blut (Wolf und Mastroianni, 1975). Einige Proteine sind immer in der uterinen Flüssigkeit und werden vom Ovidukt, dem Uterus oder der Peritonealhöhle unter Östradiol- und Progesteroneinfluß gebildet (Beier und Beier-Hellwig, 1973; Beier, 1974; Casslen, 1986). Die Änderung des Proteinmusters der uterinen Flüssigkeit erfolgt durch *de novo*-Synthese, selektive Sekretion von verschiedenen Proteinen durch das Epithel oder durch Transsudation in das uterine Lumen (Urzua et al., 1970; Beier, 1974). Proteine aus dem Blutserum oder den angrenzenden Geweben werden über spezifische Transportsysteme durch das Epithel in das Lumen des Uterus abgegeben (MacLaughlin et al., 1986).

Die Bestimmung des Proteinmusters durch elektrophoretische Aufspaltung der Superfusate zeigte, daß die Proteinkonzentration im Uterus unbehandelter, zyklischer Mäuse sehr gering war. Die unbehandelte Uterusflüssigkeit hatte das vielfältigste Proteinmuster, welches sich vorwiegend im Molekulargewichtsbereich zwischen 97,4 – 31,0 kDa darstellte. Zwei Proteine wurden durch die Silberfärbung deutlich, die mittels MALDI-TOF-MS als Maus-Serumalbumin und Laktoferrin bestimmt wurden.

#### 5.3.1 Maus-Serumalbumin

Maus-Serumalbumin war in den Superfusaten die elektrophoretisch am deutlichsten darstellbare Fraktion. Albumin ist im Östrus die größte Proteingruppe der uterinen Flüssigkeit (Beier, 1974), und hat ein Molekülmasse von 68 kDa.

Fraktionierte Untersuchungen der uterinen Flüssigkeit bis 48 Stunden nach der Östradiolgabe zeigen einen biphasischen Verlauf der Proteinkonzentration. In den ersten zwölf Stunden werden hauptsächlich hochmolekulare Proteine gefunden, die meistens dem Serum entstammen. Die Ursache ist eine Steigerung der kapillaren Permeabilität, der endometrialen Vaskularisierung und der Ödematisierung des Gewebes. Die Konzentration der uteruspezifischen Proteine steigt erst 40 – 48 Stunden nach der Östradiolverabreichung (Aitken, 1977). Östrogene steigern die extravaskuläre Akkumulation von Albumin im Uterus der Maus (Arvidson, 1977). Untersuchungen mit markiertem Albumin zeigen eine signifikante Steigerungen zwei Stunden nach Östrogengabe. Der Anstieg des Albumins resultiert aus einer vermehrten Permeabilität der perfundierten Kapillaren oder der erhöhten Vaskularisierung des Uterus (Arvidson, 1977).

Geringe Albuminmengen treten dagegen unter Progesteroneinfluß auf (Beier, 1974).

---

Die gleichen Beobachtungen wie bei Aitken (1977) und Beier (1974) zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung. Die Zunahme des Albumins in der uterinen Spülflüssigkeit könnte auf einer gesteigerten Permeabilität der Kapillaren beruhen. Aufgrund der Superfusionsbedingungen ist es dem Uterusgewebe möglich, auf die Hormone zu reagieren. Die Gefäße enthalten noch geringe Mengen Blut, dessen Inhaltsstoffe durch kapillare Permeabilität freigesetzt werden können. Albumin und andere Proteine gelangten ins Superfusat. Östradiol würde stärker als Progesteron wirken und steigerte die Permeabilität vermehrt.

Albumin war in den Superfusaten die größte Fraktion. Vermutlich war dieses Protein für die Konzentrationsunterschiede in den Superfusaten verantwortlich. In den Elektrophorese-Gelen bestätigte sich die ermittelte biphasische Schwankung der Proteinkonzentration nur annähernd (Abb. 4.3 und 4.4). Maus-Serumalbumin zeigte in den Gelen zeitabhängige Konzentrationsänderungen, die nicht vollständig mit den ermittelten Proteinkonzentration korrelierten.

### 5.3.2 Laktoferrin

In der Uterusflüssigkeit tritt neben Serumalbumin weiterhin Laktoferrin auf, das ein östrogenabhängiges, im Uterus synthetisiertes Glykoprotein ist (Pentecost und Teng, 1987). Die elektrophoretische Bestimmung zeigte, daß Laktoferrin eine Molekülgröße zwischen 66 – 97,4 kDa besitzt. Im Uterus der Maus gibt es verschiedene Laktoferrine. Während Teng et al. (1989) die Molekülgröße mit 66 kDa beschreiben, finden Li und Chen (1999) bei 74 kDa zwei verschiedene Proteine in der SDS-Gelelektrophorese, die mit Laktoferrin 1 und Laktoferrin 2 bezeichnet werden. Laktoferrin 1 ist eine verkürzte Form des Laktoferrin 2. Jefferson et al. (2000) wiederum finden in uterinen Homogenaten der Maus eine hohe Konzentration an Laktoferrin mit einer Molekülmasse von ca. 70 kDa und ein zweites Laktoferrin mit geringerer Konzentration bei ca. 60 kDa.

Ein weiteres Laktoferrin tritt in den männlichen Sexualorganen der Maus auf. Es hat eine ähnliche Molekülmasse wie die Laktoferrine der uterinen Flüssigkeit. Die Konzentration steigt bei der Entwicklung des Epididymis. Die mRNA-Menge kann durch Östradiol erhöht werden (Yu und Chen, 1993).

In den unbehandelten, aufgetrennten Superfusions-Lösungen (Abb. 4.5 und 4.6; Ut.) war Laktoferrin elektrophoretisch nachweisbar. Nur bei der Superfusion mit Ö-5 war Laktoferrin ein zweites Mal in der 10 Minuten-Fraktion wesentlich schwächer vorhanden. Hoch dosiert bewirkt Östradiol am isolierten Uterus eine kurzzeitige Freisetzung von Laktoferrin.

---

Pentecost und Teng (1987) behandelten Mäuseuteri drei Tage mit einer hoch dosierten Östrogenkonzentration. Die mRNA-Expression von Laktoferrin erhöht sich dabei um annähernd das 300-fache.

Die Regulation des Laktoferrins ist gewebespezifisch und zyklusabhängig. Bei der Maus ist im Zytoplasma der Epithelzellen des Endometriums und der Drüsen Laktoferrin-mRNA vorhanden (Walmer et al., 1992; Jefferson et al., 2000). Die Bildung der mRNA führt zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion des Laktoferrins im Uterus (Teng et al., 1989). Die RNA-Menge und die Laktoferrin-Protein-Expression steigen in Abhängigkeit zum Östradiolspiegel des Serums im Proöstrus, wenn Progesteron in geringer Konzentration vorhanden ist. Im Gegensatz dazu kommt es im Metöstrus zu einer Steigerung der RNA des Laktoferrins, während das Protein in seiner Konzentration sinkt. Die Translation der Laktoferrin-mRNA in das Protein wird durch Progesteron verzögert (Walmer et al., 1992). Das könnte erklären, warum kein Laktoferrin in den Superfusaten der Progesteron-behandelten Uteri nachweisbar war.

#### **5.4 Die Expression des Progesteronrezeptors (PR)**

Der Progesteronrezeptor im Uterus der Nagetiere wird durch Östradiol und Progesteron beeinflusst. Östradiol steigert die Anzahl der PRs im gesamten Uterus. Progesteron hingegen senkt seine eigene Rezeptordichte und die durch Östradiol hervorgerufenen Wirkungen, indem es die Induktion der Östradiol-responsiven-Elemente hemmt (Bergeron et al., 1988; Bergman et al., 1992; Graham und Clarke, 1997).

Die vorliegenden Ergebnisse über die Anzahl der PRs stimmen meist mit dieser Aussage überein. Diskrepanzen resultieren aus der Nutzung unterschiedlicher Methoden bei der Auswertung. Oft wird der PR im gesamten Uterus ermittelt, ohne die Gewebe einzeln zu betrachten.

Die Expression der PRs erfolgt ausschließlich im Nukleus der Zellen, wie es von verschiedenen Autoren beschrieben ist (Brenner et al., 1990; Hegele-Hartung et al., 1992; Uotinen et al., 1999). Die Rezeptoren stellten sich in der immunhistochemischen Färbung mit DAB als kleine braune Granula dar und unterlagen hormon- und konzentrationsabhängigen Veränderungen. Die einzelnen Gewebe des Uterus hatten bei den verschiedenen Behandlungen eine unterschiedliche PR-Expression. Allgemein war die Ausbildung der Rezeptoren gering, da der IRS einen maximalen Wert von 6 erreichte.

#### 5.4.1 Der Progesteronrezeptor unter Östradioleinfluß

Obwohl das **Epithel** des **Endometriums** der superfundierten Uteri histologisch intakt erschien und der Zellverband den physiologischen Vorstellungen entsprach, wurden im Epithel des Endometriums bei der Östradiolbehandlung keine PRs nachgewiesen (Abb. 5.4). Diese Beobachtung steht vermutlich in Zusammenhang mit dem Zyklusstadium (Ohta et al., 1993). Während des Östrus und Metöstrus ist kein PR in den Epithelzellen des Endometriums bei Ratten vorhanden. Die Zellkerne zeigen eine Steigerung der Rezeptoren im Diöstrus. Die steigende Östradiolkonzentration im Proöstrus ist für die Senkung der PRs im Epithel des Endometriums verantwortlich (Ohta et al., 1993).

Im Gegensatz zu anderen Säugetieren (Press et al., 1988; Hild-Petito et al., 1992; Li et al., 1992; Geisert et al., 1994) wird der PR in den Epithelzellen des Endometriums der Maus durch Östradiol reduziert (Tibbetts et al., 1998; Weihua et al., 2000). Östradiol greift nicht am ER $\alpha$  im uterinen Epithel an, sondern wirkt über stromale Hormonrezeptoren auf das Epithel des Endometriums (Cooke et al., 1997). Die Wirkung des Östradiols erfolgt über die Freisetzung von parakrinen Signalen aus dem Stroma, die u.a. beim Primaten beschrieben werden (Brenner et al., 1990). Die Art des parakrinen Signals ist unbekannt. Es wird vermutet, daß der Effekt durch verschiedene Moleküle hervorgerufen wird. Hypothetisch wird beschrieben, daß Mäuse, die diesen parakrinen Faktor nicht bilden können, in der Regulation der uterinen epithelialen PRs nach Östradiolgabe beeinträchtigt sind (Kurita et al., 2000a). Die physiologische Bedeutung der Regulation des PR im uterinen Epithel der Nager ist nicht vollständig aufgeklärt. Uotinen et al. (1999) finden im Gegensatz zu Kurita et al. (2000a) unter Östradiol eine Steigerung der PRs in den Epithelzellen des Uterus bei ovariectomierten Mäusen.

Geschlechtsreife Mäuse und Ratten, aber auch scheinträchtige Kaninchen exprimieren im **Stroma endometrii** immer PRs (Hegele-Hartung et al., 1992; Parczyk et al., 1997; Uotinen et al., 1999). Aufgrund einer hohen Östradiolkonzentration im Blut ist die Expression der ERs im Stroma hoch. Das beeinflußt die PR-Konzentration im Stroma positiv (Tibbetts et al., 1998). Durch eine Östradiolgabe wird die Expression von PRs im Stroma endometrii der Maus stimuliert (Tibbetts et al., 1998; Weihua et al., 2000). In ovariectomierten Ratten konnten bis 26 Tage nach Entfernung der Ovarien PRs im Stroma des Endometriums nachgewiesen werden. Die Menge nimmt kontinuierlich ab (Ohta et al., 1993). Ohne Hormon sind die PRs nur schwach darstellbar (Tibbetts et al., 1998). Werden ovariectomierte Ratten drei Tage unter Östradioleinfluß gestellt, steigt die PR-Expression im Stroma kaum, nach

---

6-tägiger Behandlung ist jedoch eine starke Zunahme der PRs im Stroma sichtbar (Ohta et al., 1993; Parczyk et al., 1997). Bei kastrierten Affen konnte die Bildung von PRs im Stroma der Prostata nach Östradiolgabe nachgewiesen werden (Brenner et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Östradiols in verschiedenen Konzentrationen auf das Stroma endometrii gut dargestellt (Abb. 5.4). Östradiol förderte und hemmte die PR-Expression abhängig von der Konzentration. Die höchste Konzentration (Ö-5) stimulierte die Expression der PRs am stärksten, was als eine ausgesprochene Steigerung in Quantität und Farbintensität der PRs im Stroma sichtbar wurde. Die physiologische Konzentration (Ö-0,05) hatte ebenfalls einen positiven Einfluß auf die stromalen PRs. Die Wirkung war geringer als bei Ö-5. Die Verringerung des IRS resultierte aus der Abnahme der Anzahl der PRs und deren Farbintensität. Die niedrigste Konzentration (Ö-0,0005) und die hormonfreie Kontrollbehandlung hatten keine Auswirkungen auf die Ausbildung des PR im Stroma.

Der positive Effekt der physiologischen und hoch dosierten Konzentrationen könnte durch eine direkte Beeinflussung der ERs im Stroma hervorgerufen werden, d.h. exogen verabreichtes Östradiol greift direkt am stromalen ER an und fördert damit die Expression der PR-Gene. Das führt zu einer Zunahme der PRs (Gronemeyer, 1991). Somit wirken die ERs als transkriptionsaktivierende Faktoren für PRs. Die Aktivierung der ERs ist bei niedrig dosierten Konzentrationen vermindert, wodurch die PR-Expression nicht stimuliert wird.

Steigende Östradiolkonzentrationen führen im Östrus zur Ovulation und der Vorbereitung des Uterus auf eine Implantation. Werden unter hohen Östradiolkonzentrationen keine PRs exprimiert, kann Progesteron die Proliferation des Stromas nicht fördern (Finn und Martin, 1970) und die Sekretion verschiedener Proteine ist gering. Der frühe Embryo wird nicht ernährt und stirbt ab. Durch diese Betrachtung erklärt sich, daß bei der niedrigen Östradiolkonzentration keine PRs vorhanden sind. Zu geringe Hormonkonzentration führt nicht zur Follikelreifung und eine Implantation kann ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung der **Drüsen** des Endometriums liegt wenig Literatur vor. Östradiol führt zu einer kontinuierlichen Steigerung von PRs im Drüsenepithel ovariectomierter Mäuse (Tibbetts et al., 1998). Parczyk et al. (1997) beschrieben unter 28-tägigem Östradioleinfluß eine Unterdrückung der Expression der PRs in den uterinen Drüsenzellen und endometrialen Epithelzellen der ovariectomierten Ratte. Im Drüsengewebe der Mamma steigt bei den gleichen Tieren der PR. Der Mechanismus beruht auf einem Transkriptionsfaktor, der die Expression der Gene im Gewebe induziert und zur selben Zeit die Genexpression in anderen

---

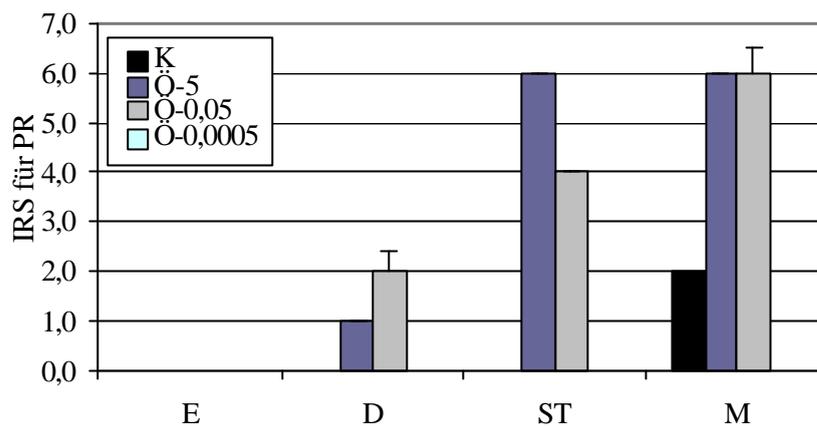
Zellen des selben oder eines anderen Organs hemmen kann (Parczyk et al., 1997). Werden ovariectomierte Mäuse mit Östradiol behandelt, sind in den Drüsen mehr PRs nachweisbar als in unbehandelten Mäusen (Tibbetts et al., 1998).

Trotz unterschiedlicher Ausgangssituation, kann diese Aussage mit der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Die Hormon-freie Kontrollbehandlung und die niedrig dosierte Östradiolbehandlung (Ö-0,0005) wies keine PRs in den Drüsen auf (Abb. 5.4). Bei hohen Östradiolkonzentration wurde der PR nur gering exprimiert. Die hoch dosierte Konzentration hatte einen geringeren Einfluß als die physiologische Konzentration. Insgesamt war die Beeinflussung des PR in den Drüsen durch Östradiol schwach. Die Drüsen reagierten minimal auf Östradiol.

Die Expression des PR im **Myometrium** wird durch Östradiol positiv beeinflusst (Tibbetts et al., 1998). Farbintensität und PR-Konzentration schwanken in Abhängigkeit von der Behandlung. Bei Mäusen steigt durch eine Östradiolgabe die PR-Konzentration im Myometrium an (Tibbetts et al., 1998). Das Myometrium ovariectomierter Mäuse reagiert mit einer schwach positiven PR-Expression (Ohta et al., 1993; Tibbetts et al., 1998). Werden diese Tiere mit Östradiol behandelt, erhöht sich die mRNA und die Expression des PR im Myometrium (Uotinen et al., 1999), wobei Ohta et al. (1993) kaum Veränderungen der Expression feststellt.

Bei den eigenen Untersuchungen war die Expression der PRs im Myometrium unterschiedlich (Abb. 5.4). Ö-5 und Ö-0,05 hatten einen stark positiven Einfluß auf die Ausbildung der PRs. Dabei war die Anzahl der PRs im Zellkern der Muskelzellen bei Ö-5 hoch, aber wenige Kerne waren rezeptorpositiv. Möglicherweise könnte unter hohem Östradioleinfluß die nukleäre und die Gesamt-ER-Menge steigen, was zu einer gleichzeitigen Induktion der PRs führt. Dieser Effekt wird bei MCF-7-Zellen unter Östradioleinfluß beschrieben (Horwitz et al., 1978). Die physiologische Konzentration bewirkt bei vielen Zellkernen eine schwache Ausbildung der PRs. Ursache der verschiedenen Wirkungen könnte die unterschiedliche Anflutung des Östradiols im Gewebe sein, die bei der hoch dosierten Konzentration stärker ist. Weiterhin bewirken steigende Östradiolkonzentrationen eine Vorbereitung des Myometriums auf die Ovulation mit anschließender Implantation. Durch die Zunahme der PRs unter Östradiol können langsam steigende Progesteronkonzentrationen an den vorhandenen PRs angreifen und das Myometrium zur Proliferation anregen.

Bei der schwach dosierten Konzentration sind keine PRs nachweisbar. Diese Konzentration hatte keinen fördernden Einfluß auf die Expression der PRs im Myometrium.



**Abbildung 5.4** IRS des PR in den Geweben des Mäuseuterus nach der Superfusion mit K und verschiedenen Östradiolkonzentrationen (MW  $\pm$  s)  
 IRS – Immunreaktiver Score, E – Epithel des Endometriums, D – Drüsen, ST – Stroma endometrii, M – Myometrium

#### 5.4.2 Der Progesteronrezeptor unter Progesteroneinfluß

Beim Menschen steigt der PR in der proliferativen Zyklusphase am stärksten, während er beim Kaninchen zum Zeitpunkt des höchsten Progesteronspiegels im **epithelialen Endometrium** nur sehr schwach, in den Drüsen aber stark ausgebildet wird. In den ersten Tagen der Pseudogravidität beim Kaninchen nimmt der PR in den Epithelzellen des Endometriums und den Drüsen stark zu. Diese Reaktion resultiert aus einer unterschiedlichen Ansprechbarkeit der Gewebe auf das Hormon (Hegele-Hartung et al., 1992).

Bei der Maus weicht der Progesteroneinfluß auf die Epithelzellen des Endometriums von anderen Tieren ab. Progesteron hemmt die Herunter-Regulierung der murinen PR *in vivo*. So wurden hohe Mengen an PRs im Epithel des Endometriums in ovariectomierten Mäusen nach einer viertägigen Behandlung mit Östradiol und Progesteron nachgewiesen. Uterine stromale PRs sind für Progesteron notwendig, um den Östradioleinfluß auf das Epithel zu antagonisieren (Kurita et al., 2000b). Die Wirkung kann auf drei Ebenen stattfinden, die am Beispiel der uterinen epithelialen DNA-Synthese in Zellkulturen nachgewiesen ist. Der durch Progesteron aktivierte stromale PR verzögert die Transkription der ER-abhängigen parakrinen Mediatoren. Weiterhin bewirkt der aktivierte PR die Sekretion parakriner Faktoren, die den Einfluß der Östradiol-induzierten parakrinen Mediatoren indirekt hemmt und drittens können Progesteron-induzierte parakrine Mediatoren einen direkt hemmenden Einfluß auf die epitheliale Proliferation haben (Kurita et al., 1998). Ohta et al. (1993) unter-

---

suchte an im Östrus ovariectomierten Ratten den Einfluß von Östradiol mit und ohne Progesteronapplikation. Bei beiden Untersuchungen kommt es zur Steigerung der PR-Expression im Epithel des Endometriums. Der Einfluß unter Östradiol ist schwächer als in Kombination mit Progesteron. Progesteron alleine senkt die PR-Konzentration im uterinen Epithel. Vergleichbare Untersuchungen an Mäusen zeigen eine starke Senkung der PRs (Tibbetts et al., 1998).

Ähnliche Ergebnisse sind bei den untersuchten Uteri aufgetreten. Bei keiner Progesteronbehandlung sind PR im Epithel des Endometriums nachweisbar (Abb. 5.5).

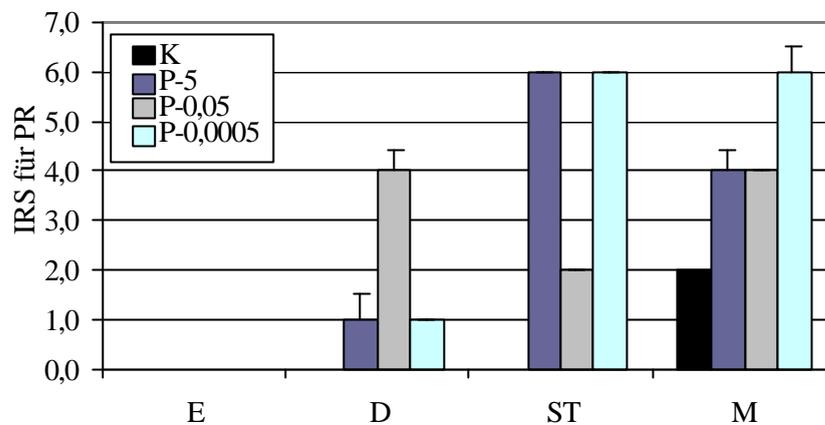
Unter Östrogen und Progesteron kommt es im **Stroma** zu einer vermehrten Zunahme der PRs (Tibbetts et al., 1998). Das Stroma in den vorliegenden Untersuchungen reagierte mit einer Steigerung der PRs bei verschiedenen Progesteronkonzentrationen (Abb. 5.5). Dabei war keine konzentrationsabhängige Expression zu erkennen, da hoch und niedrig dosierte Konzentrationen zu einem starken Anstieg der PRs führten. Die physiologische Konzentration hatte nur geringe Einflüsse auf den PR.

Bei der Progesteronbehandlung der untersuchten Uteri wird ersichtlich, daß die **Drüsen** durch das Hormon beeinflusst wurden. Abhängig von der Konzentration folgte eine Veränderung der PR-Expression (Abb. 5.5). Bei der physiologischen Konzentration wurden die meisten PRs nachgewiesen. Bei der hoch dosierten Progesteronkonzentration sank die Expression des PR. Eine hohe Progesteronkonzentration im Östrus hatte nur geringe Auswirkungen auf die Expression der PRs in den Drüsen.

Ovariectomierte Ratten oder Mäuse exprimieren unter einer Östradiol- und anschließender Progesterongabe unterschiedliche Mengen an PRs im **Myometrium** (Ohta et al., 1993; Tibbetts et al., 1998). Werden die Tiere nur mit Progesteron behandelt, sinkt die PR-Konzentration im Myometrium (Ohta et al., 1993).

Der stärkste Effekt am Myometrium war in dieser Untersuchung am Myometrium bei  $P < 0,0005$  zu finden (Abb. 5.5), was die Aussage bestätigt, daß der PR durch Progesteron negativ beeinflusst wird (Verhage et al., 1983; von Bruchhausen et al., 1993). Hohe Progesteronspiegel weisen auf eine Gravidität hin. Eine wichtige Wirkung des Progesterons in dieser Zeit ist die Hemmung der Kontraktion des Myometriums. Je mehr Progesteron anflutet, um so weniger Rezeptoren werden gebildet, und die Kontraktionsfähigkeit des Myometriums sinkt. Gleichzeitig sinkt durch eine steigende Progesteronmenge die Ansprechbar-

keit des Myometriums auf wehenauslösende Substanzen, wie z.B. Oxytocin und Prostaglandine (von Bruchhausen et al., 1993).



**Abbildung 5.5** IRS des PR in den Geweben des Mäuseuterus nach der Superfusion mit K und verschiedenen Progesteronkonzentrationen (MW  $\pm$  s)

IRS – Immunreaktiver Score, E – Epithel des Endometriums,

D – Drüsen, ST – Stroma endometrii, M – Myometrium

Auffällig bei der Auswertung der Abb. 5.4 und Abb. 5.5 ist, daß sich der IRS der Drüsen und des Stromas umgekehrt proportional verhalten, wenn in beiden Geweben PRs vorhanden sind. Dieser Effekt tritt unabhängig vom zugegebenen Hormon auf. Wurden im Stroma wenige PRs nachgewiesen, stieg die Expression in den Drüsenepithelien an. Hiermit wird deutlich, daß beide Gewebe unterschiedlich auf das Hormon reagieren bzw. verschieden stark angesprochen werden (Hegele-Hartung et al., 1992). Anhand dieser Beobachtung und unter Berücksichtigung des PR im Myometrium und Epithel des Endometriums wurde sichtbar, daß die einzelnen Gewebe des Uterus der Maus unabhängig voneinander auf die Hormone reagierten.

Gleichzeitig korrelierte der PR im Stroma positiv, der der Drüsen negativ bei hoch dosierten und physiologischen Östradiol- und Progesteronkonzentrationen mit der gemessenen Proteinkonzentration im Superfusat. Wurden viele PRs im Stroma nachgewiesen, war der PR in den Drüsen gering und eine hohe Proteinkonzentration im Superfusat war vorhanden. Gleiches galt für die niedrig dosierte Progesteronkonzentration, wobei die Proteinmenge im Superfusat von der oben beschriebenen Beobachtung geringgradig abwich.