

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie  
der Technischen Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
PD Dr. Bajram Berisha

Vorgelegt über  
Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz,  
Lehrstuhl für Tieranatomie II  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Regulation und Bedeutung von angiogenen, anti-angiogenen  
und lymphangiogenen Faktoren während verschiedener Stadien  
der Ovarfunktion beim Rind**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Stefanie Schilffarth

aus

Nürnberg/Bayern

München, 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Sinowatz

1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Braun

3. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Scholz

4. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Schalch

Tag der Promotion: 06. Februar 2009

„Nichts auf der Welt kann Ausdauer ersetzen.  
Talent jedenfalls nicht – nichts ist so häufig wie erfolglose Leute mit Talent.  
Auch Genialität nicht – verkannte Genies sind sprichwörtlich.  
Allein Beharrlichkeit und Entschlossenheit sind allmächtig.“

Calvin Coolidge, ehem. Präsident der USA

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung</b>	7
<b>2. Literatur</b>	9
<b>2.1 Ovar und endokrinologische Regulation des bovinen Zyklus</b>	9
2.1.1 Follikulogenese	11
2.1.2 Ovulation	13
2.1.3 Gelbkörperfunktion	14
2.1.4 Luteolyse (Regression) des Gelbkörpers (CL)	15
2.1.5 Gonadotropine und Prostaglandine	15
2.1.6 Steroidhormone und Aromatase	16
<b>2.2 Lokale (auto- und parakrine) Regulationsfaktoren</b>	17
<b>2.3 Das Gefäßsystem im Ovar des Rindes</b>	18
<b>2.4 Angiogenese</b>	19
<b>2.5 Angiogene Faktoren</b>	23
2.5.1 VEGF-Familie: VEGF-A, VEGF -B und ihre Isoformen	23
2.5.2 Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (Npr.)	29
2.5.3 Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 (HIF-1)	31
<b>2.6. Anti-angiogene Faktoren</b>	32
2.6.1 Vasohibin-1 und Vasohibin-2	34
2.6.2 Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 (TSP)	36
2.6.3 Oberflächenantigene CD36 und CD47	37
<b>2.7 Lymphangiogenese</b>	38
<b>2.8 Lymphangiogene Faktoren</b>	41
2.8.1 VEGF-Familie: VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3	42
2.8.2 Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktoren (PDGF-Familie)	43
2.8.3 Podoplanin	45
2.8.4 Homeobox-containing Transcription Factor Prox1 (Prox-1)	46

<b>3. Material und Methodik</b>	48
<b>3.1 Labortechnik und Geräte</b>	48
<b>3.2 Biochemika</b>	50
<b>3.3 Reagenzien</b>	51
<b>3.4 Kits</b>	51
<b>3.5 Enzyme</b>	52
<b>3.6 Marker</b>	52
<b>3.7 Puffer und Lösungen</b>	52
<b>3.8 Primersequenzen und Produktlängen der qPCR</b>	54
<b>3.9 Primerdesign</b>	55
<b>3.10 Probenmaterial und Probengewinnung</b>	56
3.10.1 Experiment 1: Gelbkörper (CL) während Zyklus und Gravidität	56
3.10.2 Experiment 2: Gelbkörper (CL) nach induzierter Luteolyse durch PGF <sub>2</sub> $\alpha$	57
3.10.3 Experiment 3: Follikel während verschiedener Entwicklungsstufen	58
<b>3.11 RNA-Extraktion</b>	60
<b>3.12 Überprüfung der Quantität und Qualität der RNA</b>	61
3.12.1 Messung des RNA-Gehaltes in der Lösung	61
3.12.3 RNA-Qualitätskontrolle	62
<b>3.13 Reverse Transkription</b>	64
<b>3.14 Primeroptimierung</b>	65
3.14.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
3.14.2 Gelelektrophorese mit Agarosegel und Sequenzierung	67
<b>3.15 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)</b>	69
<b>3.16 Housekeeping-Gene</b>	74
<b>3.17 Protein-Extraktion</b>	76
<b>3.18 Enzymimmuntest (EIA)</b>	76
3.18.1 Oestradiol-17 $\beta$ (E2) und Progesteron (P4) in der Follikelflüssigkeit (FF)	76
3.18.2 Kommerzielle ELISA-Kits (VEGF-C und VEGF-D)	77
3.18.3 Kommerzielles DuoSet für ELISA (VEGF-R3)	79
<b>3.19 Immunhistochemie</b>	80
3.18.1 Nachweis für HIF-1 $\alpha$ an Gefrierschnitten von CL	80
3.18.2 Nachweis für VEGF-R3 an Gefrierschnitten von CL	80
3.18.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	81
<b>3.20 Datenverarbeitung</b>	81

<b>4. Ergebnisse</b>	82
<b>4.1 Housekeeping-Gen</b>	82
<b>4.2 Angiogene Faktoren</b>	85
4.2.1 VEGF-A, VEGF-B und ihre Isoformen	
4.2.2 Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (Nrp.)	93
4.2.3 Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-1 $\alpha$ )	98
4.2.3.1 <i>Expression der mRNA</i>	98
4.2.3.2 <i>Proteinlokalisation (Immunhistochemie)</i>	100
<b>4.3 Anti-angiogene Faktoren</b>	103
4.3.1 Vasohibin-1 und Vasohibin-2	103
4.3.2 Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 (TSP)	106
4.3.3 Oberflächenantigene CD36 und CD47	109
<b>4.4 Lymphangiogene Faktoren</b>	113
4.4.1 VEGFC, VEGF-D und VEGF-R3	113
4.4.1.1 <i>Expression der mRNA und Proteinkonzentration (ELISA)</i>	113
4.4.1.2 <i>Proteinlokalisation (Immunhistochemie)</i>	120
4.4.2 Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktoren (PFGF-Familie)	122
4.4.3 Podoplanin	127
4.4.4 Homeobox-containing Transcription Factor Prox1 (Prox-1)	128
<b>5. Diskussion</b>	130
<b>5.1 Normalisierung der mRNA-Expressionsdaten</b>	130
<b>5.2 Angiogene Faktoren</b>	131
5.2.1 VEGF-A, VEGF-B und ihre Isoformen	131
5.2.2 Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (Nrp.)	135
5.2.3 Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-1 $\alpha$ )	137
<b>5.3 Anti-angiogene Faktoren</b>	139
5.3.1 Vasohibin-1 und Vasohibin -2	140
5.3.2 Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 (TSP)	141
5.3.3 Oberflächenantigene CD36 und CD47	142
<b>5.4 Lymphangiogene Faktoren</b>	143
5.4.1 VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3	143
5.4.3. Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktoren (PFGF-Familie)	147
5.5.2 Podoplanin	148
5.5.3 Homeobox-containing Transcription Factor Prox1 (Prox-1)	149
<b>5.5 Schematische Darstellung der Expressionsprofile der untersuchten Faktoren</b>	150

<b>6. Zusammenfassung</b>	153
<b>7. Summary</b>	156
<b>8.Literaturverzeichnis</b>	159
<b>Danksagung</b>	176
<b>Lebenslauf</b>	177

### Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	RNA der 18s Ribosomen Untereinheit (18s)
28S rRNA	RNA der 28s Ribosomen Untereinheit (28s)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD 36/47	Oberflächenantigene 36/47 (CD = cluster of differentiation)
cDNA	complementary DNA (Komplementärstrang-DNA)
CL	Corpus luteum, bzw. Corpora lutea (Gelbkörper)
cp	Crossing Point(s)
d	Tage (days)
DAB	3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochloridedihydrate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid 5'-Triphosphat
E2	Östradiol-17 $\beta$
EC	Endothelzelle(n)
EIA	Enzyme Immuno Assay
EtOH	Ethanol
FF	Follikelflüssigkeit
for	forward
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogensase
G/C-Gehalt	Gehalt an Guanin-und Cytosin-Basen
GnRH	Gonadotropin freisetzendes Hormon (Gonadotropin-Releasing Hormon)
h	Stunde(n)
HA	Hyaluronsäure
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 $\alpha$ (Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$ )
HKG	Housekeeping Gen
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KO	Knockout
LEC	Lymphendothelzellen

LH	Luteinisierendes Hormon
LYVE-1	Lymphgefäß-Hyaluronsäure-Rezeptor-1
Min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
Nrp.	Neuropilin(e)
P4	Progesteron
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Plättchen-induzierter Wachstumsfaktor (Plateled Derived Growth Factor)
PDGF-R $\alpha/\beta$	PDGF-Rezeptor $\alpha$ bzw. $\beta$
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
Prox-1	Homeobox-containing transcription Factor Prox1
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
Sek	Sekunde
s.S./Abb./Tab.	Siehe Seite/Abbildung/Tabelle
SEM	Standartfehler des Mittelwertes (Standard Error of Mean)
Tab.	Tabelle
TE	Theka externa
TI	Theka interna
TSP	Thrombospondin(e)
U	Enzymenheiten (Units)
UBQ	Ubiquitin
VEGF	Vaskulärer Endothelzellen Wachstumsfaktor (Vaskular Endothelial Growth Factor)
VEGF-R	Vaskulärer Endothelzellen Wachstumsfaktor-Rezeptor

### 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Das Ovar der Säugetiere ist ein sehr komplexes, vielseitiges und faszinierendes Organ. Schließlich wäre ohne seine einwandfreie Funktion und damit dem reibungslosen Zusammenspiel einer unglaublich hohen Anzahl verschiedener Faktoren, eine Fortpflanzung und damit das Überleben unzähliger Spezies – auch die des Menschen - nicht möglich.

Eine der Hauptfunktionen des ovariellen Zyklus bei den Säugetieren und so auch beim Rind besteht in der periodischen Bereitstellung einer oder mehrerer befruchtungsfähiger Eizellen. Charakteristisch für den ovariellen Zyklus dieser Spezies ist das wiederholte Auftreten von Follikelentwicklung, Gelbkörperbildung und -regression, welche von zellulärer Proliferation und Differenzierung begleitet werden. Hierfür ist ein perfekt abgestimmtes Wechselspiel verschiedener Faktoren nötig. Die bedeutendsten regulatorischen Elemente der Follikel- und Gelbkörperentwicklung sind die hypophysären Gonadotropine, welche Bestandteil eines komplizierten neuroendokrinen Systems sind. Ihre Funktion im ovariellen Zyklus ist zum Teil schon sehr gut verstanden. Neben den in Hypothalamus, Adenohypophyse und Ovar gebildeten endokrinen Hormonen, welche sich durch komplexe Feedbacksysteme gegenseitig regulieren, wurde in den letzten Jahren immer deutlicher, dass auch intraovarielle Faktoren auf autokriner und parakriner Ebene für die Ovarfunktion und seine Regulierung wichtig sind. Zu diesen lokal wirksamen Faktoren zählen, neben Zytokinen, viele verschiedene Wachstumsfaktoren, die zum Teil bereits ebenfalls intensiv untersucht wurden. Das Follikelwachstum verläuft sehr dynamisch. Auf dem Weg zur Ovulation nimmt ein Follikel auf beeindruckende Weise an Volumen zu. Er durchläuft dabei verschiedene Entwicklungsstadien und muss aus einem Pool von vielen Follikeln rekrutiert und für das Endwachstum selektiert werden, um letztendlich ovulieren zu können. Auch der Gelbkörper, das Corpus luteum (CL), das in der lutealen Phase des Zyklus der wichtigste Funktionskörper auf dem Ovar ist, beeindruckt durch sein unvergleichlich schnelles Wachstum in sehr kurzer Zeit, das selbst von malignen Tumoren nicht erreicht werden kann. Diese Größenzunahme und auch viele andere der Funktionen am Ovar, wären ohne die massive Gefäßneubildung, die hier stattfindet, nicht möglich. Angiogenese ist ein Prozess, der außer im weiblichen Reproduktionstrakt im adulten Organismus physiologisch nicht mehr vorkommt. Er spielt jedoch bei der Wundheilung, Entzündungsprozessen und vielen Tumorerkrankungen eine ganz bedeutende Rolle und rückte daher immer mehr in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Gleiches gilt auch für die Lymphangiogenese, welche aber insgesamt noch ein etwas „jüngeres“ Forschungsgebiet darstellt. Fast immer, wenn man Informationen über angiogene, anti-angiogene oder lymphangiogene Faktoren sucht, stößt man dabei auf die Krebsforschung. Den Faktoren wird in den letzten Jahren sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt, um neuartige therapeutische Ansätze zu entwickeln. Diese

haben das Ziel, das Wachstum von Tumorblut- oder lymphgefäßen zu hemmen und somit das Tumorwachstum und die Ausbreitung von Metastasen zu reduzieren. Auch wenn das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf den physiologischen Aspekten im bovinen Ovar liegt, wurde dort, wo es für interessant gehalten wurde, die Bedeutung der untersuchten Faktoren - über die Reproduktionsphysiologie hinaus - auch für die klinische Forschung mit erwähnt. Allein in Deutschland sterben jährlich etwa 210.000 Menschen an Krebs. In den allermeisten Fällen führt dabei nicht der primäre Tumor zum Tod, sondern Tumormetastasen, die sich im Körper ausbreiten (Klinik für Tumorbiologie Freiburg, <http://www.bio-pro.de/de/region/freiburg/magazin/01188/index.html>). Dazu benutzt der Tumor die beiden Gefäßsysteme des Körpers und beeinflusst aktiv die Bildung neuer Gefäße. In den letzten Jahren wurde verstärkt versucht, die Erkenntnisse über die Angiogenese in neue Therapieformen zur Bekämpfung von Krebserkrankungen umzuwandeln. Während die Untersuchungen zur Hemmung der Blutgefäße weit fortgeschritten sind und zur Zulassung erster Medikamente, z.B. Avastin<sup>®</sup> von Roche (Wirkstoff Bevacizumab, Wirkstoffklasse Zytostatikum) zur Primärbehandlung von einigen Tumoren (z.B. dem fortgeschrittenen Darmkrebs) geführt haben, steckt die Forschung zur Lymphangiogenese noch in den Anfängen (Kerbel und Folkmann, 2002; Elice et al., 2008).

Durch die beschriebenen zyklisch wiederkehrenden Vorgänge ist das weibliche Reproduktionssystem ein einzigartiges Modell, um die Regulation der Angiogenese und Lymphangiogenese während Wachstum und Differenzierung normaler erwachsener Gewebe zu studieren. Die Untersuchungen dieser Arbeit schlossen das Follikelwachstum, unter besonderer Beobachtung der Granulosazellen und der Theka interna, die Ovulation, das CL während des Zyklus und der Gravidität, sowie das CL nach induzierter Luteolyse ein.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die bereits bekannten angiogenen Faktoren noch besser verstehen zu können und noch tiefer einzusteigen in das Zusammenspiel, das notwendig ist, um eine einwandfreie Reproduktionsfähigkeit zu gewährleisten. Außerdem sollten einige anti-angiogenen Mechanismen am Ovar aufgezeigt werden, welche Faktoren dafür vorhanden und wie sie reguliert sind, sowie ihre Bedeutung für den Gesamtzyklus. Weiterhin sollte der noch sehr wenig erforschten Lymphangiogenese im Ovar näher gekommen werden und erste Erkenntnisse darüber erlangt werden, welche Faktoren hier eine Rolle spielen.

## 2. Literatur

### **2.1 Ovar und endokrinologische Regulation des bovinen Zyklus**

Das Ovar besteht aus zwei Bereichen, der inneren Markzone, oder auch Zona vasculosa und der äußeren Rindenzone, Zona parenchymatosa. Über den Hilus ovarii treten Arterien in das Ovar ein und bilden in der gut durchbluteten Markzone am Übergang zur Rindenzone ein dichtes Netzwerk um letztere über Blutgefäße zu versorgen. Die Rindenzone liegt der Markzone bindegewebig auf. In ihr liegen die Follikel und Gelbkörper umgeben von fibrozytenähnlichen Stromazellen. Die Stromazellen der Rindenzone sind sehr stoffwechselaktiv, haben eine hohe Regenerationsfähigkeit und Mitoserate und können auch phagozytotisch aktiv sein. Sie sind an sämtlichen Umbauvorgängen, welchen das Ovar während des Ovarialzyklus unterworfen ist, beteiligt. Das Stromagewebe ist von einem feinen Kapillargeflecht durchzogen, das der Versorgung der Keimzellen dient und an der Umwandlung des Follikels in den Gelbkörper beteiligt ist. Auch das Kapillarnetz verändert sich mit den zyklischen Umbauvorgängen entsprechend. Beim Rind sind die Eierstöcke im Vergleich zur Größe des Tieres relativ klein. Bei der Kuh wiegt der Eierstock 15 – 19 g bei einer durchschnittlichen Länge von 30 mm, einer Breite von 20 mm und einer fast ebensolchen Dicke (Nickel et al., 1999).

Der Zyklus der asaisonalen polyöstrischen Rinder (*Bos taurus*) hat eine Länge von ca. 21 Tagen und beginnt mit Tag 0 zum Zeitpunkt der Ovulation. Er wird in die von Progesteron (P4) beeinflusste Lutealphase (etwa Tag 1-14) und in die kürzere, von Östrogen (E2) dominierte Follikularphase (Tag 15-21) eingeteilt. Während letzterer sind meist drei Follikelwellen zu beobachten (Evans und Fortune., 1997), wobei jede Welle die Rekrutierung einer Follikelkohorte und die Selektion eines dominanten Follikels beinhaltet, welcher weiter wächst und sich weiter entwickelt. Alle anderen hingegen unterliegen der Atresie und bilden sich zurück (Stock und Fortune., 1993). Der dominante Follikel kontrolliert die Entwicklung der anderen durch Hormone (wie Östrogen oder Inhibin), welche sowohl lokal, als auch systemisch wirken. (Savio et al., 1993). Das Follikelwachstum wird von zwei verschiedenen Gonadotropinen gefördert, welche aus dem Hypophysen-Vorderlappen als Antwort auf eine pulsatile GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus freigesetzt werden (Roche, 1996). Diese beiden Gonadotropine sind das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH), welche beide über den ganzen Zyklus hinweg abgesondert werden. Normalerweise kommt nur der dominante Follikel der letzten Follikelwelle, nach erfolgter Luteolyse, zur Ovulation (Ginther et al., 1989). Bei der Ovulation des so genannten Graafschen Follikel wird die Oozyte freigesetzt. Bei diesem Prozess wird die Oozyte, sowie die Zona pellucida und der Cumulus oophorius mit der Follikelflüssigkeit in das Ovidukt

gespült. Als Auslöser für den Eisprung muss zwingend ein LH-Gipfel vorausgehen, welcher durch einen Anstieg von Frequenz und Amplitude der LH-Pulse heranwächst (Piquette et al. 1991). Dies wird wiederum durch die pulsatile Freisetzung von Östradiol-17 $\beta$  veranlasst. Der erwähnte LH-Gipfel ist auch verantwortlich dafür, dass der Gelbkörper, das Corpus luteum (CL) entsteht und als vorübergehende Hormondrüse fungieren kann. Es produziert hauptsächlich Progesteron, welches zu den Gestagenen gehört. Es veranlasst die Uterusschleimhaut sich auf die Implantation eines etwaigen Embryos vorzubereiten und unterstützt den Erhalt einer Trächtigkeit, sollte sie eingetreten sein (Hesch, 1989). Ist dies nicht der Fall, wird etwa am Zyklustag 16 Prostaglandin F $2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ) von der Uterusmukosa freigesetzt, das CL bildet sich zurück und ein neuer Zyklus beginnt.

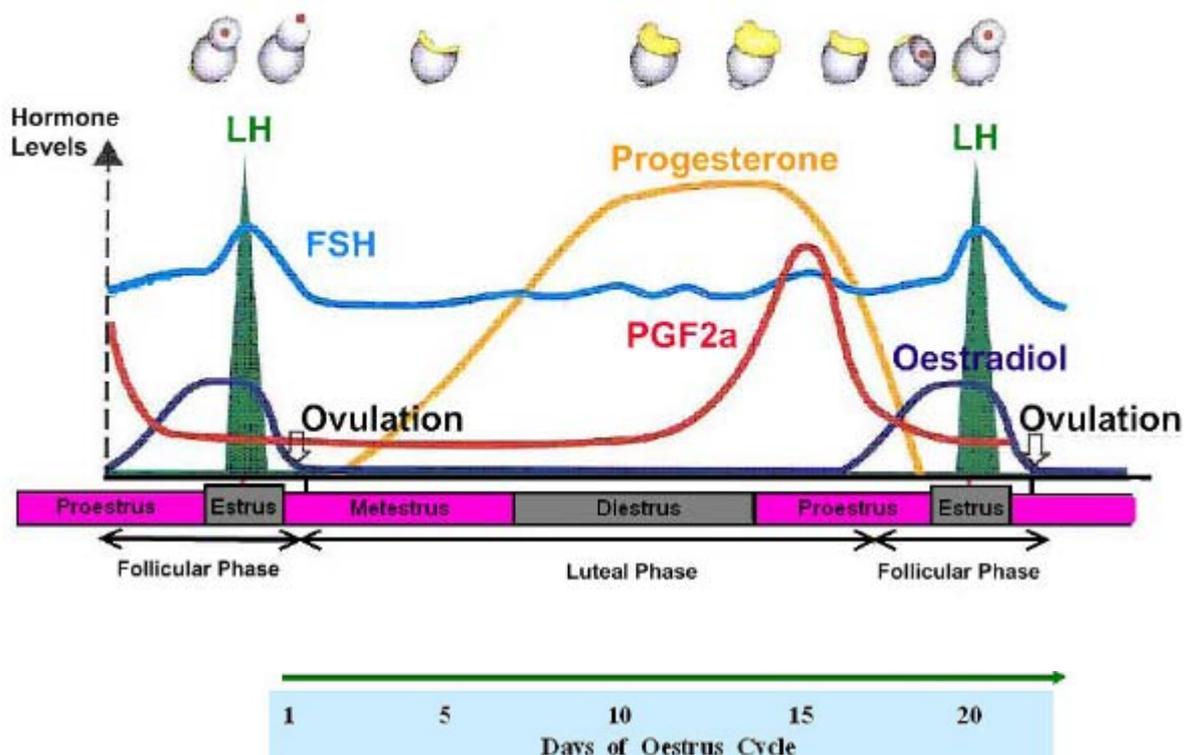


Abb.1: Hormonprofile, Entwicklung und Regression des Corpus luteum während des Zyklus beim Rind (Intervet, modifiziert).

### 2.1.1 Follikulogenese

In den Ovarien der Kuh ist wie bei allen Säugetieren schon bei der Geburt bereits der vollständige Pool an Oozyten vorhanden. Der als solches definierte „Follikel“ besteht aus der strukturellen und funktionellen Einheit von Eizelle und Follikelepithel. Bis zur Ovulation verharrt die Oozyte in der Prophase I der Meiose. Nur etwa 1% der Follikel gelangen überhaupt zur Ovulation, der Rest des Pools bildet sich zurück (Atresie). Der während der fetalen Entwicklung erworbene Follikelpool besteht zunächst hauptsächlich aus Primordialfollikeln, welche aus der im Durchschnitt 30 µm großen Eizelle und 1-2 Schichten abgeplatteter, undifferenzierter Follikelzellen aufgebaut sind (Rüsse und Sinowatz, 1998). Während bei der Oogenese Differenzierung, Wachstum und Reifung im Vordergrund stehen, hat das Follikelepithel die Aufgabe, die sich entwickelnde Oozyte zu beherbergen und zu ernähren, während es ebenfalls wächst und sich differenziert. Schon vor Einsetzen der Pubertät verlassen einige Follikel den angelegten Pool und beginnen zu wachsen. Bis zur Ovulation durchlaufen die Follikel verschiedene Entwicklungsstadien, die sich durch die Größe der Eizelle und die Entwicklung der Follikelhüllen unterscheiden (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Primordialfollikel: Wenn die Oozyten während der Trächtigkeit die erste meiotische Prophase beendet haben, werden sie in den Keimsträngen von somatischen Zellen umgeben. Die so entstandenen Primordialfollikel werden von einer Basalmembran umgeben und vollständig von den Keimsträngen abgenabelt. Diese erste Follikelisolierung findet beim Rind mit 16 cm Scheitel-Steiß-Länge (SSL) statt. In den Primordialfollikeln werden die Eizellen als primäre Oozyten über die gesamte fertile Lebenszeit gespeichert und können in diesem Ruhezustand über einen jahrzehntelangen Zeitraum aktivierungsfähig bleiben (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Primärfollikel: Nach ihrer Aktivierung beginnen Eizelle und Follikelzellen zu wachsen. Letztere nehmen zwar an Größe zu, sind aber zunächst noch isoprasmatisch.

Sekundärfollikel: Mit der weiteren Proliferation wird die Follikelwand mehrschichtig, was kennzeichnend für den entstehenden Sekundärfollikel ist, der nun bereits eine runde bis ovoide Form aufweist. Um die weiter wachsende Eizelle kommt es zur Bildung der Zona pellucida, einer glykoproteinreichen Grenzsicht, deren Aufgabe die Regulation der Nährstoffaufnahme der Eizelle ist. Des Weiteren verhindert sie das Eindringen mehrerer oder nicht artspezifischer Spermien. Der Sekundärfollikel erreicht beim Rind einen Durchmesser von etwa 300 µm. Nachdem auch die Eizelle nahezu seine endgültige Größe erreicht hat, bildet sich im Follikel durch Ausscheidung des Liquor folliculi in den Interzellularraum der Follikelepithelzellen ein Lumen. Außerdem differenzieren sich die dem Follikel außen anliegenden Stromazellen zur Theka follicularis und lagern sich dem Follikel ringförmig an.

Die Theka follicularis stellt eine dünne, bindegewebige Schicht mit eigener Blutversorgung dar. Sie wird von den Follikelepithelzellen durch eine Basalmembran getrennt, welche gleichzeitig auch eine Barriere für Blutgefäße ist.

Tertiärfollikel: Durch die Bildung des Lumens entsteht der junge Tertiärfollikel. Während der für ihn charakteristischen voranschreitenden Antrumbildung verlagert sich der Tertiärfollikel in einen markwärts gelegenen, besser durchbluteten Ovarbereich. Die Eizelle selbst wird an den Rand des Follikels verlagert (Hees und Sinowatz, 1992). Das weitere Wachstum des Tertiärfollikels wird durch FSH angeregt und verläuft damit nun unter Kontrolle des endokrinen Systems. Mit der Größe des Follikels nimmt auch die Zahl der FSH- und LH-Rezeptoren im mittlerweile differenzierten Follikelepithel zu. Die Eizelle selbst wird von dem so genannten Cumulus oophorus eingeschlossen, dessen innerste Schicht eine einschichtige Lage aus prismatischen Follikelzellen ist, die man als Corona radiata bezeichnet. Diese liegt der Zona pellucida direkt an und dient der Ernährung der Oozyte. Auch die GC haben eine ernährende Funktion für die Oozyte. Die Theka follicularis differenziert sich in diesem Stadium in einen äußeren und inneren Bereich. In der Theka interna (TI) wandeln sich die Stromazellen in epitheloide Zellen, die in der Lage sind, Steroidhormone zu produzieren und von einem dichten Kapillarnetz umgeben sind. Die äußerste Schicht des Follikels wird von den spindelförmigen Stromazellen der Theka externa (TE) gebildet. Da die Follikelhöhle und GC durch die Basalmembran keine eigenen Blutgefäße enthalten, müssen die Nährstoffe über Diffusion aus der TI zur Eizelle gelangen. Mit zunehmender Follikelgröße beschleunigt sich das Wachstum der Follikel und beruht vorwiegend auf der Zunahme der Zahl der GC (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Graafsche Follikel: Der bei Brunstbeginn 10 bis 12 mm große präovulatorischen Follikel wächst innerhalb von 24 h auf eine Größe von 17 bis 18 mm heran, hat damit das Endstadium der Follikelbildung erreicht und steht kurz vor der Ovulation. Die von Zona pellucida und Cumulus oophorus umgebene Eizelle verliert dabei die Bindung zur Follikelwand und schwimmt frei in der Follikelflüssigkeit (FF). Die GC lösen sich zum Teil ebenfalls von der Follikelwand ab. Beim Rind erreicht die Eizelle mit umgebender Zona eine Größe von ca. 180 µm (Rüsse und Sinowatz, 1998).

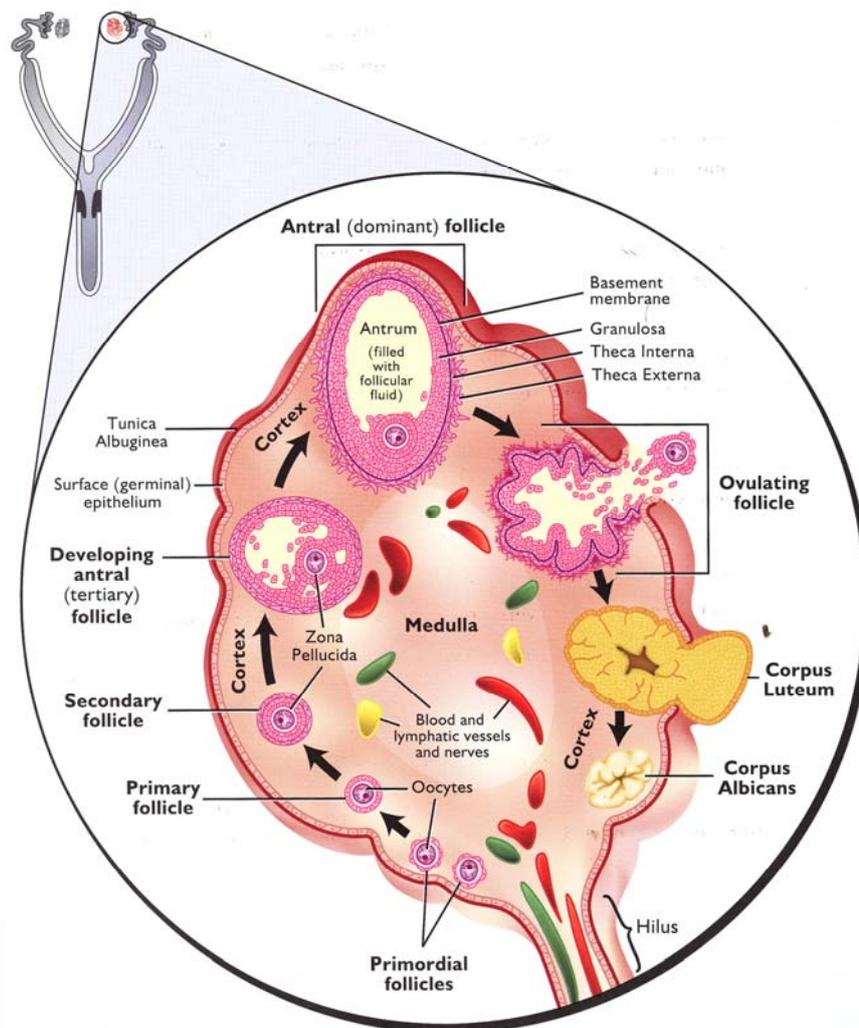


Abb.2 : Die Hauptstrukturen am Ovar. Follikulogenese, Ovulation und Gelbkörper im Ovar des Rindes. Entnommen aus Senger, 2003

### 2.1.2 Ovulation

Die massive E2-Ausschüttung durch den Graafschen Follikel provoziert eine vermehrte Freisetzung von LH aus der Hypophyse, die den Auslöser für die Ovulation darstellt. Beim Rind erfolgt diese jedoch erst ca. 26 Stunden später (Schams et al., 1977). Durch die lokale Anämie im nahezu gefäßfreien Stigma folliculare werden unter Einwirkung von Enzymen die Zellen und die Grundsubstanz im Bereich der Ovulationsstelle abgebaut. Der Prozess der Ovulation besteht aus dem darauf folgenden Aufreißen der Follikelwand am Stigma folliculare und einer Muskelfaserkontraktion in der TE, wodurch die Eizelle zusammen mit der FF in den Eileiter gespült wird.

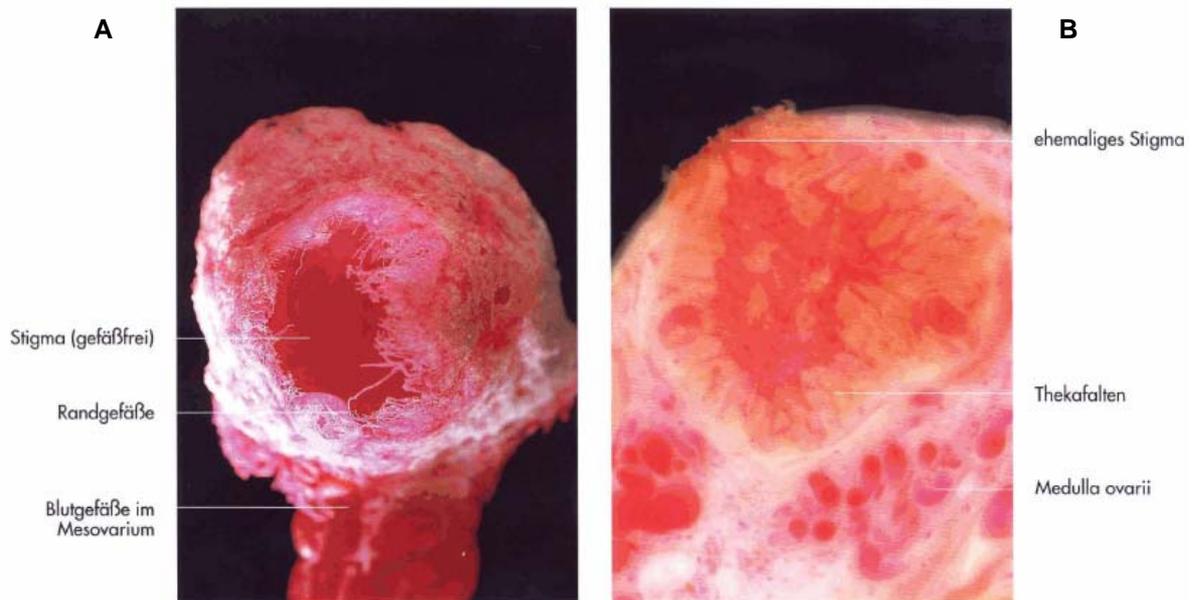


Abb.3: **A** Eierstock eines Rindes mit injizierten Gefäßen (Korrosionspräparat) **B** Eierstock eines Rindes mit einem CL nach der Ovulation (Gefäße injiziert). Entnommen aus König und Liebig (2004).

### 2.1.3 Gelbkörperfunktion

An der Stelle des ovulierten Follikels bildet sich das CL, dessen Hauptaufgabe es ist, den Organismus über die Sekretion von P4 auf eine Gravidität vorzubereiten und bei erfolgter Befruchtung der Eizelle die Gravidität über den nötigen Zeitraum von etwa 280 Tagen aufrecht zu erhalten. Nach der Ovulation kollabiert der Follikel, die GC legen sich in Falten und die Basalmembran wird abgebaut. In die ehemals gefäßfreien GC sprossen nun massiv Blutgefäße aus der TI. Sehr schnell bildet sich ein dichtes Kapillarnetz in der zusammengefallenen Follikelhöhle und es kommt zur Transformation von GC und TI in große bzw. kleine Lutealzellen. Das CL ist ein heterogenes Gewebe, das außer den Steroidproduzierenden Lutealzellen hauptsächlich aus Endothelzellen (EC), Fibroblasten, glatten Muskelzellen (SMC) und Immunzellen besteht (Reynolds et al., 1994). Das Gewebewachstum im CL hängt von der Entstehung und Stabilisierung neuer Gefäße ab, die seine Blutversorgung sichern. Im gereiften CL ist nahezu jede parenchymale Zelle in Kontakt mit einer oder mehreren Kapillaren. Dies spiegelt wieder wie wichtig angiogene Faktoren und Angiogenese für die Funktion des CL und damit die Fertilität sind (Redmer und Reynolds, 1996; Berisha et al., 2000b). Das CL ist einer der wenigen adulten Gewebe wo sich die streng kontrollierte Entstehung und Rückbildung von Blutgefäßen abspielt.

#### 2.1.4 Luteolyse (Regression) des Gelbkörpers (CL)

Kommt es nicht zu einer Befruchtung und Einnistung der Eizellen, so ist es für die Einleitung eines neuen Zyklus wichtig, dass sich das CL zurückbildet. Dies wird durch die pulsatile Sekretion von  $\text{PGF}_2\alpha$  in der Uterusschleimhaut ausgelöst. Es erreicht das Ovar über ein sogenanntes Counter Current System zwischen der Vena uterina und der Arteria ovarica (Berisha und Schams, 2005). Beim Rind beginnt die Rückbildung des CL etwa am 17. Tag des Zyklus. Die Kaskade der Mediatoren, die während der Luteolyse ablaufen, ist sehr komplex und immer noch nicht vollständig geklärt. Was man aber weiß ist, dass inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und vasoaktive Peptide (unter anderem z.B. Angiotensin II und Endothelin-1) eine Rolle spielen und eine Abnahme des lutealen Blutflusses und der klassischen luteotropen Faktoren vorliegt (Acosta et al., 2002; Krusche et al., 2002; Schams und Berisha, 2004). Allgemein wird die Luteolyse in zwei Phasen eingeteilt. Die funktionelle Luteolyse umfasst die ersten 12 Stunden nach dem Einsetzen von  $\text{PGF}_2\alpha$  und bedingt den zu beobachtenden, rapiden Abfall der  $\text{P}_4$ -Synthese. Bei der nachfolgenden strukturellen Luteolyse werden zunächst die kleinen Kapillaren abgebaut, dann setzen massiv apoptotische und nekrotische Prozesse ein, Immunzellen wandern ein und der Abbau des CL bis zu dem Zustand, wo nur bindegewebige Narben zurückbleiben, erfolgt innerhalb weniger Tage (Schams et al., 2003; Neuvians et al., 2004).

#### 2.1.5 Gonadotropine und Prostaglandine

Der Ablauf von Follikelwachstum, Ovulation, CL-Bildung und Luteolyse wird in erster Linie durch ein kompliziertes neuroendokrines System gesteuert, der Hypothalamus-Adenohypophysen-Ovarien-Achse. Im Hypothalamus wird das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) gebildet, welches über seine Rezeptoren an der Adenohypophyse, die Synthese und Ausschüttung der beiden Gonadotropine FSH und LH bewirkt. Diese haben am Ovar mannigfaltige Wirkungen, insbesondere stimulieren sie die Synthese von Steroiden (Gestagene, Östrogene und Androgene). Im weiblichen Organismus erfolgt diese während des ovariellen Zyklus. Die im Ovarium ansässigen GC der Primärfollikel sind die Zielzellen des FSH, welches die Zellen zur Produktion von  $\text{E}_2$  veranlasst. Dieses trägt zur Reifung der Follikel bei und der Anstieg dieses Hormons sorgt für eine negative Rückkopplung des FSH.  $\text{E}_2$  hemmt die Ausschüttung von GnRH, so dass die FSH Produktion unterbleibt. In dem Maße wie der  $\text{E}_2$ -spiegel nun ansteigt, sinkt der FSH-Spiegel. Durch diesen Mechanismus wird das Wachstum nur eines dominanten Follikels gefördert, wofür zudem das von den GC sezernierte Inhibin sorgt, welches die FSH-Freisetzung hemmt. Das Ende der Follikelphase wird durch den LH-Gipfel eingeleitet.  $\text{E}_2$  bewirkt die Freisetzung des LH aus der Hypophyse

und dieses dann die Synthese von Androgenen und deren Freisetzung, die Follikelausreifung, die Ovulation und die Bildung, Erhaltung und P4-Sekretion des CL (Döcke, 1994). LH wird während des Zyklus ebenfalls pulsatil abgegeben (Flowers et al., 1991; Walters et al., 1984).

Obligatorisch für die Ovulation sowie für die CL-Bildung und damit den Beginn der lutealen Phase, ist der schon erwähnte LH-Gipfel. Dieser entsteht durch die gleichzeitige Zunahme von Frequenz und Amplitude der LH-Pulse. Voraussetzung für den LH-Gipfel ist wiederum das positive E2-Feedback, das durch die präovulatorisch stark ansteigende E2-Produktion der reifenden Follikel ausgelöst wird. Im Ovar leitet der LH-Gipfel die letzte Mitosewelle der GC und die Ablösung des Cumulus oophorus ein. Im Durchschnitt vergehen beim Rind zwischen LH-Gipfel und Ovulation 26 Stunden (Schams et al., 1977). Nach dem Einfluss von LH und der erfolgten Ovulation schaltet der größte Teil der GC nun auf die Produktion von P4 um. Es hemmt die Ausschüttung der gonadotropen Hormone, wobei vorwiegend die Pulsfrequenz verringert wird und verhindert somit ein Heranreifen weiterer Follikel im Falle einer Befruchtung der Eizelle. Die LH-Rezeptoren besitzen ähnliche Eigenschaften wie die FSH-Rezeptoren und sind in GC und TI lokalisiert, wohingegen die FSH-Rezeptoren nur in den GC exprimiert werden. Die Ausbildung und Anzahl der LH-Rezeptoren wird sowohl über LH selber, als auch über FSH und E2 beeinflusst (Jia and Hsueh 1984; Jia et al. 1985; Kessel et al. 1985).

Prostaglandine, welche unter dem Überbegriff Eicosanoide eingeordnet werden, sind in vielen Vorgängen im Reproduktionssystem involviert (Döcke 1994). Vielfach nachgewiesen ist die essentielle Bedeutung von PGF<sub>2</sub>α für die Luteolyse. Während der CL-Phase hemmt P4 die Ausschüttung von PGF<sub>2</sub>α und fördert somit die Anreicherung von dessen Vorstufen. Das nach Beginn der Luteolyse vermehrt sezernierte E2 fördert die Synthese und Ausschüttung, so dass es zu einer erhöhten Pulsfrequenz und gleichzeitig vergrößerten Amplitude der PGF<sub>2</sub>α-Abgabe kommt (Döcke, 1994).

### 2.1.6 Steroidhormone und Aromatase

Steroide wirken sowohl lokal am Ovar, als auch über endokrine Wege, regulatorisch auf den Hypothalamus und die Adenohypophyse. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil der Hypothalamus-Adenohypophysen-Ovarien-Achse und essentiell für die Auslösung der Ovulation oder die CL-Funktion. P4 wird hauptsächlich im CL produziert und ist auch gleichzeitig das wichtigste Hormon des CL. P4 gehört zu den Gestagenen, seine Funktion besteht in der Vorbereitung des Uterus auf die Gravidität und deren Aufrechterhaltung. Es hat eine gonadotropin-hemmende Wirkung, wobei vorwiegend die Pulsfrequenz verringert wird. Seine inhibierende Funktion ist somit auf den LH-Gipfel gerichtet, so dass eine

Ovulation nur stattfinden kann, wenn kein CL mit Progesteron-Sekretion vorhanden ist (Döcke, 1994)

E2 wird hauptsächlich von den Ovarien sezerniert und sichert die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsmerkmale. Ein präovulatorischer Anstieg der folliculären E2 Sekretion findet in allen Säugetieren statt und ist notwendig für viele Aspekte der ovariellen und reproduktiven Funktion. Es ist eines der wichtigsten Hormone für die Follikelentwicklung (Richards, 1979) und wirkt unter anderem anti-apoptotisch auf GC und stimulierend auf die LH-R Synthese (Schams und Berisha, 2002a).

Die E2-Synthese wird durch FSH stimuliert (Tonetta und diZerega, 1989), aber auch LH scheint eine Rolle bei der Ausbildung des präovulatorischen E2-Gipfels zu spielen (Picton et al., 1999). Für die Bildung von E2 aus Androgenen ist das Enzym P450 Aromatase (P450 ARO) verantwortlich, ein Mitglied der Cytochrom P450 Familie. P450 ARO ist ein auf drei Genen codiertes gewebespezifisches Isozym, welches erst im Komplex mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase aktiv ist (Corbin et al. 2003). In seiner aktivierten Form konvertiert es Androgene zu E2. Beim Rind wird die P450 ARO ausschließlich in den GC synthetisiert (Fürbass et al., 1997)

## **2.2 Lokale (auto- und parakrine) Regulationsfaktoren**

In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, dass die endokrinen Faktoren nicht alleine für das perfekte Zusammenspiel eines funktionierenden Brunstzyklus sorgen können. Es ist heute klar, dass auch lokal produzierte Faktoren wie verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine eine sehr große Bedeutung im weiblichen Reproduktionszyklus haben. Im Gegensatz zu den hauptsächlich endokrin wirkenden Hormonen benutzen die, als Wachstumsfaktoren bezeichneten Polypeptide und Proteine, eher kurze Wege. Hierzu zählen sowohl die autokrine Wirkungsübung, also die auf die produzierende Zelle selbst, als auch die parakrine Wirkung auf umliegende Zellen. Wachstumsfaktoren werden entweder in die Umgebung der produzierenden Zelle sezerniert, oder sie sind membranständig. Durch Bindung des Liganden an spezifische Rezeptoren können durch Konformationsänderung und Signalübertragung unter anderem bestimmte Gene aktiviert oder abgeschaltet werden. Viele dieser Wachstumsfaktoren wurden im Ovar, Ovidukt und im Uterus verschiedener Säugetierspezies gefunden. Sie haben vielfältige biologische Wirkungen und steuern unter anderem den in Follikeln und CL unerlässlich vorkommenden Prozess der Angiogenese, also der Neubildung von Blutgefäßen. Außerdem beeinflussen sie spezifisch das Wachstum von Lymphgefäßen. Wachstumsfaktoren vermitteln ihren Zielzellen sich zu teilen oder in eine bestimmte Richtung zu wandern. Unter dem koordinierten Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren entstehen so neue Blut- und Lymphgefäße.

Diesen Mechanismus nutzen auch viele Tumoren und sezernieren diese Faktoren, was schließlich dazu führt, dass Gefäße zum Tumor hin sprossen. Tatsächlich ist es Forschern mittlerweile gelungen durch den Einsatz von verschiedenen Substanzen, die Tumorgefäßbildung zu unterbinden. Die heute geprüften bzw. eingesetzten Therapien richten sich gegen den VEGF-R2 (Valatanib, Sorafenib, Sunitinib) bzw. gegen VEGF-A (Bevacizumab, VEGF-Trap) (Huynh-Do, 2006).

### **2.3 Das Gefäßsystem im Ovar des Rindes**

Zu den Ovarien finden die Blut- und Lymphgefäße, sowie die Nerven ihren Weg durch das Ligamentum latum uteri. Dies stellt den Aufhängeapparat des Eierstocks dar und wird entsprechend auch als Eierstocksgekröse oder Mesovarium bezeichnet. Am Hilus ovarii treten die Gefäße schließlich in das Organ ein.

Die Blutversorgung der Eierstöcke erfolgt durch die paarig aus der Aorta abdominalis entspringende Arteria (A.) ovarica und die zu der Vena (V.) cava caudalis bzw. zu der gleichseitigen V. renalis hinziehenden V. ovarica. Der Ursprung der A. ovarica liegt beim Rind in Höhe des fünften Lendenwirbels. Auch Zweige der A. uterina können sich mit beteiligen. Vor Eintritt in den Hilus bzw. das Ovar selbst erfolgt eine starke Verästelung der genannten Gefäße, der Plexus ovaricus. Der Gefäßbaum unterliegt einem zyklusabhängigen Umbau, so dass die Funktionsgebilde, Follikel und CL, immer optimal versorgt werden können. Beim Rind verläuft die A. ovarica in Mäanderform und ist mit der großkalibrigen V. ovarica durch eine gemeinsame Muskelschicht verwachsen.

Auch die Lymphbahnen der Ovarien sind den zyklischen Veränderungen entsprechend einem ständigem Umbau unterworfen. Die Lymphkapillaren nehmen unter der Tunica albuginea ihren Ursprung. Indem sie in die Zona parenchymatosa eintauchen umgeben sie Primär- und Sekundärfollikel, evtl. auch die Bereiche der Zwischenzellen. Reifende und atretische Follikel sowie der CL sind von einem mehrschichtigen Kapillargeflecht umgeben. Mit dem Bindegewebe dringen Lymphkapillaren auch in das Zentrum des blühenden CL ein. Zwischen den Luteinzellen treten keine Lymphkapillaren auf. Alle Lymphbahnen der Zona parenchymatosa fließen zur Zona vasculosa, um hier einen kräftigen Lymphplexus zu bilden (von ihm wird auch angenommen, dass er durch maximale Füllung am Ovulationsvorgang beteiligt sein könnte). Aus ihm gehen die Lymphgefäße der Ovarien hervor, die von den Lymphonodi iliaci mediales sowie von den Lymphonodi lumbales aortici aufgenommen werden (Nickel et al., 1996).

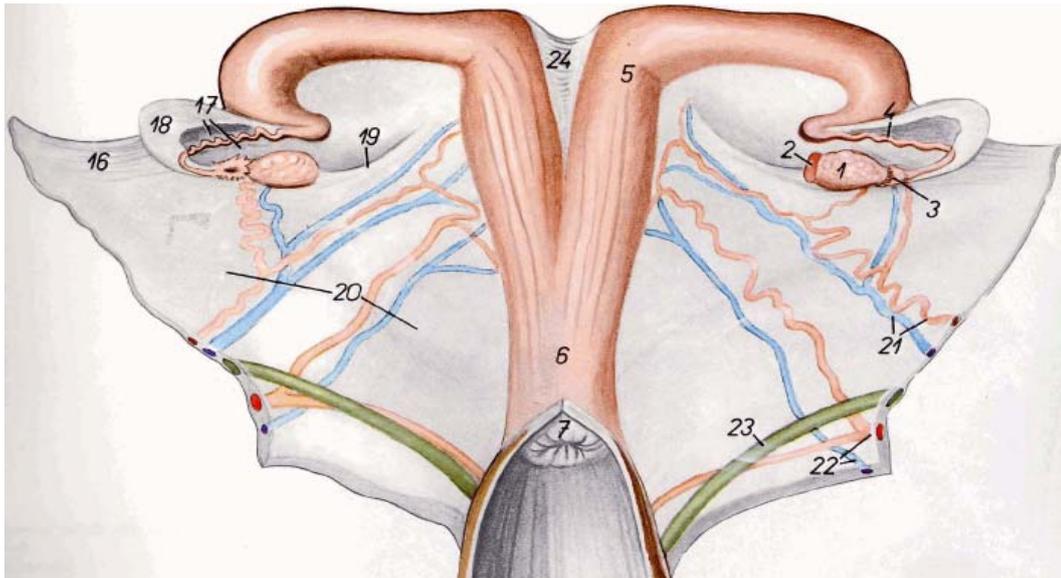


Abb.4: Weibliche Geschlechtsorgane beim Rind, Ansicht von dorsal, nach Entfernung des dorsalen Abschnittes der Scheide: 1. Ovarium 2. Corpus luteum 3. Infundibulum tubae uterinae 4. Tuba uterina 5. Cornu uteri 6. Corpus uteri 16. Mesovarium 17. Mesosalpinx 18. Bursa ovarica 19. Lig. ovarii proprium 20. Lig. latum uteri 21. A. und V. ovarica 22. A. und V. uterina 23. Ureter 24. Lig. intercornuale (Bearbeitet nach Popesko, 1979)

## 2.4 Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man einen Remodelierungs-Prozess und das daraus resultierende Wachstum von neuen, kleinen Blutgefäßen durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem (Risau, 1997). Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus den so genannten endothelialen Vorläuferzellen, welche als Vaskulogenese bezeichnet wird. Bei ihr geschieht die Neubildung von Gefäßstrukturen durch zirkulierende Stammzellen (Angioblasten), die sich zu de-novo Endothelzellen ausbilden. Diese Form der Angiogenese spielt insbesondere bei der Entwicklung des Gefäßsystems während der Embryonalentwicklung eine große Rolle. Bei der Ausbildung von neuen Gefäßstrukturen, aus bereits bestehenden, welche eine Endothelzell-Auskleidung sowie auch glatte Muskelzellen und Perizyten aufweisen, spricht man von Angiogenese. Physiologisch kommt der Vorgang der Angiogenese im adulten Organismus nur selten vor. Sie spielt jedoch bei Wundheilungsprozessen, aber auch im Rahmen von Entzündungen eine große Rolle. So kommt es z.B. bei Ulzera der Hornhaut nach Verletzungen zu einer Blut- und Lymphgefäßeinsprossung in die normalerweise gefäßfreie Hornhaut (Cursiefen et al., 2004). Eine Ausnahme stellt der weibliche Reproduktionstrakt dar, in welchem die Angiogenese regelmäßig während der Follikelentwicklung, der CL-Anbildung und der Plazentabildung während der Trächtigkeit stattfindet. Diese Perioden der Blutgefäßbildung sind relativ kurz und streng reguliert. Beim Tumorwachstum beispielsweise hat die Angiogenese dagegen

einen pathologischen Charakter (Klagsbrun und D'Amore, 1991). In den meisten Fällen sprossen neue Kapillaren hier aus bestehenden Kapillaren oder Venolen aus, seltener aus größeren Gefäßen mit mehreren Schichten glatter Muskulatur. Der Prozess der Angiogenese umfasst vier Abläufe, nämlich Exozytose, Chemotaxis, Zellteilung und Bildung einer extrazellulären Matrix (Findlay, 1986). Angiogenese wird durch verschiedene angiogene Faktoren stimuliert. Den ersten Schritt auf solch einen Stimulus, stellt die Degradation der Basalmembran eines existierenden Gefäßes durch Proteasen, z.B. Mitglieder der Matrix Metalloprotein-Familie (MMP), dar. Durch die Permeabilisierung der Basalmembran und damit Destabilisierung des Blutgefäßes können Endothelzellen (EC) aus dem Gefäß in Richtung des angiogenen Stimulus wandern und proliferieren. Dabei scheint insbesondere die Adhäsion zwischen EC und der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle zu spielen. Die auswandernden EC setzen sich zu Röhren mit Lumen zusammen und werden abschließend von einer Basalmembran umgeben. Um die neuen Blutgefäße zu stabilisieren müssen sich mesenchymale Zellen in glatte Muskulatur ähnliche Perizyten differenzieren und an der Außenseite der Gefäße anlagern (Findlay, 1986; Klagsbrun und Moses, 1999).

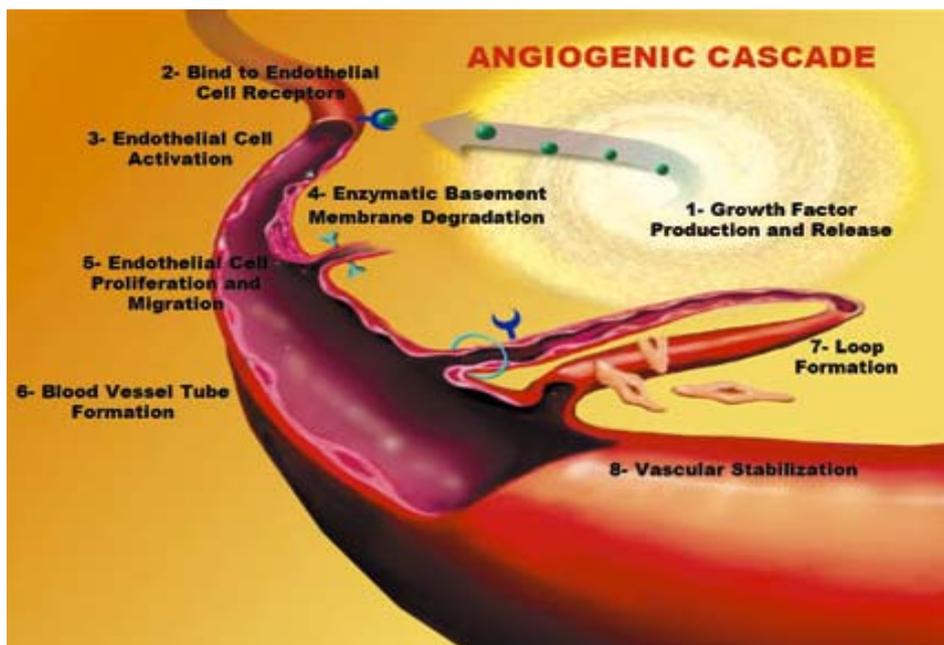


Abb.5: Die 8 Schritte der Angiogenese (<http://www.thehighlights.com>)

### Angiogenese und Ovar

Die Angiogenese spielt eine wesentliche Rolle für die Ovar-Funktion. So ist die Entwicklung der Follikel vom Primordialstadium bis zum Graafschen Follikel von qualitativen und quantitativen Veränderungen der mikrovaskulären Versorgung begleitet. Während Primordial- und Primärfollikel von einzelnen Kapillarschlingen im Stroma umgeben sind, wird der Sekundärfollikel von einer eigenen Arterie versorgt, die sich im Bereich der TE in drei bis vier Arteriolen verzweigt. Beim Übertritt in die TI bildet sich aus den Arteriolen ein dichtes Netzwerk von Kapillaren, das sich rund um die avaskuläre GC-Zellschicht verteilt. Somit ist der steigende Bedarf an Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren im wachsenden Follikel gesichert. Mit zunehmendem Wachstum des Follikels verdichtet sich das Kapillarnetz weiter, der Diameter der Blutgefäße nimmt zu (Plendl, 2000). Wahrscheinlich spielt die vaskuläre Versorgung auch beim Selektionsprozess eine Rolle, da dominante Follikel stärker vaskularisiert sind als nicht selektierte antrale Follikel (Reynolds und Redmer, 1998), was wiederum eine bessere Versorgung mit Gonadotropinen bedeutet (McNatty et al., 1981).

Auch beim Aufbau des CL ist der Vorgang der Angiogenese essentiell. Nach der Ovulation kommt es zur Einsprossung der Kapillaren aus der TI in die avaskuläre GC und zur Bildung eines dichten Gefäßnetzwerkes, so dass nach Aufbau des CL jede Lutealzelle zumindest mit einer Kapillare in Kontakt steht (Gaytan et al., 1999, Kaczmarek et al., 2005). Mehr als 50% der proliferierenden Zellen während des CL-Wachstums sind EC (Reynolds et al., 1994), was eine 4- bis 20-fach höhere Rate als in hoch malignen Tumoren bedeutet (Stouffer et al., 2001). Es wird vermutet, dass ein reduzierter ovarieller Blutfluss eine kritische Rolle bei der luteolytischen Regression spielt und auch EC wichtig im Prozess der Luteolyse sind (Girsh et al., 1995).

Durch diese zyklisch wiederkehrenden Vorgänge ist das weibliche Reproduktionssystem ein einzigartiges Modell, um die Regulation der Angiogenese während Wachstum und Differenzierung normaler erwachsener Gewebe zu studieren.

Wann und wie stark Angiogenese stattfindet ist immer das Resultat eines komplizierten Gleichgewichts zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren und Zytokinen. Zu jedem Zeitpunkt liegen gefäßfördernde und -hemmende Faktoren nebeneinander vor. Entscheidend dafür ob Angiogenese (oder Lymphangiogenese) stattfindet, oder nicht, ist höchstwahrscheinlich das Verhältnis oder der Quotient aus Stimulatoren und Inhibitoren (Kerbel, 2004; Morelli et al., 1998).

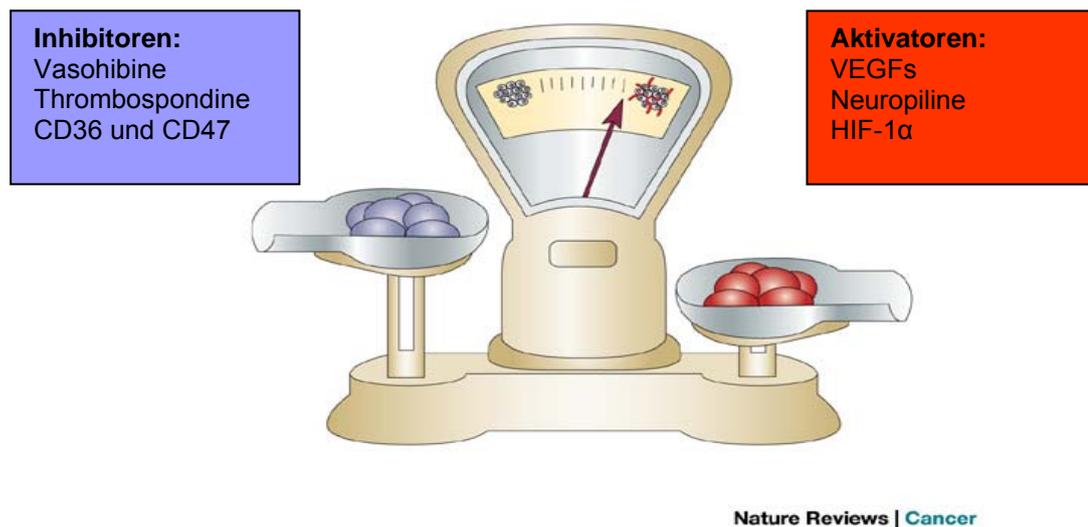


Abb.6: Veranschaulichung des Zusammenspiels zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren. Die jeweils überwiegende Fraktion entscheidet darüber, ob Gefäßneubildung stattfindet oder unterdrückt wird (Abgewandelt aus *Nature Reviews/Cancer*).

Viele angiogene Faktoren gehören zu der großen Gruppe der so genannten Wachstumsfaktoren. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Polypeptiden und Proteinen, welche über die Aktivierung spezifischer Rezeptoren regulatorisch auf bestimmte Zell- oder Gewebetypen wirken. Als erstes Mitglied der Wachstumsfaktoren wurde 1954 der „Nerve Growth Factor“ identifiziert und beschrieben (Levi-Montalcini, 1987). Durch Beeinflussung von Ionenstrom, Glucosetransport und Zirkulation der Aminosäuren (AS) üben die Wachstumsfaktoren ihre Wirkung auf ihre Zielzelle aus. Außerdem greifen sie steuernd in die Protein-, RNA-, und DNA-Synthese ein und nehmen somit Einfluss auf die Differenzierung und Zellteilung (Weimann und Kiess, 1991). Letztere Eigenschaft hat schließlich zu der Bezeichnung „Wachstumsfaktor“ geführt. Wachstumsfaktoren beeinflussen und steuern eine große Anzahl zellulärer Funktionen, z.B. bewirken sie Effekte auf die Bildung der extrazellulären Matrix, Zellmotilität, Zellviabilität, Sekretion anderer Zytokine und die Expression und Stabilisierung von Differenzierungscharakteristika. Dabei können die meisten Faktoren sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken und besitzen untereinander synergistische als auch antagonistische Eigenschaften.

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren mit unterschiedlichen Signalinduktionen sind heute bekannt; Beispiele sind:

- Fibroblast Growth Factor (FGF)
- Transforming Growth Factor (TGF)
- Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)
- Epidermal Growth Factor (EGF)
- Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
- Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)
- Hepatocyte Growth Factor (HGF)
- Interleukin-1 $\beta$ , -8 (IL-1 $\beta$ , IL-8)
- Nerve Growth Factor (NGF)

Über die Bedeutung der Mitglieder der VEGF-, FGF- und PDGF-Familien im bovinen Ovar ist das Wissen in den letzten Jahren stetig gestiegen. Außerdem bereits im Ovar nachgewiesen und auf ihre Bedeutung hin untersucht, wurden unter anderem Angiopoietin, das NO-System und Extrazelluläre Matrixproteasen (ECMP), wie die Matrix Metalloproteasen (MMP) und das Plasmin Aktivatorsystem (PA) (Berisha et al., 2000a, 2000b, 2004, 2006a, 2006b; Schams et al., 1994, 2001; Schams und Berisha, 2002b; Maisonpierre et al., 1997).

## 2.5 Angiogene Faktoren

### 2.5.1 VEGF-Familie: VEGF-A, VEGF-B und ihre Isoformen

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Forschungsarbeiten eine Schlüsselrolle von Mitgliedern der VEGF-Familie bei der Regulierung von physiologischer und pathologischer Angiogenese nachgewiesen. Die VEGF-Familie besteht aus verschiedenen Mitgliedern, VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, EG-VEGF (endocrin gland VEGF), dem Plazenta-Wachstumsfaktor (PIGF) und zwei VEGF-ähnlichen Proteinen (Ferrara und Davis-Smyth 1997). Hauptsächlich wirken diese Faktoren auf Endothelzellen (EC), sie können aber auch an VEGF-Rezeptoren auf hämopoetischen Stammzellen, Monozyten, Osteoblasten und Neuronen binden (Ferrara et al., 2003).

VEGF wird seit vielen Jahren erforscht und gilt als der bedeutendste Faktor im Zusammenhang mit Angiogenese. So starben Mäuse ohne VEGF (VEGF<sup>-/-</sup>) oder nur einem VEGF-Allel (VEGF<sup>+/-</sup>) während der embryonalen Entwicklung auf Grund gestörter Vaskulogenese und Angiogenese. Eine Überexpression von VEGF führte ebenfalls zum Tod der Feten, erzeugt durch Hypervaskularisierung und damit übermäßigen Gewebewachstums

(Stouffer et al., 2001). Während VEGF-B bis vor kurzem hauptsächlich der Entwicklung der Herzkranzgefäße und Durchblutung des Herzens zugerechnet wurde und bei der inflammatorischen Angiogenese eine Rolle spielt, sind VEGF-C und VEGF-D mit für die Bildung des lymphatischen Systems verantwortlich (Tammela et al., 2005b). Über sie wird später bei der Einleitung zu den lymphangiogenen Faktoren und ihren Rezeptoren noch genauer eingegangen (vgl. 2.8.1). VEGF-A galt jahrelang als „rein“ hämangiogen wirkend. Erst vor kurzem machten Cursiefen et al. (2004) jedoch neue Entdeckungen. Es konnte dabei erstmals gezeigt werden, dass VEGF-A neben seinem stimulierenden Effekt auf Blutgefäße auch die Aussprossung von Lymphgefäßen in die Hornhaut vermittelt. Mittels neuer anti-angiogener Medikamente, die gegen VEGF-A gerichtet sind, konnte die Einsprossung von Blut- und erstaunlicherweise auch von Lymphgefäßen inhibiert werden. Die Genexpression von VEGF-A kann, unter anderem, durch den Sauerstoffgehalt der Zellen beeinflusst werden. Hypoxie bewirkt über den Hypoxie-induzierbaren-Faktor (HIF-1) eine Aufregulierung von VEGF-A (Dor et al., 2001; Semenza, 2002). Auch andere Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF-1 oder FGF-7 und auch LH regulieren die VEGF-A Expression auf (Ferrara et al., 2003). Die biologischen Funktionen von VEGF-A umfassen die Induzierung der Proliferation, Migration und Röhrenbildung von EC (Ferrara et al., 2003). Des Weiteren erhöht VEGF-A die Permeabilität des Endothels (Bates et al., 2002) und wirkt vasodilatatorisch durch die Stimulierung der endothelialen NO-Synthase und einem nachfolgendem Anstieg der NO-Produktion (Kroll und Waltenberger, 1998; Hood et al., 1998). Auch ein anti-apoptotischer Effekt auf EC in neu geformten, aber noch nicht ausgereiften, Blutgefäßen wurde nachgewiesen. Dabei scheint die Ummantelung der neuen Blutgefäße mit Perizyten den kritischen Punkt darzustellen, ab dem die Blutgefäße nicht mehr auf den Schutz von VEGF-A angewiesen sind. (Benjamin et al., 1999; Gerber et al., 1999). Von VEGF-A und VEGF-B sind bislang mehrere molekulare Isoformen bekannt, welche durch alternatives Splicing des Gens entstehen und sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren (AS) unterscheiden. Hierbei handelt es sich um die Isoformen VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub> (Ferrara et al., 2003), sowie die Isoformen VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub>. Die im Rind bekannten Isoformen enthalten jeweils eine AS weniger (Kaczmarek et al., 2005), im Folgenden werden jedoch der Einfachheit halber die geläufigen (humanen) Zahlenbezeichnungen verwendet. VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> sind die Hauptformen, welche von den meisten Zelltypen sekretiert werden (Robinson und Stringer, 2001). Alle drei Splicing-Isoformen wurden bereits im bovinen Ovar nachgewiesen (Berisha et al., 2000a).

*VEGF-A und seine Isoformen:*

In einer Vielzahl an Zelltypen werden die verschiedenen VEGF-A Isoformen exprimiert. Im bovinen CL wurde mRNA von VEGF-A und sein Protein in Lutealzellen nachgewiesen. Außerdem wurde es in SMC und Perizyten von Blutgefäßen während der lutealen Regression gefunden (Vonnahme et al., 2006; Berisha et al., 2000b). Alle VEGF-A Isoformen agieren als Homodimere oder sie bilden Heteroimere mit VEGF-B Isoformen. Sie fungieren als potente Mitogene für EC, fördern die Permeabilität von Gefäßen und sichern weiterhin das Überleben und die Migration von EC (Takahashi und Shibuya, 2005). Die bevorzugt exprimierten und auch die in dieser Arbeit untersuchten Isoformen sind, wie gesagt, VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> (Robinson und Stringer, 2001). VEGF-A<sub>121</sub>, die kleinste Isoform, ist ein löslicher Faktor. Im Gegensatz zu den anderen Formen fehlen ihm die Exons (6 und 7), welche die Heparin-Bindungsdomäne enthalten. VEGF-A<sub>165</sub> (ihm fehlt das Exon 6) hat moderate Heparin-bindende Fähigkeiten und ist teilweise an Zellen der extrazellulären Matrix (ECM) gebunden, wohingegen VEGF-A<sub>189</sub> exklusiv in den ECM lokalisiert ist und in geringerem Umfang auch auf der Zelloberfläche. ECM-assoziierte Isoformen können mobilisiert werden, wenn sie Heparin, Heparinsulfat und Heparinasen ausgesetzt sind – oder auch noch schneller, durch die C-terminale Spaltung durch proteolytische Enzyme (Robinson und Stringer, 2005; Takahashi und Shibuya, 2005).

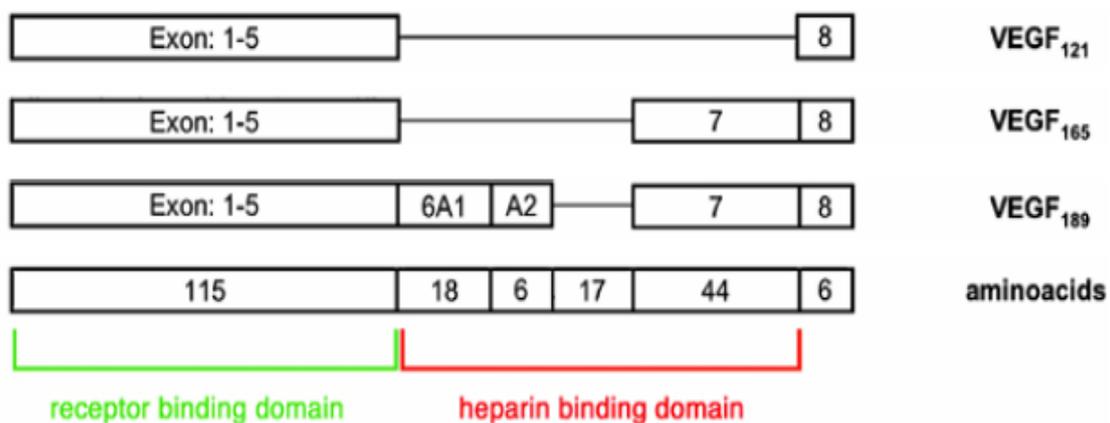


Abb.7: Exon-Organisation der untersuchten VEGF-A Isoformen und die Exon-Längen (in Aminosäuren). Die unterschiedliche Vollständigkeit der Heparin-Bindungsdomäne ist der Grund für die unterschiedliche Löslichkeit der Faktoren. Die Abbildung wurde modifiziert nach Eming und Krieg (2006).

Die eindeutigen Rollen dieser Isoformen wurden noch nicht genau geklärt. Eine Theorie ist die gemeinschaftliche Ausbildung eines räumlichen Signalgradienten durch ein Zusammenwirken der Isoformen (Guo et al., 2001). Das Signal von VEGF-A wird durch VEGF-R1 und VEGF-R2 vermittelt und teilweise durch die Neuropiline 1 und 2 moduliert, die später noch genauer beschrieben werden. Der größte Stimulator für VEGF-A ist Hypoxie,

welche außerdem die Stabilität der mRNA von VEGF-A erhöht (Robinson und Stringer, 2005; Takahashi und Shibuya, 2005).

Nach Untersuchungen an Knockout-Mäusen, scheint VEGF-A<sub>165</sub> der wichtigste Vertreter zu sein (Tammela et al., 2005a). VEGF-A<sub>121</sub> und teilweise auch VEGF-A<sub>165</sub> sind diffusionsfähig und können so relativ frei in andere Gewebe gelangen. Etwa die Hälfte des sekretierten VEGF-A<sub>165</sub> bindet aber an HSPGs (Heparan-Sulfat-Proteoglykane), welche in der ECM bzw. an der Zelloberfläche vorkommen (Houck et al., 1992). VEGF-A<sub>189</sub> wird komplett von HSPGs in der ECM sequestriert, so dass die HSPGs ein Depot von VEGF bereithalten, welches bei Bedarf durch Proteolyse mobilisiert werden kann (Ferrara et al., 2003).

Bereits vorliegende Studien von VEGF-A im bovinen CL zeigten, dass seine mRNA-Expression in der frühlutealen Phase am höchsten war, über den Verlauf des Zyklus erniedrigt wurde und während der Regression noch weiter abfiel (Berisha et al., 2000b). Allerdings wurde damals nur die gesamt-VEGF-A mRNA im CL nachgewiesen und nicht zwischen seinen einzelnen Isoformen unterschieden. In superovuliertem Follikelgewebe (nicht aufgeteilt nach GC und TI) nach GnRH-Injektion haben Berisha et al. (2008) die mRNA Expression der Isoformen VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> untersucht und festgestellt, dass die Expression ab 4 h nach der Injektion beginnen abzufallen, zur Ovulation hin immer weiter abnimmt und mit dem CL-Wachstum wieder ansteigt.

#### *VEGF-B und seine Isoformen:*

Der Faktor VEGF-B wurde erst 1995 entdeckt und ist daher bisher nur in seinen Anfängen erforscht. Sein Gen besteht aus sieben Exons und trotz der strukturellen Verwandtschaft von VEGF-A und VEGF-B, weist vieles darauf hin, dass es keine typisch angiogene Eigenschaften auf. Es wird als Disulfid-gebundenes Homodimer produziert und kann mit VEGF-A Heterodimere ausbilden. Die Isoformen zeigen verschiedene Affinitäten zu Heparin, was wiederum Auswirkungen auf ihre Löslichkeit hat. VEGF-B<sub>186</sub> ist eine löslich sezernierte Form, wohingegen VEGF-B<sub>167</sub> von der ECM ausgebildet oder gebunden wird (Robinson und Stringer, 2005).

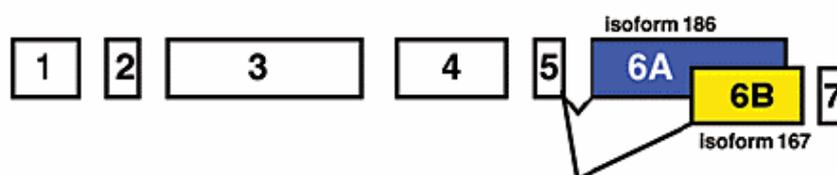


Abb.8: Exon-Organisation der zwei VEGF-B Isoformen. Die zusätzliche C-terminale Sequenz von VEGF-B<sub>167</sub> ist verantwortlich für die schlechtere Löslichkeit dieser Isoform. Die Abbildung wurde Giordano et al. (2001) entnommen.

Beide VEGF-B Isoformen binden ausschließlich an den VEGF-R1. VEGF-B<sub>167</sub> interagiert zudem mit Neuropilin-1 (Robinson und Stringer, 2005; Takahashi und Shibuya, 2005). VEGF-B wird in vielen Geweben exprimiert und wird vor allem im Herzen und im Skelettmuskel gefunden. In vaskulären Strukturen wurden VEGF-B Isoformen nicht in den EC, aber in den SMC nachgewiesen (Aase et al., 1999). Für den adulten Organismus konnten offenkundige Funktionen noch nicht genau bestimmt werden. Olofsson et al. (1998) berichteten, dass VEGF-B möglicherweise eine Rolle bei der Expansion von Blutgefäßen spielt, indem es die Auflösung der ECM durch Stimulierung des Plasminogen-Aktivator unterstützt. Dies fördert dann wiederum die Zellmigration. Li et al. (2008) beschrieben anti-apoptotische Effekte, die durch VEGF-B Wirkung mittels des VEGF-R1 vermittelt werden. Sauerstoffmangel hat keinen Einfluss auf die Expression von VEGF-B, da ihm eine entsprechende Promoterregion hierfür fehlt (Enholm et al., 1997).

### *VEGF-Rezeptoren:*

Als Rezeptoren fungieren Tyrosinkinase-Rezeptoren mit hoher Affinität für VEGF. Bisher bekannt sind die VEGF-R1, -R2 und -R3. Die VEGF-R1 und -R2 werden auch als Flt (fms-like tyrosine kinase receptor) bezeichnet und VEGF-R2, auch als Flk-1 (fetal liver kinase-1) oder KDR (kinase insert domain-containing receptor).

Beide Rezeptoren zeigen eine 85%ige Sequenzhomologie miteinander (Matthews et al., 1991). Sie bestehen aus sieben extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer einzelnen transmembranen Region und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Von VEGF-R1 existiert zusätzlich noch eine alternative Splicingform, welche löslich ist (soluble VEGF-R1) und eine inhibierende Wirkung auf die VEGF-Aktivität hat (Kendall und Thomas, 1993). Neuropilin- (Nrp.) 1 und Nrp.-2 dienen ihnen als Co-Rezeptoren.

Der erste entdeckte Rezeptor war VEGF-R1, welcher die höchste Affinität für VEGF besitzt und der am meisten vorkommende Rezeptor in embryonalen und adulten EC darstellt (Robinson und Stringer, 2001). Sein Vorkommen sowohl in ruhenden, als auch in proliferierenden EC, lässt auf eine Rolle für die Erhaltung von EC schließen (Fong et al., 1995). Bisher konnte kein direkter Einfluss von VEGF-R1 auf die Proliferation, Migration oder den Zytoskelettaufbau der EC beobachtet werden (Robinson und Stringer, 2001). In anderen Zellarten sind für VEGF-R1 mehrere Funktionen nachgewiesen, wie z.B. die Induktion von Gewebefaktoren wie Urokinase-Plasminogen-Aktivator, Chemotaxis von Monozyten und die Steigerung der Expression von MMPs in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen (Robinson und Stringer, 2001).

VEGF-R2 hat zwar eine geringere Bindungs-Affinität für VEGF, ist aber hauptsächlich für die Transmitterfunktion von VEGF-Signalen in die EC verantwortlich (Tammela et al., 2005a) und damit Hauptmediator für mitogene-, angiogene und Permeabilitäts-auslösende Effekte

von VEGF. Durch Dimerisation und Ligand-abhängige Tyrosin Phosphorylierung von VEGF-R2 in intakten Zellen werden nach Ferrara et al. (2003) mitogene, chemotaktische und anti-apoptotische Signale ausgelöst. Im Gegensatz zu VEGF-R1 ist VEGF-R2 in adulten ruhenden vaskulären EC herunterreguliert und nur in angiogen aktiven EC wieder aufreguliert (Tammela et al., 2005a). In vivo werden beide Rezeptoren durch Hypoxie aufreguliert (Tuder et al., 1995; Li et al., 1996). Stimulierung durch VEGF selber bewirkt ebenfalls ein erhöhte Expression des VEGF-R2 Gens und steigende intrazelluläre VEGF-R2 Konzentrationen (Shen et al., 1998).

Der zuletzt identifizierte VEGF-R3 dient als Rezeptor für die vermehrt lymphangiogen wirkenden Formen VEGF-C und VEGF-D. Beim Menschen sind bisher zwei Isoformen von ihm bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen. VEGF-R3s (short) und VEGF-R3l (long) unterscheiden sich ihren Carboxyl-Enden (Pajusola et al., 1992). Die Rolle des VEGF-R3 in der Regulation der Lymphangiogenese ist durch seine Verbindung mit den Liganden VEGF-C und VEGF-D unbestritten. Dies kann auch in seiner Beschränkung auf die lymphatischen Gewebe während der späteren embryonalen Entwicklung gesehen werden. Es muss allerdings erwähnt werden, dass VEGF-R3 auch mit der Hämangiogenese in Zusammenhang gebracht wird. Als Witmer et al. (2001) die Gefäßneubildung in der Iris durch VEGF-A induzierte, wurde eine dadurch stimulierte Expression von VEGF-R3 beobachtet. Da die Iris bekannterweise keine Lymphgefäße besitzt, glaubt man demzufolge, dass VEGF-R3 irgendwie auch in die Angiogenese involviert ist. VEGF-R3 wird durch VEGF-C und VEGF-D aktiviert. Proteolytischer Einfluss dieser Liganden bringt jedoch Varianten hervor, die die Fähigkeit haben, auch mit VEGF-R2 zu interagieren. VEGF-R3 kann in lymphatischen EC außerdem Heterodimere mit VEGF-R2 bilden wodurch die Palette an biologischen Signalweg-Möglichkeiten mittels dem VEGF-R3 noch erweitert wird (Dixelius et al., 2003). Studien zu VEGF-R3 im bovinen CL während des Zyklus und der Trächtigkeit haben erbracht, dass im Gegensatz zu VEGF-R1 und VEGF-R2 die mRNA-Expression dieses Rezeptors während der Gravidität stark aufreguliert wird (Richter, 2007). Im Verlauf der Trächtigkeit bleiben die Expressionsspiegel auf konstantem Niveau.

Zusammenfassung der Bindungsverhältnisse der VEGF-Formen:

- VEGF-A bindet an VEGF-R1 und VEGF-R2, Nrp.-1 und Nrp.-2
- VEGF-B bindet nur an VEGF-R1 und Nrp.-1
- VEGF-C und VEGF-D binden an VEGF-R2 und VEGF-R3
- Nrp.-2 kann mit allen 3 VEGF-R interagieren
- Nrp.-1 interagiert nur mit VEGF-R1 und VEGF-R2

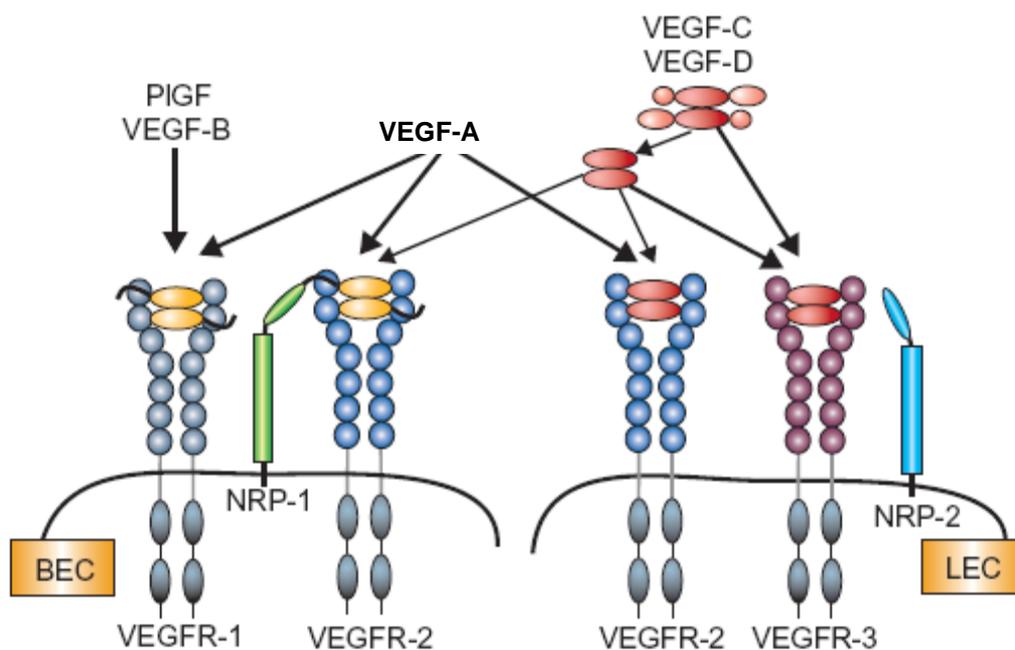


Abb.9: Schema der VEGF-R Signalwege in Blutgefäß-Endothelzellen (BEC) und Lymphgefäß-Endothelzellen (LEC). VEGF-R1 und Neuropilin-1 (Nrp.-1) sind hauptsächlich in den EC von Blutgefäßen exprimiert, VEGF-R3 und Nrp.-2 in EC von Lymphgefäßen. VEGF-R2 kommt in beiden vor. Er wird für den bedeutendsten Signal-vermittelnden Rezeptor gehalten, da er verschiedene nachgeschaltete Signalmoleküle aktiviert und Antworten wie Zellproliferation, -Migration und -Überleben induziert. Das VEGF-R1 Signal ist noch nicht vollkommen verstanden. VEGF-C und VEGF-D sind Liganden für den VEGF-R3 und sie können das Überleben, die Migration und das Wachstum von LEC induzieren. Nach proteolytischer Spaltung können VEGF-C und VEGF-D jedoch auch an VEGF-R2 binden, ihn aktivieren und so BECs und LECs stimulieren. (abgewandelt aus Karkkainen et al., 2002)

### 2.5.2 Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (Nrp.)

Neben seinen Tyrosinkinase-Rezeptoren interagieren die verschiedenen VEGF-Formen auch mit einer Familie von Co-Rezeptoren, den Neuropilinen (Nrp). Nrp.-1 und Nrp.-2 spielen eine Rolle in immunologischen Abläufen und bei der neuronalen Entwicklung, sind aber auch in die Angiogenese involviert (Bagri und Tessier-Lavigne, 2002; Klagsbrun et al., 2002). Nach Takashima et al. (2002) spielen Nrp.-1 und Nrp.-2 eine entscheidende Rolle in der Gefäßbildung und der Angiogenese, da er beobachtete, dass einfach ausgeknockte Mäuse embryonal letal waren und zweifach ausgeknockte Embryos sogar in einem noch früheren Stadium, aufgrund von Gefäßabnormalitäten starben.

Bei den Nrp. handelt es sich um transmembrane Glykoproteine mit ungefähr 140 kDa Größe. Sie verfügen über eine zytoplasmatische Domäne und einem extrazellulären Teil mit fünf eigenständigen Domänen. Nrp.-1 ist zu 47% homolog zu Nrp.-2 (Soker et al., 1998).

Aufgrund ihrer kurzen intrazellulären Domäne scheinen Nrp. keine eigene intrazelluläre Signalübertragung durchführen zu können (Soker et al., 1998). Sie dienen jedoch als wichtige Co-Rezeptoren. Nrp. binden VEGF-Liganden in einer Isoform-spezifischen Art und Weise. Von Nrp.-1 weiß man, dass es VEGF-A<sub>165</sub> bindet und zwar mit einer viel höheren Affinität als Nrp.-2 (Soker et al., 1998). Außerdem bindet es VEGF-B<sub>167</sub> an seiner Heparin-bindenden Domäne und VEGF-B<sub>186</sub> nach proteolytischen Prozessen. Es dient als Co-Rezeptor für VEGF-R1 und VEGF-R2 und ist hauptsächlich in arteriellen Strukturen lokalisiert (Yuan et al., 2002; Mäkinen et al., 1999; Favier et al., 2006; Herzog et al., 2001). VEGF-A<sub>121</sub> kann nicht an Nrp.-1 binden, was ein Grund für die geringere mitogene Aktivität dieses Liganden sein könnte (Ferrara et al., 2003). Neueste Daten haben begonnen die biologische Funktion dieser Co-Rezeptor-Komplexe zu klären. Es wurde gezeigt, dass Nrp-1 durch Verbindung mit VEGF-A<sub>165</sub> einen Komplex mit VEGF-R2 bilden kann und somit die Bindung von VEGF-A<sub>165</sub> zu VEGF-R2 um ein vier bis sechsfaches erhöhen kann (Soker et al., 2002; Whitaker et al., 2001). Es wurde außerdem postuliert, dass die Co-Expression von Nrp-1 mit VEGF-R1 den Effekt von VEGF-B<sub>167</sub> in Zellen potenziert (Mäkinen et al., 1999; Neufeld et al., 1999). VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>145</sub> (Gluzman-Poltorak, 2001) und VEGF-C sind Liganden für Nrp.-2. Es ist mittlerweile außerdem bekannt, dass es Komplexe mit allen drei VEGF-Rezeptoren eingehen kann. Im Gegensatz zu Nrp.-1 ist Nrp.-2 in Lymphgefäßen und Venen lokalisiert, was seine mögliche zweifache Wirkung unterstreicht, nämlich die in der Angiogenese und Lymphangiogenese. Yuan et al. (2002) hat gezeigt, dass Nrp.-2 die Signalübertragung des VEGF-R3 bei der Angiogenese und Lymphangiogenese moduliert. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass Nrp.-2 die Affinität von VEGF-R3 für VEGF-A und VEGF-C erhöhen und so die Ligand-induzierte Antwort verstärken könnte (Favier et al., 2006).

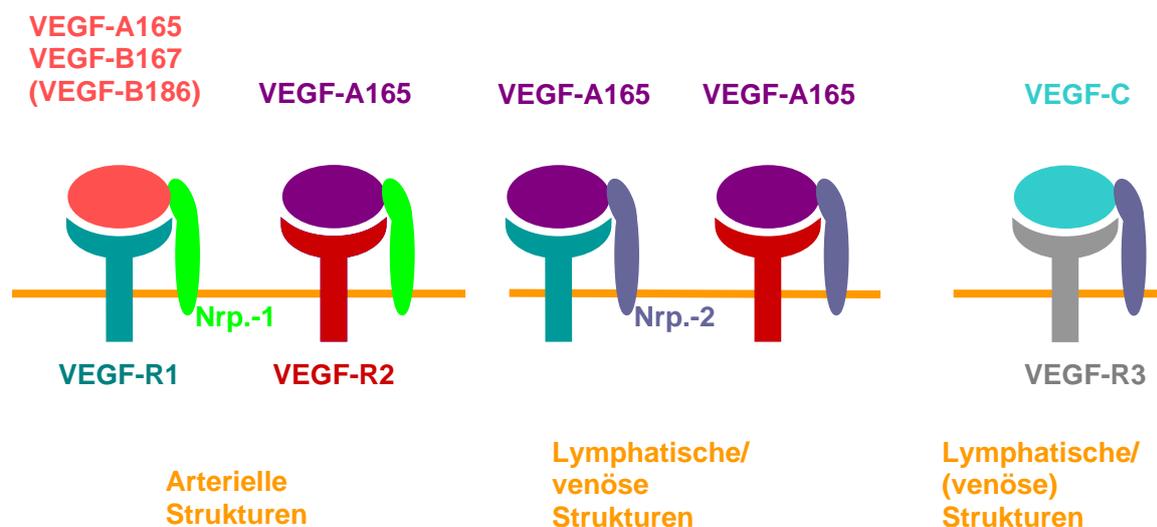


Abb.10: Die VEGF-Isoformen, Neuropiline und VEGF-Rezeptoren und wie sie interagieren. (abgewandelt aus Koh, 2008)

### 2.5.3 Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-1)

Mit Hypoxie wird der Zustand bezeichnet, wenn, normalerweise aufgrund von ungenügender Durchblutung, in einem Körper oder Gewebe Sauerstoffmangel herrscht. Sauerstoffmangel-Stress kann auch nur auf Zellen innerhalb eines bestimmten Bereiches in einem spezifischen Organ begrenzt sein, wie z.B. dem CL während seiner Entwicklung. Sauerstoffmangel ist folglich ein Schlüsselindikator der Angiogenese für beide Situationen, bei physiologischen wie auch bei pathologischen Begebenheiten. Er bewirkt dann eine gesteigerte Expression von angiogenen Faktoren, von Erythropoietin (EPO), bestimmten glycolytischen Enzymen und Glucosetransportern.

Der Mechanismus dieser Reaktion ist komplex und angewiesen auf eine Hypoxia-Responsive-Element-Sequenz (HRE) in den 5' und 3' Regionen dieser Gene (Dachs et al., 2000; Ryan et al., 2000; Tsuzuki et al., 2000).

Situationen mit mangelnder Sauerstoffversorgung stimulieren die Bindung des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1-Komplexes (HIF-1) an diese Sequenzen, fördern damit die Transkription und verbessern die RNA-Stabilität (Jones et al., 2001). HIF-1 ist ein Heterodimer, das aus den Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  besteht. HIF-1 $\beta$  ist konstitutiv exprimiert, während HIF-1 $\alpha$  unter normalen Umständen, wenn es im Zytosol vorliegt, durch die so genannte Ubiquitinierung abgebaut wird. Bei diesem Vorgang wird Ubiquitin kovalent an Proteine gebunden, wodurch deren Halbwertszeit, Lokalisation oder Funktion reguliert wird (Iyer et al., 1998).

Sauerstoffunterversorgung verhindert die Protein-Ubiquitinierung und stabilisiert die HIF-1 $\alpha$  Untereinheit, indem die HIF-1 Prolinhydroxylase inhibiert wird, welche Hif-1 $\alpha$  sonst markiert und zum Abbau frei gibt. Folglich ist HIF-1 $\alpha$  nur in Zellen mit Sauerstoffmangel vertreten und die Regulation der transkriptionalen HIF-1 Aktivität ist in erster Linie durch die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins, das nur bei Hypoxie akkumulieren kann, bedingt. Dem Transport des Komplexes in den Zellkern muss die Bildung von HIF-1 $\alpha$ - und HIF-1 $\beta$ -Dimeren im Zytosol vorausgehen (Huang et al., 1998).

Bindungsstellen für HIF-1 wurden auf Regionen des VEGF-A Gens (Dachs und Toser, 2000; Ryan et al., 2000; Tsuzuki et al., 2000), des VEGF-R1 Gens (Gerber et al., 1998) und möglicherweise auch in der Promotorregion des Gens für EG-VEGF (LeCouter et al., 2001) gefunden. VEGF-R2 wird durch Hyoxie ebenfalls aufreguliert, die Rolle von HIF-1 ist hier aber noch nicht geklärt. Einige Autoren vertraten früher die Meinung, dass ein Sauerstoffmangel seinen Einfluss auf HIF-1 ausschließlich auf Proteinebene ausübt (Fukuda et al., 2002; Slomiany und Rosenzweig, 2006; Boonyaparakob et al., 2005; Wenger et al., 1997)

Die HIF-1 Expression wird jedoch auch durch Zytokine reguliert, z.B. durch IGF-1. Im Gegensatz zu Sauerstoffmangel als Initiator, hat IGF-1 auch einen Einfluss auf die mRNA-Konzentration von HIF-1 $\alpha$  (Fukuda et al., 2002; Slomiany und Rosenzweig, 2006)

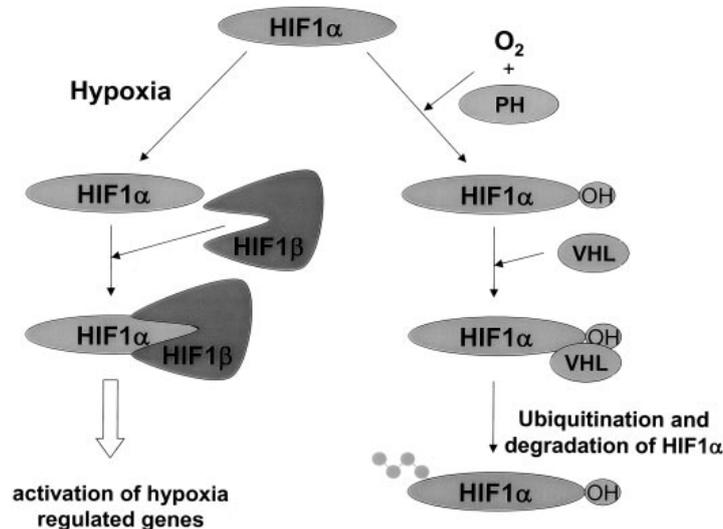


Abb.11: HIF-1 ist der wichtigste Transkriptionsfaktor für Hypoxie-regulierte Gene, wie z.B. VEGF-A. Der funktionale Transkriptionsfaktor ist ein Heterodimer und besteht aus HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ . Während HIF-1 $\beta$  konstitutiv exprimiert wird, wird HIF-1 $\alpha$  nur in Sauerstoffmangelsituationen stabilisiert. Unter normaler Sauerstoffversorgung wird an HIF-1 $\alpha$  an einem Prolinrest einer noch unbekannt Propyl-Hydroxylase (PH) eine OH-Gruppe angehängt, dann an das Von Hippel Lindau Protein (VHL) gebunden, der Ubiquitinierung unterzogen und durch 26s Proteasome gespalten. (Hoeben et al., 2004)

## 2.6 Anti-angiogene Faktoren

Angiogenese wird zu einem großen Teil durch die Balance zwischen verschiedenen pro-angiogenen Stimulatoren, wie VEGF, und einer mannigfaltigen Gruppe endogener Hemmer der Angiogenese reguliert, welche meist von außen auf die EC einwirken. Die frühen Jahre der Angiogenese-Forschung waren dominiert von der intensiven Suche nach eindeutigen Wachstumsfaktoren, die den Prozess der Neuausbildung von Gefäßen aus bereits bestehenden stimulieren (Kerbel und Folkmann, 2002). Die Entdeckung von FGF-2 und besonders die von VEGF-A gegen Ende der 80iger Jahre des letzten Jahrhunderts (Ferrara et al., 2004) waren bahnbrechende Ereignisse, die dieses Fachgebiet ganz bedeutend nach vorne gebracht haben. Aber schon kurz darauf wurde offensichtlich, dass die Gefäßneubildung auch von einer großen Anzahl verschiedener endogener Proteine abhängt, die als Inhibitoren wirken (Dameron et al., 1994; Lindner, 2002). Einige von ihnen scheinen sehr spezifisch auf die EC zu wirken, werden aber in den meisten Fällen nicht von diesen Zellen selbst gebildet, es handelt sich also um extrinsische Inhibitoren.

Seit in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts ein Amerikanischer Wissenschaftler die Theorie entwickelte man könnte Tumore evtl. „aushungern“, wenn man ihre Blutversorgung verhindern könnte, wurde dieses Gebiet immer intensiver erforscht. Es wurden viele körpereigene und später auch synthetische Inhibitoren identifiziert, charakterisiert und isoliert. Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung von Migration und Proliferation von EC, sowie der Aktivierung ihrer Proteasen. Die Ausformung neuer Gefäße wird so verhindert. Zusätzlich haben einige anti-angiogene Faktoren eine zusätzliche Apoptose-steigernde Wirkung.

Es gibt verschiedenste Ansatzpunkte wie die Inhibitoren wirken können. So können sie als Antikörper (AK) gegen angiogene Faktoren, oder deren Rezeptoren fungieren oder die Tyrosinkinase vermittelte Signalübertragung in der Zelle unterbinden. Außerdem können sie im Zellkern als Antisense mRNA ihre Wirkung ausüben

Der synthetisch gebildete Angiogenese-Hemmer GFA-116 unterbindet z.B. Blutgefäß- und Tumorbildung dadurch, dass er verhindert, dass VEGF an seine Rezeptoren binden kann (Sun et al., 2004).

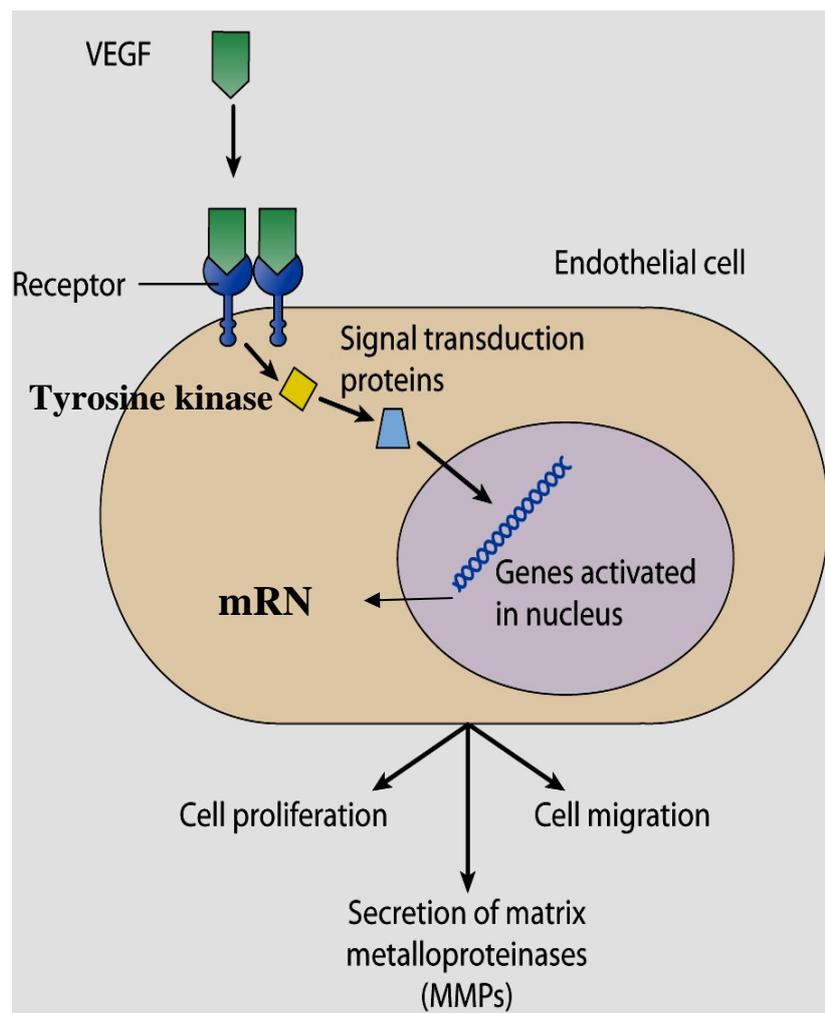


Abb.12:Die verschiedenen möglichen Angriffspunkte einer Inhibierung der Wirkung angiogener Faktoren: Mögliche Wirkung als Antikörper gegen VEGF-A selbst oder gegen seinen Rezeptor, als Hemmer der Signalübertragung und auf Gen und mRNA-Ebene. Entnommen aus Kleinsmith (2005).

Aber nicht nur für die Tumorthherapie sind die anti-angiogenen Faktoren von großem Interesse. So sind beispielsweise am Auge die Blut- und vor allem Lymphgefäße wichtige Risikofaktoren der Immunreaktion nach Hornhauttransplantation. Im Mausmodell der Keratoplastik konnten Cursiefen et al. (2004) zeigen, dass anti-hämangiogene und anti-lymphangiogene Therapien das Transplantatüberleben sowohl im Normalrisikomodell wie auch im Hochrisikomodell signifikant verbessern. Damit wurde erstmals das neue Therapiekonzept einer Modulation der Immunantwort durch anti-angiogene Therapie etabliert. Dies könnte möglicherweise auch bei anderen Formen der Organtransplantation Einsatz finden. Einige bereits bekannte und zum Teil erforschte endogene Inhibitoren der Angiogenese sind:

Vasohibin-1 und Vasohibin-2 (negative Feedbackregulatoren des VEGF)

TSP-1 und TSP-2 (wirken über CD36 und CD47 auf EC)

INF- $\alpha$  und INF- $\beta$  (regulieren die Expression von FGF-2 und VEGF herunter)

Angiostatin (Fragment des Plasminogens)

Endostatin (Fragment des Typ XVIII Kollagens)

Tumostatin (Fragment des Typ IV Kollagens)

Canstatin (Fragment des Calreticulins)

PEDF (sein Verlust führt zu Ischämie-bedingten Retinopathien)

(Kerbel, 2004)

### 2.6.1 Vasohibin-1 und Vasohibin-2

Beide bisher bekannten Vasohibine (Vasohibin-1 und Vasohibin-2) besitzen anti-angiogene Wirkung. Sie werden in einer Vielzahl von Geweben gebildet, hauptsächlich jedoch in EC. Die Besonderheit der Vasohibine unter den Angiogenese-Hemmern ist, dass sie durch VEGF aufreguliert werden und somit als negative Feedback-Regulatoren fungieren (Watanabe et al., 2004). Viele der von außen einwirkenden Inhibitoren könnten dahingehend wirken, dass sie etablierte, reife Blutgefäße in einem ruhigen Stadium halten (vgl. Abb.13); sie könnten außerdem zu pathologische massiver Angiogenese beitragen - als Ergebnis ihrer Herunterregulierung und/oder Unterdrückung, die es Stimulatoren wie VEGF oder FGF-2 daher erlauben effizienter zu agieren. Der intrinsische Hemmer Vasohibin wird zu einem späteren Zeitpunkt in der aussprossenden Gefäßbildung in den EC induziert und fungiert so als eine Art Feedback-Mechanismus, um exzessive Angiogenese zu limitieren (vgl. Abb.13). Dies erfolgt z.B. durch direktes Interagieren mit den EC in aussprossenden Gefäßen oder vielleicht auch durch direkte Interaktion mit oder durch Neutralisation von Stimulatoren, die Vasohibin in den Zellen induziert haben (Kerbel, 2004; Watanabe et al., 2004).

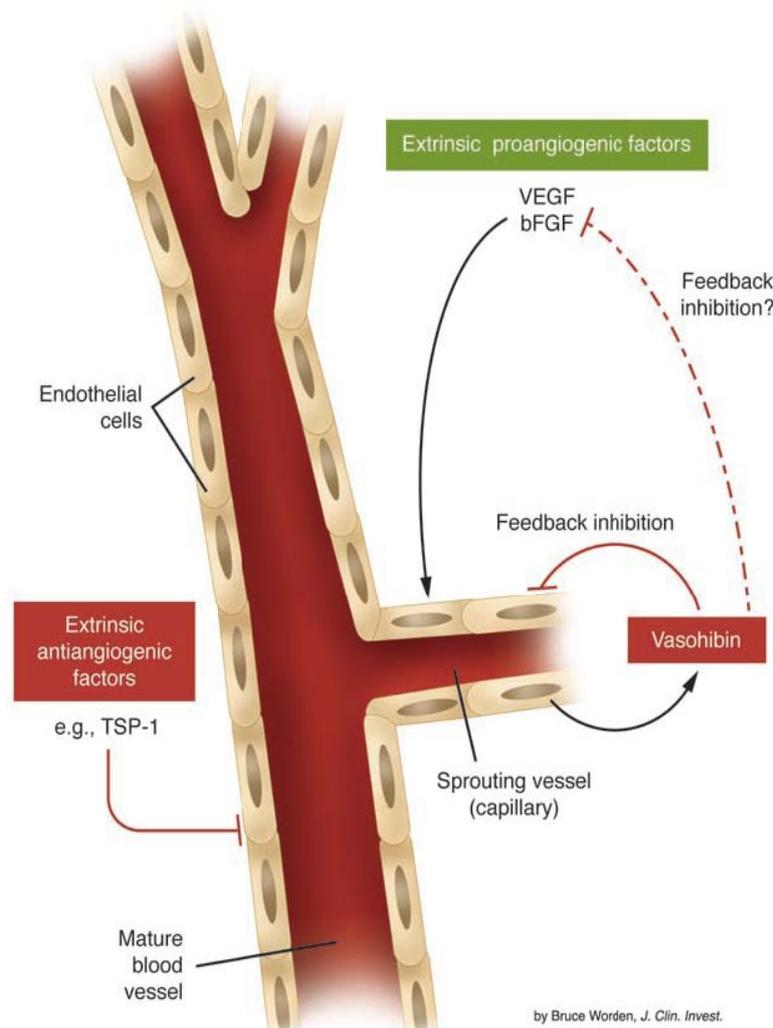


Abb.13: Kontrolle der Angiogenese durch die Aktivität extrinsischer Angiogenese-Inhibitoren (antiangiogene Faktoren) und dem einzigen bisher bekannten intrinsischen Hemmer der Endothelzellen: Vasohibin – und extrinsischen Stimulatoren der Angiogenese wie VEGF und bFGF. Entnommen aus: Kerbel, 2004

Die cDNA von Vasohibin-1 ist 365 Aminosäuren lang und wurde erstmals und unabhängig von Forschung zum Thema Angiogenese von Kikuno et al. (1999) als KIAA1036 identifiziert. Watanabe et al. (2004) nannten den Faktor dann Vasohibin. Als später dann auch Vasohibin-2 identifiziert wurde, wurde Vasohibin in Vasohibin-1 umbenannt.

Shimizu et al. (2005) haben die Existenz von zwei Vasohibin Splice-Varianten entdeckt und festgestellt, dass VEGF die Expression von Vasohibin in EC aufreguliert, indem es auf den VEGF-R2 wirkt.  $\text{TNF}\alpha$ , IL1 and  $\text{IFN}\gamma$  regulieren eine VEGF-stimulierte Vasohibin Expression wieder nach unten.

Shibuya et al. (2006) haben Vasohibin-2 aufgrund von Sequenzhomologien mit Vasohibin ebenfalls identifiziert und festgestellt, dass Vasohibin-2 in den EC embryonaler Organe in der Mitte der Trächtigkeit vorkommt. Seine Expression bleibt von der Spätträchtigkeit bis zum Neugeborenen bis zu einem gewissen Grad in den arteriellen EC erhalten.

Shen et al. (2006) haben bestätigt, dass Vasohibin-1 auch in der Retina als ein negativer Feedback-Regulator von Gefäßneubildung agiert. Vasohibin ist durch VEGF in der Retina aufreguliert und unterdrückt die VEGF-R2 Funktion und damit die Gefäßausprossung.

Das aufgereinigte (nicht glykolisierte) Protein scheint in vivo immer noch fähig zu sein, die Inhibierung der Angiogenese durchzuführen, was in einer Vielzahl unterschiedlicher Assays getestet wurde. Gleichermäßen inhibiert es verschiedene EC-Funktion in vitro, die für eine Gefäßneubildung unerlässlich sind (Kerbel, 2004). Ebenso hemmt es in vitro verschiedene EC-Funktionen, die relevant für die Gefäßneubildung sind. Antisense Oligonukleotide, die spezifisch für Vasohibin sind, verschieben die dosierte VEGF-induzierte Antwort, dass es so aussieht, als ob dadurch die negative Feedback-Antwort blockiert wird. Zum Beispiel konnte der Effekt von relativ hohen VEGF-Spiegeln, die die EC-Migration in vitro unterdrücken können (im Gegensatz zu niedrigeren Leveln, die das Wachstum stimulieren), durch eine solche antisense-Behandlung umgekehrt werden.

### 2.6.2 Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 (TSP)

Die Thrombospondine (TSP) sind eine Familie von Glykoproteinen, die an unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt sind. Sie sind so genannte multifunktionale Proteine, die ihre Wirkung an Zelloberflächen oder in der extrazellulären Matrix ausüben. Die Protein-Familie besteht aus den TSP-1 bis TSP-5 und es wird zwischen zwei Untergruppen differenziert: Die Untergruppe A besteht aus TSP-1 und TSP-2; die Untergruppe B aus TSP-3 bis TSP-5. TSP-1 und TSP-2 sind Homotrimere, das heißt, sie bestehen aus drei identischen Untereinheiten. Die TSP der Untergruppe B dagegen sind Homopentamere und sind aus fünf identischen Untereinheiten aufgebaut. TSP-1 war das erste identifizierte Molekül der Familie und wurde erstmals aus Thrombozyten isoliert, die mit Thrombin stimuliert wurden. Aus diesem Grund wurde TSP zunächst als 'Thrombin-sensitives Protein' bezeichnet. TSP-1 ist an vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt. Neben seiner starken Eigenschaft als natürlicher Inhibitor der Angiogenese spielt es auch beim programmierten Zelltod, der Apoptose, der Aktivierung des Gewebshormons TGF- $\beta$  und der Immunregulation eine Rolle. Seine anti-angiogene Wirkung entsteht aus der Verhinderung von Zellwanderung (Migration) und Zellwachstum (Proliferation), sowie der gezielten Apoptose von EC. Es modifiziert das Profil der für die Apoptose wichtigen Gene, was in einer Aufregulierung von Bax und Caspase-3 und gleichzeitiger Erniedrigung von Bcl-2 in den Zellen resultiert (Nör et al., 2000). TSP-1 hat mehrere Rezeptoren unter denen CD36 und CD47, nach heutigem Wissenstand, die bedeutendsten sind. TSP-2 hat ähnliche Wirkung. Es hemmt ebenfalls die Angiogenese und ist an Zelladhäsion, Migration und Proliferation beteiligt (Daniel et al., 2007). Seine hemmende Wirkung auf das Tumorstadium bei Mäusen ist wissenschaftlich bestätigt. Streit et al. (1999) haben gezeigt, dass TSP-2 ein

potenter körpereigener Inhibitor von Tumorwachstum und -angiogenese ist. Verschiedene Studien haben bestätigt, dass ein Mangel an TSP-2 mit verbesserter Angiogenese und Durchblutung korreliert, z.B. in Glioma (Kazuno et al., 1999), metastasierendem Dickdarmkrebs (Tokunaga et al., 1999) und bei bestimmten Lungenkrebsformen (non-small cell lung cancer) (Oshika et al., 1998). TSP-2 verhindert das Wachstum von menschlichen, mikrovaskulären EC, vermittelt durch FGF-2, IGF-1, EGF, und VEGF. Dies ist, zumindest zum Teil, auf zwei unabhängige Prozesse, nämlich die Hemmung der Zellprogression und die Induktion des Zelltodes zurückzuführen (Armstrong et al., 2002). Die Lokalisierung von TSP in den Ovarien wurde bereits an der Ratte (Petric et al., 2002) und bei der Kuh (Greenaway et al., 2005) untersucht. TSP-1 und sein Oberflächen-Zell-Rezeptor CD36 waren in der größten Anzahl in GC von kleinen, sich entwickelnden, Follikeln der Kuh zu finden (Greenaway et al., 2005). Die mRNA-Konzentration von TSP in GC-Lysaten und in der Follikelflüssigkeit nahm jedoch ab, wenn die Follikel sich entwickelten. Dies passiert in sehr ähnlicher Weise auch bei CTGF (der Connective Tissue Growth Factor ist ein Cysteinereiches sekretorisches Protein). Es handelt sich dabei um einen parakrinen Regulator, der mit der Zellproliferation und dem Umbau der extrazellulären Matrix in Verbindung gebracht wurde und ist generell pro-angiogen, auch wenn in manchen Systemen gezeigt wurde, dass es die VEGF-induzierte Angiogenese hemmt. Die Expression der mRNA von CTGF wurde bisher in der TI und GC in Ovarien von Schweinen (Wandji et al., 2000) und Hasen nachgewiesen (Harlow und Hillier, 2002). Die Art seiner Synthese lässt darauf schließen, dass TSP dabei beteiligt ist, die Blutgefäßbildung während früher Stadien der Entwicklung zu unterdrücken und dabei hilft, das Follikelwachstum einzuschränken, bis schließlich eine synchronisierte Abfolge von Ereignissen stattfindet, die die Bildung von VEGF und seiner Rezeptoren mit einbezieht. Nach Greenaway et al. (2005) wird im bovinen Follikel die TSP-Produktion in GC durch FSH stimuliert, wohingegen LH keinen Einfluss hat.

### 2.6.3 Oberflächenantigene CD36 und CD47

Die CD-Antigene (CD= cluster of differentiation) bilden die große Gruppe der so genannten Oberflächenantigene. Ihre Ausbildung ist jedoch nicht auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Sie werden auf praktisch allen bekannten Zelltypen exprimiert.

Unter vielen Umständen sind diese CD-Antigene nur in bestimmten Stadien der Entwicklung und unter bestimmten Bedingungen exprimiert, wie z.B. nach Zellaktivierung oder in bestimmten pathologischen Situationen. Die biologische Funktion vieler identifizierter Proteine dieser Gruppe ist immer noch nicht bekannt.

Man geht davon aus, dass die Expression von vielen Mitgliedern dieser Familie durch Zytokine beeinflusst wird. In manchen Fällen wurde gezeigt, dass die Bindung eines Liganden an das entsprechende CD-Antigen die Expression von Zytokinen moduliert hat.

Außerdem wurde herausgefunden, dass einige der bekannten CD-Antigene mit Rezeptoren für Zytokine identisch sind. CD25 entspricht beispielsweise dem TAC-Antigen. Andere scheinen Cytokin-Rezeptor-ähnliche Funktionen auszuführen (z.B. CD27, CD30, CD40), oder sie sind in die Modulation der biologischen Aktivität von Zytokinen mit einbezogen (CD4, CD28, CD40). Weiterhin wurde gezeigt, dass einige CD-Antigene auch in löslicher Form auftreten können (z.B. CD14, CD27, CD137) (Barcley et al., 1993; Horejsi und Bazil, 1989; Zaleski, 1991)

**CD36** ist ein Glykoprotein mit 88kDa, das neben der Zelloberfläche von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Erythrozyten und anderen auch auf der von EC ausgebildet wird. Dieses Antigen wurde in einigen Epithelien einer Vielzahl von Organen gefunden. Dazu gehören der Dünndarm, die laktierende Milchdrüse, Niere, Lunge, Talgdrüsen und die Papillae circumvallate der Zunge (Zhang et al, 2003).

**CD47** wird auch Integrin-Associated Protein (IAP) genannt. Er wird auf hematopoetischen und nicht-hematopoetischen Zellen von Eukaryoten ausgebildet.

Beide binden Thrombospondine und dienen ihnen als Rezeptoren.

## 2.7 Lymphangiogenese

Im Gegensatz zu der seit Jahrzehnten erforschten Angiogenese und ihren beteiligten Faktoren wird der Lymphangiogenese erst seit einigen Jahren vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind weit weniger lymphangiogene als hämangiogene Faktoren bekannt. Ein lange währendes Problem war, dass keine geeigneten Marker bekannt waren, die spezifisch Lymphgefäße bzw. ihre EC (LEC) detektieren und nicht auch in Blutgefäßen und deren EC vorkommen (Podgrabinska et al., 2002). Aus diesem Grund kam die Forschung lange Zeit nicht so schnell voran, wie man es sich gewünscht hätte, gerade weil den Lymphgefäßen und ihrer Entwicklung eine sehr bedeutende Rolle bei pathologischen Prozessen zugeschrieben wird (Wigle et al., 2002). So erscheint beispielsweise die genauere Untersuchung bedeutender Stimulatoren in Hinsicht auf die Krebsforschung besonders wichtig, da Lymphangiogenese, also die Entstehung neuer Lymphgefäße, als wichtiger Risikofaktor für die Tumormetastasierung identifiziert wurde (Shin et al., 2008).

Das lymphatische System ist ein vaskuläres Netzwerk dünnwandiger Kapillaren und größerer Gefäße, umgeben von einer kontinuierlichen Schicht endothelialer Zellen. Es dient der Drainage von Gewebsflüssigkeit aus dem extrazellulären Raum der meisten Organe, welche dort aufgenommen und über Sammelgefäße dem venösen System und damit dem großen Kreislauf wieder zugeführt wird. In Epithelien, Knorpel, Knochen und Knochenmark,

Zahnhartsubstanzen, Nervengewebe und Plazenta sind physiologisch keine Lymphgefäße vorhanden (Hees und Sinowatz, 1992).

Bei der Lymphangiogenese wird begrifflich nicht zwischen der Bildung von Lymphgefäßen während der Embryonalentwicklung und der im adulten Organismus unterschieden. Für die primäre Entstehung der Lymphgefäße gab es lange Zeit zwei Theorien. Einerseits dachte man Lymphgefäße könnten sich, so wie die Blutgefäße, selbstständig aus dem Mesenchym bilden, andererseits vermutete man, dass sie auch aus bereits angelegten Venen aussprossen. Die bekannte Lymphgefäß-Forscherin Florence Sabin hat Anfang des letzten Jahrhunderts zahlreiche Forschungen zur Entwicklung des Lymphsystems durchgeführt und als erste postuliert, dass die Lymphkapillaren kurz nach dem Auftreten der Kardinalvenen im Embryo zu finden sind. Sie bilden dann zunächst sechs Lymphsäcke aus, aus denen später die Lymphgefäße aussprossen (Sabin, 1902 und 1909). Mittlerweile lassen zahlreiche Forschungen annehmen, dass letztere Vermutung den Vorgängen während der Embryonalentwicklung entspricht (Karkkainen et al., 2002; Karpanen und Mäkinen, 2005). Auch Tammela et al. (2005b) postulierten, dass lymphatische Gefäße erst dann beginnen sich zu entwickeln, wenn die embryonale Blut-Zirkulation bereits etabliert ist. In Abb.15 wird dies gezeigt – und, dass das erste, bisher bekannte Ereignis, bei der Lymphgefäßentwicklung die Expression des homeobox transcription factors Prox-1 in einem Teil der EC in bestimmten embryonalen Venen ist (Wigle und Oliver, 1999). Das genaue Signal hierfür ist noch nicht bekannt, aber Gröger et al. (2004) haben herausgefunden, dass IL-3 Prox-1 und auch Podoplanin reguliert. Prox-1 positive Zellen regulieren dann viele spezifische Marker für LEC (unter anderem Podoplanin, LYVE-1, VEGF-R3) auf, stimulieren ihre Proliferation und die Gefäße differenzieren sich (Tammela et al., 2005b; Karpanen und Mäkinen, 2006).

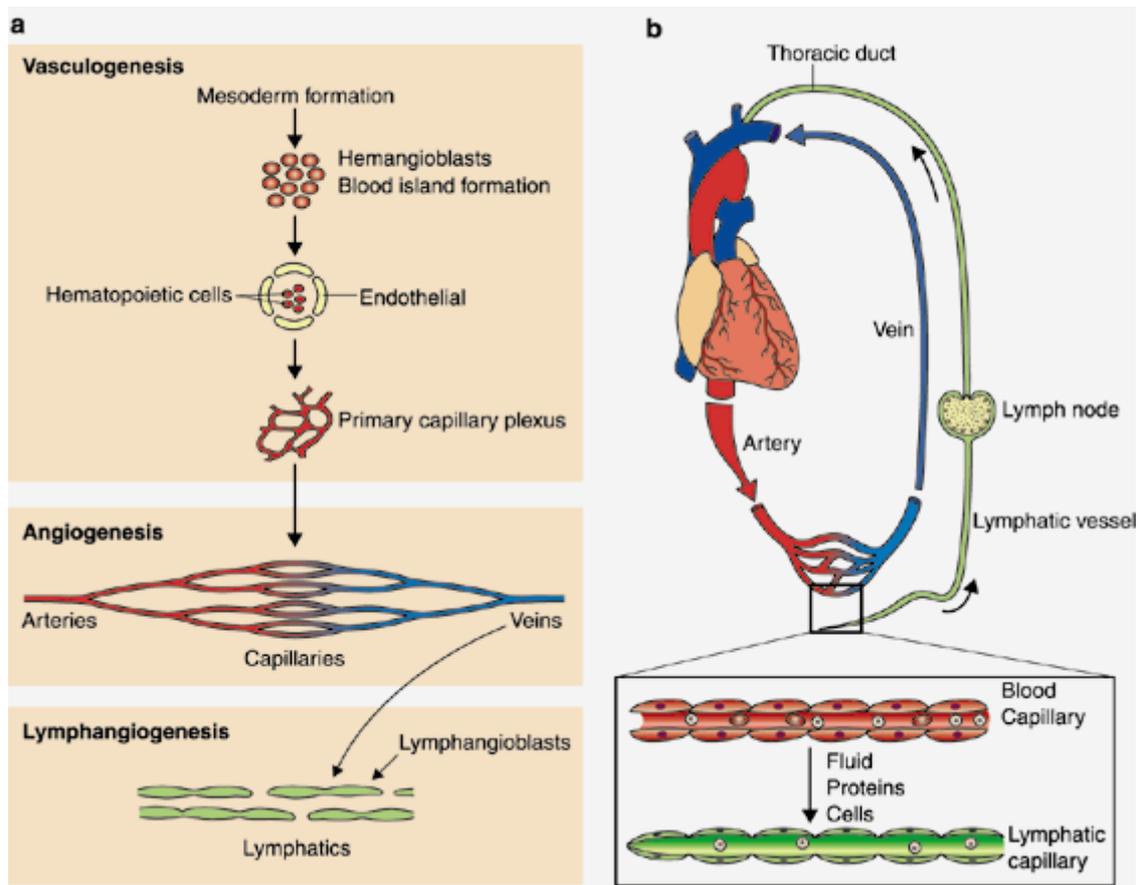


Abb.14:Entwicklungsmäßiger Ursprung des lymphatischen Systems und wie es die Homöostase der Gewebsflüssigkeit reguliert **a**: Man geht davon aus, dass die lymphatischen Gefäße sich entwickeln, indem sie aus embryonalen Venen sprossen, nachdem das Blutgefäßsystem sich etabliert hat. **b**: Die Lymphgefäße sammeln Flüssigkeit aus dem interzellulären Raum und transportieren sie nach der Filterung durch die Lymphknoten in große Sammelgefäße und über den Ductus thoracicus in die Vena subclavia. (Karkkainen et al., 2002)

Die obige Abbildung zeigt noch einmal den begrifflichen Unterschied bei der Blutgefäßbildung. Vaskulogenese, wie sie beim Embryo stattfindet, beschreibt die Entstehung von Blutgefäßen aus Hemangioblasten; einen entsprechenden Vorgang - speziell für die Lymphgefäße - gibt es nach Stand des heutigen Wissens nicht. Wie die Angiogenese stellt die Lymphangiogenese immer einen Aussprossungsprozess dar. Bei der Lymphangiogenese – egal ob im Embryo oder im adulten Organismus – beschreibt sie immer die Differenzierung von LEC aus venösen EC, oder die Aussprossung von LEC, aus bereits bestehenden Gefäßen (Karkkainen et al., 2002; Karpanen und Mäkinen, 2005; Tammela et al., 2005b).

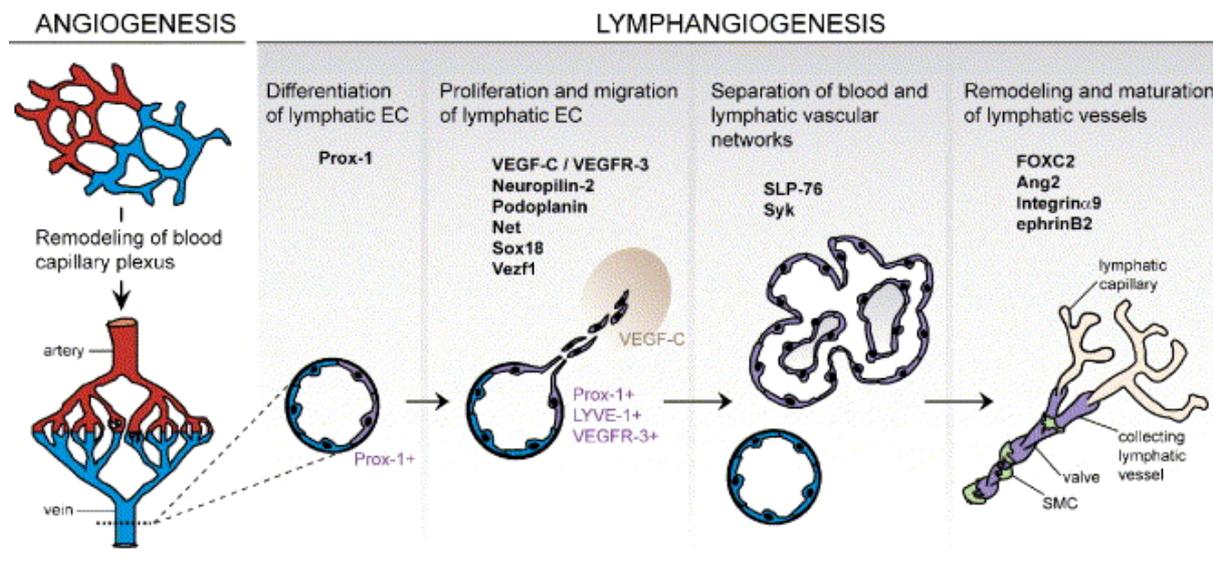


Abb.15: Entwicklung der Lymphgefäße während der Embryogenese. Nach dem Umbau der Blutgefäße differenzieren sich lymphatische Endothelzellen (EC) und sprossen aus den Hauptvenen aus, um neue Lymphkapillar-Plexus auszuformen. Die weitere Reifung schließt sowohl die Ausbildung von lymphatischen Sammelgefäßen im Gegensatz zu eigenständigen Lymphkapillaren und den Erwerb von umgebenden glatten Muskelzellen ein, als auch die Bildung von luminalen Klappen in den Sammelgefäßen (Karpanen und Mäkinen, 2005)

## 2.8 Lymphangiogene Faktoren

Das lymphatische System reguliert die Flüssigkeits-Homöostase, die Immunabwehr – und ermöglicht in vielen Fällen die Tumormetastasierung. Es sind bisher nur einige Gene bekannt, die einen Effekt auf die Entwicklung von Lymphgefäßen haben – und noch weniger, welche als Therapeutika eingesetzt werden können, z.B. bei lymphatischen Krankheiten oder mit dem Ziel, das Wachstum von Tumorlymphgefäßen zu hemmen und somit die Ausbreitung von Metastasen zu reduzieren. Aus diesem Grund besteht eine große Dringlichkeit diese Mechanismen weiter zu erforschen.

Im Folgenden wird ein kurzer Einblick in das heutige Wissen um die Lymphangiogenese und die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren geben:

Wigle und Oliver (1999) haben die ursprüngliche Aussage von Sabin (1902) bestätigt, dass der primäre Lymphsack während der Entwicklung venösen Ursprungs ist. Ihre Ergebnisse zeigten auch, dass die Expression von Prox-1 in einer limitierten Subpopulation von EC in embryonalen Venen benötigt ist, um Lymphangiogenese zu initiieren und dass die erste Lokalisierung und nachfolgende Migration der LEC von der Hauptvene ausgingen. Die EC schienen dabei entlang eines vordefinierten Weges zu strömen.

Mäuse, bei denen der Transkriptionsfaktor Prox-1 ausgeschaltet war, zeigten eine verringerte Knospung und Aussprossung der primären Lymphsäcke und starben während der Embryonalentwicklung am Tag 14,5 mit schwerwiegenden Ödemen.

Genetische Mausmodelle mit einem Knockout von VEGF-C entwickelten ebenfalls schwerwiegende intestinale Ödeme aufgrund einer fehlenden lymphatischen Knospung und Migration (Karkkainen et al., 2004). Die eventuelle Separation der Lymphgefäße vom venösen Kreislauf ist größtenteils durch die Tyrosinkinase SYK und sein adaptiertes Protein SLP76 vermittelt. Mäuse mit homozygoter Löschung der Gene, die diese Proteine kodieren, entwickelten arteriovenöse Shunts und abnormale Lymphgefäß-Venen-Verbindungen (Abtahian et al., 2003). Schließlich wurden noch weitere Gene mit in die Forschungen einbezogen, bei denen ein Einfluss in späteren Stadien der Lymphgefäßbildung und ihrer postnatalen Ausreifung vermutet und bestätigt wurde. Diese beinhalten z.B. Podoplanin (Schacht et al., 2003), Nrp.-2 (Yuan et al., 2002), FoxC2 (Petrova et al., 2004) und Angiopoietin-2 (Shimoda et al., 2007). VEGF-C und VEGF-D, sowie ihr Rezeptor VEGF-R3 sind etablierte lymphangiogene Faktoren, genau wie die Mitglieder der PDGF-Familie.

### 2.8.1 VEGF-Familie: VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3

VEGF-C weist Homologien zu den anderen Mitgliedern der VEGF- und PDGF-Familien auf, sein C-terminaler Teil enthält jedoch zusätzliche Kopien eines Cystein-reichen Sequenzmotives. VEGF-C ist ein 23 kDa schweres Protein, das durch proteolytische Spaltung aus einem größeren Vorläufer entsteht. Es ist sehr stark im Herzen, im Muskel, den Ovarien und im Dünndarm des Menschen exprimiert. Weniger Expression findet in Gehirn, Leber oder Thymus statt. Periphere Blutleukozyten scheinen kein VEGF-C zu exprimieren. Bewiesen ist jedoch, dass VEGF-C die Migration boviner kapillärer EC in Kollagen-Gelen stimuliert (Goto et al., 1993).

Im Gegensatz zu VEGF-B haben PDGF, EGF, TGF $\beta$  und der Tumorpromoter phorbol 12-myristate 13-acetate sehr wohl einen stimulierenden Einfluss auf VEGF-C mRNA (Ristimaki et al., 1998; Enholm et al., 1997).

Humanes VEGF-D ist strukturell verwandt mit VEGF-C und wurde durch Suchen in Nukleotidsequenz-Datenbanken identifiziert (Achen et al., 1998). Beide weisen nämlich N- und C-terminale Verlängerungen auf, die bei den anderen VEGF Mitgliedern nicht gefunden werden können. Das VEGF-D Gen ist zwischen Mensch und Maus stark konserviert. Bei beiden Spezies wird VEGF-D sehr stark in der Lunge exprimiert. Am höchsten ist die Expression dort jedoch vor der Geburt aufreguliert (Farnebo et al., 1999). Achen et al. (1998) haben gezeigt, dass VEGF-D ein aktivierender Ligand für VEGF-R2 und VEGF-R3 ist, aber nicht an den VEGFR-1 bindet. Diese Autoren bewiesen weiterhin, dass VEGF-D ein Mitogen

für EC ist. Stacker et al. (2001) haben dann gezeigt, dass VEGF-D Tumorangiogenese durch den VEGF-R2 und tumoröse Lymphangiogenese durch den VEGF-R3 ausgelöst werden kann. Außerdem fand er heraus, dass VEGF-D die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen über die Lymphgefäße begünstigt. Jüttner et al. (2006) haben VEGF-D bei 67,0 % aller Magenkrebspatienten gefunden und nur zu 12,5 % in der Mucosa gesunder Mägen. Wurde die Expression von VEGF-R3 gleichzeitig mit VEGF-D festgestellt, diente dies auch als ein unabhängiger prognostischer Parameter, welcher es erlaubt Patienten mit einer schlechten Prognose zu bestimmen.

Auch in einer Vielzahl anderer Studien wird davon ausgegangen, dass VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3, die Lymphangiogenese bösartiger Tumoren und ihre Metastasierung über das Lymphsystem erleichtern (Mäkinen et al., 2001; Mandriota et al., 2001; Skobe et al., 2001; Stacker et al., 2001).

### 2.8.2 Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktoren (PDGF-Familie)

1974 entdeckten Ross und Mitarbeiter, dass ein Faktor, der von Blutplättchen (eng. platelets) freigesetzt wird, das Wachstum von glatten Muskelzellen von Affen sehr effektiv anregt. Dieser Faktor wurde entsprechend seinem Vorkommen *platelet derived growth factor* genannt und hat seither viel zum Verständnis der Signaltransduktion beigetragen. PDGF werden hauptsächlich von Megakaryozyten synthetisiert. Sie werden in den  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen gelagert, von wo aus sie nach deren Zellaktivierung, z.B. durch Thrombin, auch freigesetzt werden. Die Synthese kann durch IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und EGF induziert werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Zytokinen wird PDGF nicht in den Blutkreislauf abgegeben. Seine biologische Halbwertszeit liegt bei intravenöser Verabreichung bei weniger als zwei Minuten (<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=PDGF>).

Es besteht aus zwei ähnlichen Ketten PDGF-A (16 kDa, 124 AS) und PDGF-B (14 kDa, 140 AS), die intramolekulare Disulfidbrücken enthalten. Die Untereinheiten sind ebenfalls durch Disulfidbrücken verbunden. Die Wachstumsfaktoren treten also immer in Dimeren auf (Homo- oder Heterodimere), die miteinander verbunden sind und so jeweils zwei Rezeptoren binden. Dadurch bringen sie die Rezeptoren nahe genug zusammen, dass sich diese gegenseitig an Tyrosinen phosphorylieren können. So aktiviert phosphorylieren sie dann andere Proteine im Zellinneren an spezifischen Tyrosinen und leiten das Signal weiter. Alle Isoformen, die aus der Kombination der Untereinheiten möglich sind, also PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB, sind biologisch aktiv, unterscheiden sich aber in ihrer Reaktivität und binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren. Die klassischen PDGF Polypeptidketten PDGF-A und PDGF-B sind bereits seit längerem bekannt und gut untersucht. Sie regulieren eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse, unter

ihnen auch die Angiogenese (Huynh-Do, 2006; Shibuya et al., 2006), in vielen verschiedenen mesenchymalen Zellen über die zwei Rezeptoren PDGF-R $\alpha$  und PDGF-R $\beta$ . (Li und Eriksson, 2003). Beide Gene, die von PDGF-A und PDGF-B, haben eine ungefähre Länge von 24 kb und enthalten mindestens sieben Exons. Aufgrund von unterschiedlichem mRNA-Splicing entstehen PDGF-A Varianten (Khachigian und Chesterman, 1992). Sie sind evolutionär von den Säugetieren bis zu den Amphibien konserviert, zeigen beide eine ähnliche Exon-Intron-Struktur und enthalten lange (< 1 kb) 5' und 3' Regionen, die nicht mit translatiert werden. Die Aktivität der beiden Gene ist in einigen Zelltypen unabhängig voneinander reguliert und in einigen koordiniert. Erst später wurden zwei zusätzliche PDGF-Polypeptid-Ketten entdeckt, nämlich PDGF-C (Li et al., 2000) und PDGF-D (Bergsten et al., 2001). Die monomeren und dimeren Formen der Rezeptoren haben unterschiedliche Affinitäten zu den unterschiedlichen Formen von PDGF. PDGF-R $\alpha$  bindet PDGF-A und PDGF-B, während PDGF-R $\beta$  nur PDGF-B bindet (Heldin et al., 1992):

- PDGF-BB bindet an die dimeren Rezeptoren  $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\alpha$ - $\beta$  und  $\beta$ - $\beta$
- PDGF-AA bindet nur an den  $\alpha$ - $\alpha$  Rezeptor und
- PDGF-AB bindet an die Rezeptortypen  $\alpha$ - $\alpha$  und  $\alpha$ - $\beta$ .

Rezeptoren für PDGFs werden in verschiedenen Zellen gefunden, unter anderem werden Fibroblasten durch den PDGF zur Zellteilung angeregt, wobei jedoch PDGF alleine nicht ausreichend ist, um die Zellteilung auch erfolgreich abzuschließen. Interessant ist hier sicher, dass PDGF zwar stark stimulierend auf die Zellproliferation wirkt, aber in Abwesenheit von weiteren Faktoren die Zelle in die Apoptose übergeht, anstatt zu proliferieren. (Kim et al., 1995). PDGF bindet an verschiedene Plasmaproteine und an solche der extrazellulären Matrix, was die lokale Konzentration des Faktors erleichtert. Er fungiert als lokaler autokriner und parakriner Wachstumsfaktor. Im adulten Organismus ist PDGF in die Prozesse der Wundheilung involviert. Die Induktion vieler Formen von PDGF durch TNF $\beta$  ist für die hemmende Aktivität auf die Zellproliferation verantwortlich. In den letzten Jahren wurde auch ihr Einfluss auf die Lymphangiogenese bestätigt. Es wurde postuliert, dass die PDGFs direkt die Lymphangiogenese fördern (Ji, 2006; Karpanen und Mäkinen, 2005). Ihre Rezeptoren sind in neu gebildeten Gefäßen und in aktivierten EC hochreguliert (Karpanen und Mäkinen, 2005).

In einer Konzentration von 1-2 fg/Zelle ist TGF $\beta$  ein Wachstumshemmer für glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten, wohingegen höhere Konzentrationen die Proliferation fördern (<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=PDGF>). Diese auf zwei Arten mögliche Wirkungsweise wird hauptsächlich durch PDGF-AA vermittelt. TGF $\beta$  kann außerdem auf den PDGF Rezeptor wirken und so die Aktivität der PDGF modulieren. Im Gegensatz zu PDGF-AB und PDGF-BB ist PDGF-AA ein eher schwaches Mitogen für

vaskuläre glatte Muskelzellen. Jedoch wirkt es zusammen mit FGF-2, welches den PDGF-R $\alpha$  aufreguliert, synergistisch auf die DNA-Synthese dieser Zellen. Es wurde gezeigt, dass PDGF-BB ein starker Mediator für das verbindende Gewebe bei der Stroma-Formation in xeno-transplantierten Melanomzellen ist. Diese waren genetisch so manipuliert, dass sie PDGF-BB sekretierten, welches dann die schnellere und erleichterte Ausbildung eines funktionalen Gefäßsystems in den Tumor unterstützte (Beckmann et al., 1988). Die funktionale Konsequenz der Heterogenität der PDGFs ist trotz vieler Untersuchungen zum größten Teil noch unverstanden. Die dimere Form von PDGF ist hauptsächlich mitogen für Zellen mesenchymalen Ursprungs, während die monomeren Formen von PDGF hauptsächlich chemotaktisch wirken. Abhängig vom Zelltyp könnten die verschiedenen Isoformen eine stimulierende oder inhibierende chemotaktische Reaktion auslösen. Außerdem werden die mitogene Wirkung von PDGF-AA und PDGF-BB durch Bindung an das PDGF-assoziierte Protein (PAP) moduliert.

### 2.8.3 Podoplanin

Humanes Podoplanin ist ein 38 kDa schweres transmembranes (Mucin-ähnliches) Glykoprotein mit 162 AS, von denen neun die intrazelluläre Domäne bilden. Der extrazelluläre Teil ist stark Sauerstoff-glykolysiert (Wicki und Christoferi, 2007). Da Podoplanin in Lymph- jedoch nicht in Blutgefäßen exprimiert wird, wird es weitläufig als spezifischer Marker für LEC und Lymphangiogenese in vielen Spezies eingesetzt (Breiteneder-Geleff et al., 1999). In normalem menschlichem Gewebe ist Podoplanin außerdem in den meisten Gewebeformen zu finden. So ist es z.B. in den Podozyten der Niere (Breiteneder-Geleff et al., 1999), im Skelettmuskel, der Plazenta, in Lunge und Herz (Martin-Villar et al., 2005), in den Myofibroblasten der Brust, in den Speicheldrüsen, in Osteoblasten und Mesothelialzellen (Ordonez, 2006) exprimiert. Die physiologische Funktion des Podoplanin ist immer noch nicht geklärt. Allerdings sterben Podoplanin-defiziente Mäuse bei der Geburt aufgrund von respiratorischer Schwäche, während sie einen auffälligen Phenotyp mit erweiterten, fehlfunktionierenden Lymphgefäßen und Lymphödeme zeigen (Ramirez et al., 2003; Schacht et al., 2003). Außerdem kann Podoplanin in vitro eine Plättchenaggregation auslösen (Kaneko et al., 2006). In den pathologischen Situationen, die bisher untersucht wurden, ist das Mausomolog von Podoplanin (PA2.26, OTS-8) nach Verletzungen und Behandlung mit kanzerogenem Phorbol 12-myristate 13-acetate während der Geweberegeneration in der Haut freigesetzt (Gandarillas et al., 1997). OTS-8 wird ebenfalls durch 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in den Osteoblasten von Mäusen aktiviert und ganz erheblich in onkogenen RAS-transformierten Zellen exprimiert (Nose et al., 1990). Diese Entdeckungen lassen eine Rolle von Podoplanin bei der Gewebeentwicklung

und –heilung, aber auch bei der Kanzerogenese vermuten. Podoplanin ist nämlich zudem in den äußeren Schichten von soliden Tumoren hochreguliert (Wicki und Christoferi, 2007) so z.B. in squamous cell carcinoma der Mundhöhle, des Larynx, der Lunge, der Zervix, des Ösophagus und der Haut. Weiterhin in Dysgerminomen des Ovars (maligne primitive Keimzelltumore) und in Granulosazelltumoren, in Mesotheliomen und in vielen Tumoren die das Zentrale Nervensystem befallen (Kato et al., 2005; Kimura und Kimura, 2005; Martin-Villar et al., 2005; Schacht et al., 2005; Shibahara et al., 2006; Wicki et al., 2006). Das oncofetal-M2A-Antigen, das in Hoden mit Spermienzelltumoren exprimiert wird, ist laut Dumoff et al. (2005) identisch mit Podoplanin. Zudem ist bis heute bekannt, dass die Podoplanin-Expression durch EGF, FGF-2 und TGF in MCF7 Brustkrebs-Zellen (Zellkulturlinie) und durch Bradykinin in 3T3 Fibroblasten herbeigeführt werden kann (Scholl et al., 1999; Wicki et al., 2006). Demnach wird die Podoplanin-Expression vielleicht von der Umgebung von Tumoren moduliert. Trotzdem bleiben die genauen Mechanismen der Podoplanin-Regulation bisher schwer zu fassen. Nguyen et al. (2007) haben bereits mit Podoplanin und Prox-1 gearbeitet und sie als Marker für Lymphgefäße verwendet. Die Forschergruppe arbeitete mit lymphatischen, venösen und arteriellen EC, die sie aus bovinen mesenterialen Gefäßen isoliert und dann kultiviert haben. Die erzielten Ergebnisse waren eindeutig und zeigten somit unter anderem, dass die Marker auch bei Gefäßen des Rindes spezifisch für LEC sind.

### 2.8.1 Homeobox-containing Transcription Factor Prox1 (Prox-1)

Wigle und Oliver (1999) haben Untersuchungen zur Lymphgefäßentwicklung gemacht und bestätigt, dass der primäre Lymphsack während der Entwicklung venösen Ursprungs ist. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Expression von Prox-1 benötigt war um Lymphangiogenese aus der Hauptvene zu initialisieren. Mäuse, bei denen der Transkriptionsfaktor Prox-1 ausgeschaltet war, zeigten eine verringerte Knospung und Aussprossung der primären Lymphsäcke und starben während der Embryonalentwicklung am Tag 10,5 mit schwerwiegenden Ödemen. Die gleiche Forschergruppe um Wigle und Oliver (2002) untersuchte später wieder Prox-1(-/-) Embryos und fand Embryos ohne lymphatisches System. Anders als die EC, die in den Wildtyp-Embryos am Tag 11,5 aussprossen, exprimierten die der Prox-1-Nullmäuse keine lymphangiogenen Marker, wie VEGF-R3, LYVE-1 und SLC, einem Chemokin, das in adulten LEC exprimiert wird (Gunn et al., 1998). Im Gegenteil, die mutierten Zellen schienen einen Blutzellen-ähnlichen Phenotyp zu haben, wie er durch die Expression von Laminin und CD34 festgelegt ist. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Prox-1 Aktivität für beides unerlässlich ist, für die Aufrechterhaltung der Aussprossung der venösen EC und für die Ausdifferenzierung in den lymphatischen

Phänotyp (Wigle und Oliver, 1999; Tammela et al., 2005b). Der Blutgefäß-Phänotyp entsteht durch die nicht erfolgte Aussprossung der embryonalen venösen EC, die auf die Expression von Prox-1 hin, normalerweise dann aussprossen und den Phänotyp eines Lymphgefäßes annehmen würden. Außerdem haben Wilting et al. (2002) Prox-1 untersucht. Die suchten damals auch einen Marker für LEC. Sie fanden aber heraus, dass der Prox-1 in LEC von Maus- und Vogelembryonen exprimiert wird und so untersuchte Wilting et al. (2002) mit Hilfe von Immunfluoreszenz humanes Gewebe auf sein Prox-1-Expression (und zwar in Gefrierschnitten von human Feten, in gesunder Haut u in solcher von Patienten mit Lymphödemen und in Lymph-/Hämangiomen von Kindern). In menschlichen Feten waren Prox-1 und VEGF-R3, in den LEC der großen lymphatischen Sammelgefäße, aber auch in Lymphkapillaren, beide exprimiert. Prox-1 war dabei im Kern lokalisiert und seine Expression, sowie die des Blutgefäßmarkers PAL-E schlossen sich gegenseitig aus. Es wurde berichtet, dass es sich bei Prox-1 um einen wesentlichen Marker für LEC handelt und sowohl in gesundem adulten Gewebe, als auch in dem von Patienten mit Lymphödemen nachgewiesen werden kann. BEC von Hämangiomen exprimierten in dieser Studie CD31 und CD34, aber kein Prox-1. Ein Teil dieser Zellen war auch für VEGF-R3 positiv. Lymphgefäße in der Peripherie von Hämangiomen exprimierten Prox-1 und CD31, aber kein CD34. In Lymphangiomen exprimierten die LEC Prox-1, CD31 und VEGF-R3, aber so gut wie kein CD34. Prox-1 ist also ein guter Marker für LEC, der oft zusammen mit VEGF-R3 und CD31 exprimiert wird, die jedoch selbst weniger als Marker geeignet sind, da sich ihr normales Vorhandensein in pathologischem Gewebe ändert.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Labortechnik und Geräte

Bioanalyser 2100	Agilent Technologies (Waldbronn)
Block-PCR/Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf (Hamburg)
cDNA-Platten, 96well	twin.tec PCR Plate 96, skired; 96x150µl. Eppendorf (HH)
Cryotom	HM 505 E, Microm international
Einwegküvetten	Uvette, Eppendorf (Hamburg)
Elektrophorese-System	Standart Power Pack P25, Biometra (Göttingen)
Elektrophorese-Kammern	Agagel Mini, Biometra (Göttingen)
	Agagel Midi, Biometra (Göttingen)
	Agagel Wide, Biometra (Göttingen)
	GNA 100 LKB Pharmacia (Freiburg)
	GPS 200/400, LKB Pharmacia (Freiburg)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Homogenisator	FastPrep FP 120 Bio101 Systems, MP Biomedicals(Heidelberg)
Homogenisator-Tubes mit Deckel	FastPrep Tubes, Lysing Matrix D, Bio 101 Systems MP Biomedicals (Heidelberg)
Kanülen	0,60x30 mm, Sterican, Luer-Lock (Belgium)
Mikroskope	Axioscope 2plus, Zeiss, WILD Typ 3551/0 (Heerbrugg, Schweiz) Lichtquelle/Tranformator: Ultralux 150H, Volpi 61/76 (Schweiz)
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc, Zeiss
Mikrowellengerät	Panasonic NN 6275B (UK)
NanoDrop	NanoDrop Spectrophotometer, ND-1000, peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Objektträger	Objektträger gebrauchsfertig, 76x26 mm, Carl Roth, (Karlsruhe)
pH-Meter	pH-Meter MultiCal pH526, WTW (Weilheim, Germany)
Photometer	Biophotometer Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Standardtips Eppendorf (Hamburg) Sarstedt (Hamburg)
Pipettierroboter	corbett ROBOTICS, CAS1200, A020706, Australia

Reaktionsgefäße	0.2 ml micro-tube, Abgene (Epson, UK) 0.5 ml Biozym 710912 (31833 Oldendorf) 1.5 ml, 2.0ml Eppendorf (Hamburg)
RNA nano Chips	Agilent Technologies (Waldborn)
Roboterspitzen	50 µl Tecan Black Conductive Robotic Barrier Tips, Art. 112.3050, CIF Labortechnik GmbH&Co KG (Wasserburg)
RotorGene 3000	Corbett Research (Australia)
Schüttelgeräte	Vortex-Genie 2 Bender&Hobein (München) Rocking platform shaker Duomax 1030, Heidolph Instruments (Schwabach, Germany)
Skalpelle	BAYHA Sterile Surgical Blades (Tuttlingen, Germany)
Strip tubes	PCR 8-Strip Tubes, Eppendorf (Hamburg, Germany)
Spritzen	2 ml, C84005-1, Braun (Melsungen)
Sterilisator	
Video-Dokumentations-System	Image Master JVDS Pharmacia 80-6247-01 (Freiburg)
Waagen	Sartorius Universal, 04100 OD2.2 (Göttingen) Sartorius MC 210 P (Göttingen) Sartorius BP 1200 (Göttingen) Sartorius 2001 MP2 (Göttigen) Chyo MJ-3000, Heraeus Instruments (Kyoto, Japan)
Wärmeblock	Thermomixer Compact, Ebbendorf (Hamburg)
Zentrifugen	Biofuge 13, 75003635/01, Heraeus Instrumentents (Osterode) Biofuge fresco, 75005510, Heraeus Instruments, (Osterode) Biofuge pico, 750032280, Heraeus Instruments, (Osterode) Zentrifuge 5415 D, Eppendorf (Hamburg) Zentrifuge 5415 R, Eppendorf (Hamburg) Zentrifuge 5804, Eppendorf (Hamburg) Sigma 3K30 (Osterode)

### 3.2 Biochemika

Agarose	Amresco 710-50G (Ohio, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	Fraktion V, pH 5,2; Standard Grade, Serva, 11930 (Heidelberg)
DAB	3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochloridedihydrate, Fluka
DEPC	Aldrich 15.922-0 (Darmstadt)
dest. Wasser	Aqua bidest aus hauseigener Anlage
dNTP	
Einbettungsmedium	Tissue-Tek O.C.T. Compound 4583, Sakura Finetek
Ethanol (rein)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	3,8-Damino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-Bromid (10mg/ml), Carl Roth GmbH & Co. KG, (Karlsruhe)
Eukitt	Eukitt quick-hardening mounting solution, Fluka
HCL	HCl 5 mol/L (Merck)
Hematoxylin	Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Roth
Hexamere	Pharmacia 27-2166-01 (Freiburg)
Hydrogenperoxid	Hydrogenperoxid 30%, Merck (Darmstadt, Germany)
Immersionsöl	Immersol 518 F, Zeiss (Germany)
Kathon	pH 5.0, Rohm & Haas Ltd., 62368 (U.K.)
LoadingDye	Fermentas International Inc.(Burlington)
NaOH (5 M)	Combi Titrisol, Merck (Darmstadt)
NaCl	Merck (Darmstadt)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	Merck, 6391(Darmstadt)
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, 6329 (Darmstadt)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, 6580 (Darmstadt)
Proteasehemmer	complete mini, Boehringer (Ingelheim am Rhein)
Ringer	Ringer-Infusionslösung B.Braun (Melsungen)
RNase freies-H <sub>2</sub> O	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
0,05 % Tween-80	Sigma, P 1754 (Taufkirchen)
Tween allg.	Tween 20, Fluka
Ziegenserum	Ziegenserum (normal), Dako Denmark A/S (Glostrup, Denmark)

**3.3 Reagenzien**

Sekundär-Antikörper (AK)	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, Dako Denmark A/S (Glostrup, Denmark)
Progesteron-AK (Kaninchen)	K. Okuda, OK-1 03.12.97, (Japan)
Oestradiol-17 $\beta$ AK (Kaninchen)	Eigenherstellung E2/2pool1 23.11.77
Peroxidase-labeled Oestradiol-17 $\beta$	Eigenherstellung 17 $\beta$ /2pool1 26.07.95
Peroxidase-labeled Progesteron	Sigma, P3659 (Taufkirchen)
unlabeled Progesteron	Sigma, P 0130 (Taufkirchen)
unlabeled Oestradiol-17 $\beta$	Serva 31100 (Heidelberg)

**3.4 Kits**

DNA-Extraktion aus Gelen	Nucleo Spin Extraction Kit, Macherey&Nagel (Düren)
DNA-digestion	DNA-free TM© , Ambion (USA)
Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I	12 239 264001, Roche Diagnostics (Mannheim)
RNA 6000 Nano	Agilent Technologies (Waldborn) Reagents& Supplies
RNA NucleoSpin II	Total RNA Isolation-Kit, Macherey-Nagel (Düren)
ELISA-Kits	ELISA-Kit, human VEGF-C, R&D Systems Europe, Ltd., (Abington, UK) ELISA-Kit, human VEGF-D, R&D Systems Europe, Ltd., (Abington, UK)
ELISA DuoSets	DuoSet human VEGF-R3, R&D Systems Europe, Ltd., (Abington, UK)

### 3.5 Enzyme

Reverse Traskriptase	M-MLV RT Rnase H(-) Point Mutant, Promega (Mannheim - USA)
Taq-Polymerase	Taq DNA-Polymerase, Roche Diagnostics (Mannheim)

### 3.6 Marker

100bp-Marker	Roche (Mannheim), New England Biolabs, N3231S (Frankfurt)
--------------	--

### 3.7 Puffer und Lösungen

Agarose-Gel 1.5%	0.45 g Agarose 30 ml TAE-Puffer 3 µl Ethidiumbromidlösung
Assay-Puffer	7.12 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 8.5 g/l NaCl pH 7.2 1.0 g/l BSA (0.1%)
Bromphenolblau	15 ml Bromphenolblaulösung 85 ml RNA-H <sub>2</sub> O 100 ml Glycerin rein
Coating-Puffer	4.29 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x 10 H <sub>2</sub> O 2.93 g/l NaHCO <sub>3</sub> pH 9.6
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg EtBR/ml H <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 µl auf DEPC auf 1 l H <sub>2</sub> O
Gewebepuffer	PBS mit 1 Tablette <i>complete mini</i> auf 10 ml Puffer
PCR-H <sub>2</sub> O	Reinstwasser 20 Min bei 121°C autoklavieren

PBS-Puffer (EIA)	0,24 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 8,0 NaCl 0,29 g KCl 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ad 1 l mit $\text{H}_2\text{O}$ bidest pH 7,4
Substrat Lösung A	1 g/l $\text{H}_2\text{O}_2$ -urea 18 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 10.3 g citric acid x 1 $\text{H}_2\text{O}$ 0.1 ml Kathon pH 5.0      photosensitiv
Substrat Lösung B	300 mg TMB (Tetramethylbenzidin) 40 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) 960 ml $\text{H}_2\text{O}$ 10.3 g citric acid x 1 $\text{H}_2\text{O}$ pH 2.4      photosensitiv
50xTAE-Puffer	2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 1 M Essigsäure 90 mM EDTA

### 3.8 Primersequenzen und Produktlängen der qPCR

Die verwendeten Primer wurden von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Forward und Reverse Primer sind in 5' -> 3' Richtung angegeben.

Erstellt wurden sie hauptsächlich von mir selbst; einige auch von Mitarbeitern des Institutes für Physiologie und zwar auf der Grundlage im Internet verfügbarer boviner Gensequenzen - oder sie wurden der Literatur entnommen (jeweils angegeben).

Primer	Sequenz in 5' -----> 3' Richtung	Produktlänge	Quelle
<b>Hauskeeping Gene</b>			
<b>Histon</b>	for ACT GCT ACA AAA GCC GCT C rev ACC TGC CTC CTG CAA AGC AC	232	AF469469
<b>Angiogene Faktoren</b>			
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	for GAG CCT GAT GCT TTA ACT TTG C rev GAG TTT CAG AGG CAG GTA ATG G	199	NM_174339
<b>Nrp.-1</b>	for TCC GAC TCC CAG ATT ACA GC rev TAA ACA CCT TGT TCT CCC GG	208	AF395335
<b>Nrp.-2</b>	for CTG GAA CTC TTC GGC TGC rev ACG CCT TTC ACG GTC TTG	239	AF 534636
<b>VEGF-A<sub>121</sub></b>	for CCG TCC CAT TGA GAC CCT rev CGG CTT GTC ACA ATT TTT CTT GTC	280	Lopes et al., 03
<b>VEGF-A<sub>165</sub></b>	for CCG TCC CAT TGA GAC CCT G rev GCC CAC AGG GAT TTT CTT GC	278	Lopes et al., 03
<b>VEGF-A<sub>189</sub></b>	for CCG TCC CAT TGA GAC CCT G rev TGC CCT TTG CCC TTT CCT C	297	Lopes et al., 03 NM_174216
<b>VEGF-B<sub>167</sub></b>	for CCC CTG GTC ACC AGA AGA AAG TG rev GAG GGG CCT GGG GCT GTC	339	AB004273
<b>VEGF-B<sub>186</sub></b>	for ACT GGG CAG CAC CAA GTC rev GAG TGG AAG CCC TGT CTG G	148	AB004274
<b>Anti-angiogene Faktoren</b>			
<b>Vasohibin-1</b>	for CTG CCC AAG ATC CCC ATA C rev TCT TTG GTC ATT TCC TTG GC	195	ENSBTAG 00000008735
<b>Vasohibin-2</b>	for GTG AGC CTC GCT ACC AGC rev CTC CCA GGT GTG GCT GTC	105	BC111257
<b>TSP-1</b>	for CTG CAA CAA CCC CAA ACC rev TTG CAC TCA TCA ACG TCT TTG	225	NM_174196
<b>TSP-2</b>	for TAA CAG GAA GAG CTG CCC C rev GGG TTG GTG TTG ACA CAG C	216	NM_176872
<b>CD36</b>	for AAA GTT TTC AAT GGA AAG GAC G rev TTA TTT CAG CTC CAA ACA CAG C	214	NM_174010
<b>CD47</b>	for TTG AGC AGA GAA GGG GAA AC rev CAA GGA CAG TGA GCA GTA GTC C	214	NM_174708

Lymphangiogene Faktoren			
<b>VEGF-C</b>	for rev	GCC TCT CTC TCA AGG CCC AGC CAG GCA TCT GCA GAC	205 NP_776913.1
<b>VEGF-D</b>	for rev	AAG ATC GCT GCT CCC ATT C ATG AGG TCT CTG GGA CAT GG	211 A7MBB6_BOVIN
<b>VEGF-R3</b>	for rev	TCG AAC CAG AGG CTG AGC GAT GAG GAG AAG GAG GAC CC	204 O18904_BOVIN
	rev	TCT GGC AAC AGC GTG AAT AC	
<b>PDGF-A</b>	for rev	TGG AAA CCA GTC TGA GAG CC AGG AAG TTA GCG GAC GTG G	178 BC105569?
<b>PDGF-R<math>\alpha</math></b>	for rev	TTC ACC TTG ACT TCC TGA AGA GTG TGC GAG CTG TGT CTG TTC CTC TTG	235 A7E3B9_BOVIN
<b>PDGF-R<math>\beta</math></b>	for rev	GGA GAG CAT CTT CAA CAG CC TGG GCA GCT CTG GGT AAG	110 ENSBTAT 00000003631
<b>Podoplanin</b>	for rev	ATC TGC CAA CTG CCA AAG GAC AAG CCA CCT TTC TGA GTG	175 BC149398
<b>Prox-1</b>	for rev	AAC AAG CCC AAG CGA GAA G AGA CCT GAG GAA CTTGGC G	181 ENSBTAT 00000014573

Tab.1: Primersequenzen, Produktlängen und Quellen der untersuchten Faktoren.

### 3.9 Primerdesign

Die Primersequenzen wurden entweder der Literatur entnommen oder mit Hilfe des Primerdesing-Programmes „Husar“ (Genuis) der DKFZ Heidelberg erstellt. Als Grundlage dienten bovine Gensequenzen bzw die CDS von ihnen aus der Ensembl- oder Pubmed-Datenbank. Vorausgesetzt wurde dabei ein C/G Gehalt zwischen 40 und 50% und das Enden des Primers auf Guanin oder Cytosin. Das entstehende PCR-Produkt sollte 100 bis 300bp, die Primer selbst etwa zwischen 18 und 22bp lang sein. Um ein Entstehen von Primer-Dimeren während der Reaktion zu vermeiden, sollten sie untereinander keine Komplementarität aufweisen. Außerdem sollten sie eine geringe Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen (Self-Annealing) haben und ähnliche Schmelztemperaturen (im Bereich von ca. 60°C) aufweisen.

**3.10 Probenmaterial und Probengewinnung**

Das Probenmaterial für die drei Experimente dieser Arbeit wurde durchweg von weiblichen Rindern (bos bovis) gewonnen. Dafür wurden zum Teil Kühe aus einem Tierexperiment (induzierte Luteolyse) verwendet und zum Teil Material von Schlachtkühen. In jedem Fall wurde bei den Tieren die Ovarien - und bei den Schlachttieren außerdem die Uteri - gewonnen, um eine möglichst exakte Zyklusbestimmung durchführen zu können und nur Proben von gesunden Kühen zu verwenden. Als Probenmaterial dienen dann extrahierte mRNA und Protein-Homogenisate aus bovinen CL und Follikel, sowie Gefrierschnitte von bovinen CL.

Sowohl die CL während Zyklus und Gravidität, als auch die Follikel wurden folgendermaßen gewonnen: Am Schlachthof in Landshut wurden innerhalb von 10-20 Min nach der Schlachtung Eierstöcke von Deutschen Fleckvieh Kühen mit gesundem Genitaltrakt gewonnen und sofort auf Eis in das Labor nach Freising transportiert. Der Zyklusstand des Tieres bzw. das Alter der CL in Tagen wurde anhand der Funktionsgebilde auf dem Ovar festgelegt. So wurden Größe, Farbe und Konsistenz des CL, sowie Größe und Anzahl der sich auf den beiden Ovarien des Tieres befindenden Follikel berücksichtigt. Weiterhin wurde bei allen Tieren der Uterus hinsichtlich Größe, Farbe, Konsistenz und Schleim untersucht. Nur Gelbkörper und Follikel von Tieren mit einwandfreiem Reproduktionstrakt wurden weiter präpariert.

3.9.1 Experiment 1: Gelbkörper (CL) während Zyklus und Gravidität

Bearbeitung und Gruppeneinteilung

Die am Schlachthof gesammelten und wie oben beurteilten CL wurden aus dem umgebenden Eierstockgewebe präpariert in 2-3 mm große Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C. Unter Berücksichtigung von Größe, Farbe und Konsistenz des CL, sowie Größe und Anzahl der sich auf den beiden Ovarien des Tieres befindenden Follikel und des Uterus wurde der Zyklusstand festgelegt.

Es ergab sich folgende Gruppeneinteilung (n=7):

CL der Zyklustage 1-2, 3-4, 5-7, 8-12, 13-16 und > 18Tage.

<b><u>CL der Zyklustage:</u></b>					
<b>1-2</b>	<b>3-4</b>	<b>5-7</b>	<b>8-12</b>	<b>13-16</b>	<b>&gt; 18</b>
<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>

Tab.2: Anzahl der Proben in den CL-Gruppen während des Zyklus

Bei den CL der graviden Tiere wurde zur Bestimmung des Trächtigkeitsmonates die Scheitel-Steiss-Länge der Föten herangezogen (n=6-7).

Die Gruppen wurden wie folgt festgelegt: Trächtigkeitsmonate 1-2, 3-5, 6-7 und >8 Monate

<b><u>CL der Trächtigkeitsmonate:</u></b>			
<b>1-2</b>	<b>3-5</b>	<b>6-7</b>	<b>&gt; 8</b>
<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=6</b>

Tab.3: Anzahl der Proben in den CL-Gruppen während der Gravidität

### 3.9.2 Experiment 2: Gelbkörper (CL) nach induzierter Luteolyse durch PGF2 $\alpha$

Der Versuch wurde von 2000 bis 2001 von der Arbeitsgruppe Schams-Berisha durchgeführt. Mir wurde freundlicherweise das dabei gewonnene CL-Gewebe zur Verfügung gestellt.

Auf der Versuchsstation des Institutes für Physiologie der Technischen Universität München wurde Holstein-Kühen während der mittlutealen Phase (Zyklustag 8-12) 500 $\mu$ l des PGF2 $\alpha$ -Analogons Cloprostenol intramuskulär appliziert. (Estrumate, Intervet, Germany; siehe auch Kliem et al., 2007). Anschließend wurden die Ovarien der Kühe durch transvaginale Ovariektomie, wie bei Schams et al. (2003) beschrieben, entnommen und zwar 0,5, 2, 4, 12, 24, 48 und 64h nach PGF2 $\alpha$ -Injektion.

Als Kontrolle wurden zusätzlich CL vor PGF2 $\alpha$ -Gabe von Kühen der mittlutealen Phase gewonnen (d 8-12, n=5). Die Gewebepräparation erfolgte wie bei den CL der Zyklus- und Graviditätsproben. Sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA- oder Protein-Extraktion bei -80°C gelagert.

Bei den CL während der induzierten Luteolyse waren in jeder der 8 Gruppen jeweils 5 Proben:

<b><u>CL der Stunden nach Induktion der Luteolyse</u></b>							
<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>64</b>
<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>

Tab.4: Anzahl der Proben in den CL-Gruppen während der induzierten Luteolyse

Experimentelles Design:

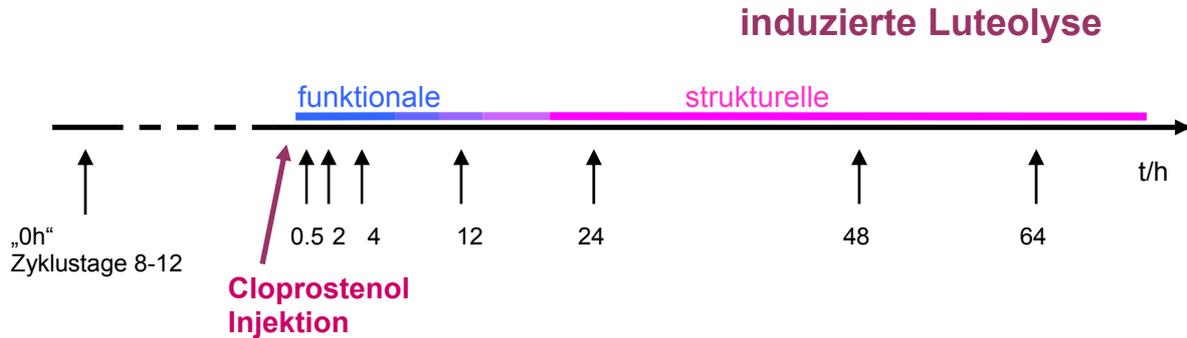


Abb.16: Induktion der Luteolyse durch Cloprostenol-Injektion und Entnahme der CL/Ovarien während verschiedener Stadien der Luteolyse durch transvaginale Ovariectomie (n=4-5)

3.9.3 Experiment 3: Follikel während verschiedener Entwicklungsstufen

Die Glasschalen, in denen die Follikelpräparation vorgenommen wurde, wurden zuvor in 5 Molarer Natronlauge eingelegt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die verwendeten Pinzetten und Scheren wurden nach jedem Follikel mit 70%igem EtOH gespült und abgeflammt. Gesund erscheinende Follikel (mit durchsichtiger Wand, klarer Follikelflüssigkeit und gut erkennbarer Vaskularisierung) wurden vom Ovar und dem umliegenden Geweben gelöst. Anschließend wurden unter dem Stereomikroskop vorsichtig alle Zellschichten, einschließlich der TI mit feinen Pinzetten entfernt. Nachdem die FF zur Bestimmung der Konzentrationen von E2 und P4 abgesaugt wurde, wurden die Follikel vorsichtig geöffnet. Die Innenfläche der Follikel wurde mehrfach vorsichtig abgeschabt und mit Ringer-Lösung gespült um die GC zu gewinnen. Die Spülflüssigkeit sowie die FF wurden 10 Min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und die so gewonnen GC-Pellets in flüssigem Stickstoff gefroren. Die übrig bleibende TI wurde noch mehrmals in Ringerlösung gewaschen um sämtliche rechtliche GC zu lösen und dann ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die GC und TI bei -80°C, die FF bei -20°C. Da gesunde Follikel einen relativ konstanten Progesteron Gehalt in der FF aufweisen, wurden, um atretische Follikel auszuschließen, nur solche mit in die Bewertung aufgenommen, die eine P4 Konzentration von unter 100 ng/ml FF aufwiesen. Prinzipiell wurden Follikel einer Größe von 3 mm bis 18 mm gesammelt.

Anhand der Größe und des E2 Gehalt in der FF wurden die Follikel in folgende Gruppen eingeteilt (n=7-12):

<b>Follikelgruppe</b>	<b>Follikelgröße in mm</b>	<b>E-2-Gehalt in der FF</b>
<b>I</b>	<b>&lt; 5</b>	<b>&lt; 0,5 ng/ml</b>
<b>II</b>	<b>6-8</b>	<b>0,5 - 5 ng/ml</b>
<b>III</b>	<b>8-13</b>	<b>5 - 40 ng/ml</b>
<b>IV</b>	<b>12-14</b>	<b>40 - 180 ng/ml</b>
<b>V</b>	<b>&gt; 14</b>	<b>&gt; 180 ng/ml</b>

Tab.5: Die Follikelgruppen, ihre Größe in mm und ihr entsprechender E2 Gehalt in der FF

Nach einigen Testläufen und der mRNA-Qualitätsmessung ergab sich für die GC und die TI jeweils folgende Anzahl der Proben pro Follikelgruppe:

<b>Anzahl der Proben in den verschiedenen Follikelgruppen nach Größe (mm)</b>					
	<b>&lt; 5</b>	<b>6-8</b>	<b>8-13</b>	<b>12-14</b>	<b>&gt; 14</b>
<b>GC</b>	<b>n=12</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=8</b>	<b>n=12</b>
<b>TI</b>	<b>n=12</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=8</b>	<b>n=12</b>

Tab.6 Anzahl der Proben in den GC- und TI-Gruppen

### 3.11 RNA-Extraktion

Bei der Arbeit mit RNA muss man beachten, dass sie durch RNasen schnell abgebaut wird und somit eine relativ kurze Halbwertszeit hat. RNasen sind in der Umwelt weit verbreitet und kommen insbesondere auf den Händen vor, weshalb das Tragen von Einmal-Handschuhen zum Schutz vor Kontamination unverzichtbar ist. Im Wasser vorkommende RNasen wurden durch den Zusatz von 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) abgebaut, Pinzetten vor Gebrauch mit Waschkohol abgeflammt. Alle Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden bei 121°C autoklaviert.

Bei der Extrahierung der RNA wurde das NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel verwendet, welches die RNA über einen Filter aufreinigt und einen Schritt zur DNA-Verdauung mittels DNase beinhaltet.

Bei den CL-Proben sowie den GC und TI wurden bis zu 30 mg Gewebe oder Zellen mit einem sterilen Skalpell von den tiefgefrorenen Gewebestücken entfernt oder aus den bei -80°C gelagerten Reaktionsgefäßen entnommen (GC und TI) und zusammen mit 600 mg inerten Matrix-Kügelchen, 350 µl RA 1 Lysepuffer und 4 µl β-Mercaptoethanol in FastPrep Schraubgefäße gegeben. Bei 7000 rpm für 20 Sek erfolgte die Homogenisierung im MagnaLyser von Roche. Anschließend wurden 350 µl 70% (v/v) Ethanol zugefügt, um die Bindeeigenschaften der RNA zu verändern und es der RNA zu ermöglichen sich an den NucleoSpin® RNA II Filter zu lagern. Als nächstes wurden 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) hinzugegeben um die Silica-Membran des Filters zu entsalzen. Die Entsalzung erlaubt einen effektiveren DNase-Verdau im folgenden Schritt. Dazu wurde in einem zusätzlichen sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 1x DNase I zu 9x DNase Reaktionspuffer gegeben. 95 µl der so entstandenen Dnase-Reaktion-Mixtur wurden direkt auf den Filter pipettiert und für 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert, um jegliche mögliche Fremd-DNA zu verdauen. Anschließend wurden die Filter in folgendem, 3 Schritte umfassenden, Prozess gewaschen:

- 1.Schritt: 200 µl RA2 (Waschpuffer) um die rDNase zu deaktivieren, bei 8000 rpm für 30 Sek zentrifugiert.
- 2 Schritt: 600 µl RA3 (Waschpuffer); bei 8000 rpm für 30 Sek zentrifugiert.
- 3. Schritt: 250 µl RA3, bei 11000 rpm für 2 Min zentrifugiert um die Membran vollständig zu trocknen.

Schließlich wurde im letzten Schritt reine RNA aus dem Filter gelöst, indem 52 µl DEPC-H<sub>2</sub>O oder RNA-freies H<sub>2</sub>O darauf gegeben wurden und bei 11000 rpm für 2 Min zentrifugiert wurde. Die gewonnene RNA wurde direkt auf Eis gestellt und nach der Vermessung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.12 Überprüfung der Quantität und Qualität der RNA

#### 3.12.1 Messung des RNA-Gehaltes in der Lösung

- *Bei den CL-Proben:*

Biophotometer:

Mittels UV-Messung bei 260 nm im Biophotometer wurde die RNA-Ausbeute bestimmt. Dabei wurde die RNA je nach erwarteter Ausbeute 1:10 bis 1:50 verdünnt und jede Probe dreimal gemessen. Von diesen Verdünnungs-Triplikaten wurde der Mittelwert berechnet um so die genaue Konzentration der Stammlösung zu erhalten und spätere Verdünnungsfehler zu minimieren.

Die Reinheit der RNA wurde durch Messungen bei 230 nm (Phenol) und 280 nm (Proteine) überprüft. Das Verhältnis von RNA zu Protein, also 260/280 nm lag zwischen 1,6 und 1,8, was einer hohen Reinheit der isolierten RNA entspricht. Die RNA von ausgewählten Proben wurde einer weiteren Qualitätsprüfung im Bioanalyser unterzogen.

- *Bei den Follikeln:*

NanoDrop:

Der NanoDrop ist eine Weiterentwicklung des Biophotometers und wurde erst im Verlauf meiner Arbeit am Institut angeschafft. Es handelt sich hierbei um ein UV-Vis (220-750 nm) Spektralphotometer, das 1 µl-Proben per Oberflächenspannung in einem speziellen Proben-Haltesystem mit hoher Präzision und ohne aufwendige Mehrfachbestimmungen messen kann. Die jeweilige Probe wird hier auf das Ende eines optischen Glasfaserkabels pipettiert, woraufhin ein zweites mit der Lösung in Kontakt gebracht wird, so dass zwischen den beiden Faserenden eine Flüssigkeitssäule entsteht. Der Abstand wird exakt auf einen Lichtweg von 0,2 mm eingestellt. Als Lichtquelle dient eine Xenonlampe. Zur Analyse des durch die Probe hindurchtretenden Lichts wird ein linearer CCD-Chip verwendet, anschließend werden die Daten durch eine spezielle Software bearbeitet und an einen PC weitergeleitet.

So erhält man nach nur einer Messung und einem Probenaufwand von nur 1 µl die RNA-Konzentration der Lösung in ng/µl, sowie die Reinheitsangaben bei 230 nm und den Gradienten 260/280 nm.

### 3.12.3 RNA-Qualitätskontrolle

Zur Bestimmung der RNA-Qualität nach Extraktion wurde der Bioanalyser 2100 verwendet. Dieser misst den Grad an Degeneration und Abbau der RNA in der Probe.

Das Funktionsprinzip des Bioanalyzers ist die elektrophoretische Trennung der RNA Proben und anschließende Erkennung über laserinduzierte Fluoreszenzstrahlung. Dazu wird die RNA auf einen speziellen Chip gegeben, welcher eine bestimmte Anzahl von Mikrokanälen besitzt. In diesen werden die RNA Fragmente ihrer Größe nach separiert. Über die Bioanalyser Software wird ein Elektropherogramm und eine Abbildung in Gelform erstellt und das Verhältnis von 18S und 28S rRNA, als auch die RNA Konzentration der Proben aufgezeigt. Als Referenzwert für die Analyse fungiert der RNA 6000 ladder Standard, welcher sechs RNA Fragmente folgender Größe beinhaltet: 0,2 kb, 0,5 kb, 1 kb, 4 kb und 6 kb. Die unbekanntenen Proben werden von der Software mit dem Standard verglichen und so die Konzentration der RNA und die rRNA Höchstwerte der Proben berechnet.

Wichtige Merkmale für einen erfolgreichen Standardlauf sind die Abbildung von sechs RNA Gipfeln und einem Marker Gipfel. Außerdem sollten zwei ausgeprägte ribosomale Gipfel, die mit den 18S und 28S Gipfeln eukaryotischer RNA vergleichbar sind, und eine relative flache Grundlinie zwischen den 5S und 18S Gipfeln zu sehen sein. Für den erfolgreichen Lauf der gesamt RNA sind zwei ribosomale Gipfel und ein Marker Gipfel und eine flache Grundlinie vor, zwischen und nach den Gipfeln aussagekräftig.

Die Qualität der RNA wird einmal über die RNA Integrity Number (RIN) dargestellt, welche von der Software berechnet wird und Werte von 1 bis 10 beinhaltet. Ein RIN-Wert von 1 würde eine stark degradierte RNA, ein Wert von 10 eine hoch intakte RNA bedeuten. Ein weiterer Qualitätsindikator ist das Verhältnis von der Menge der 28S rRNA zur 18S rRNA, hierbei wäre der beste Wert 2. Das Verfahren an sich wurde strikt nach dem Protokoll des Agilent Bioanalyzers durchgeführt.

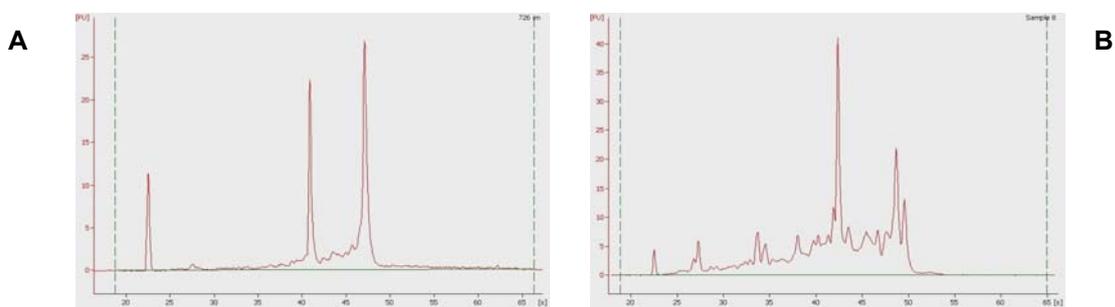


Abb.17: Zwei Elektropherogramme; FU = Fluoreszenz, S = Sekunden, 1. Signal = Marker, Signal bei 25s= 5S rRNA, Signal bei 40s = 18S rRNA, Signal bei 47s = 28S rRNA, **A** Probe mit guter RNA-Qualität, RIN-Wert = 9,4 **B** Probe mit weniger guter RNA-Qualität RIN-Wert = 6,1

Die Qualität der getesteten RNA-Proben war nach den Ergebnissen des Bioanalyzers von guter Qualität. Der RIN-Wert lag bei durchschnittlich 8,2, die ratio von 28S/18S bei 1,4. Die vom Bioanalyser erstellten Gelbilder zeigten dementsprechend jeweils eine dickere Bande der 28S rRNA und eine dünnere 18S RNA.

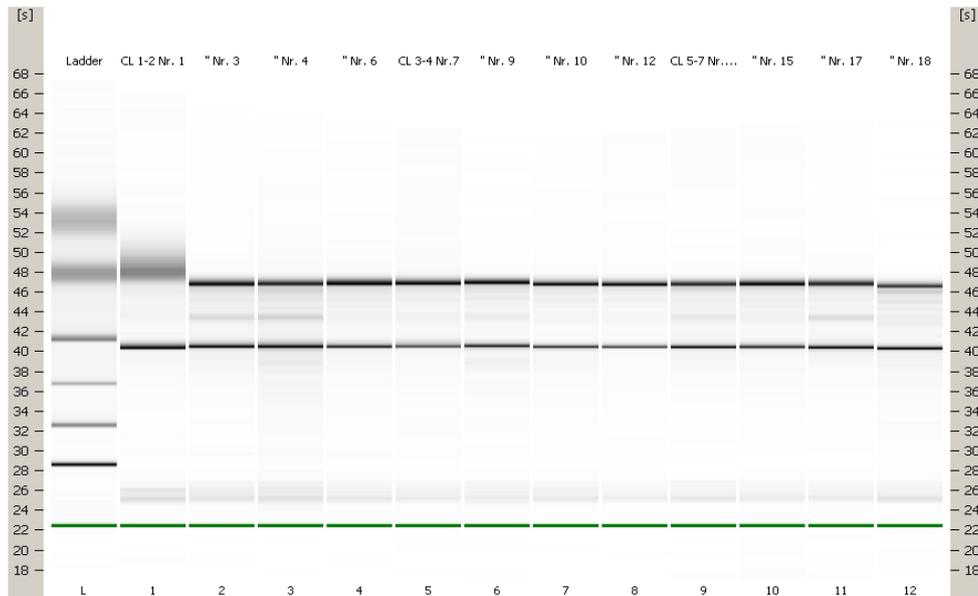


Abb.18: Beispiel eines Gelbildes, erstellt vom Bioanalyser. Ganz oben sind die Probenbezeichnungen aufgeführt. Die obere schwarze Bande stellt die 28S rRNA Bande dar, die untere Bande die 18S rRNA Bande. Ganz links in der ersten Reihe ist der RNA 6000 ladder Standard aufgetragen.

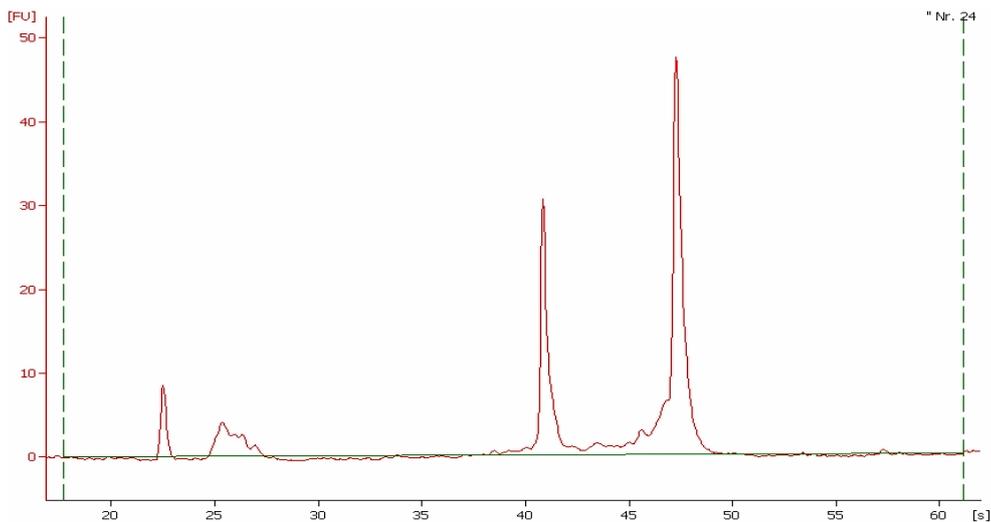


Abb.19: Das Elektropherogramm einer Probe mit dem sehr guten RIN-Wert 10,0 (CL-Zyklus Probe 2-5). Erstellt am Bioanalyser. FU = Fluoreszenz, S = Sekunden, erstes Signal = Marker, Signal bei 25s = 5S rRNA, Signal bei 40s = 18S rRNA, Signal bei 47s = 28S rRNA

### 3.13 Reverse Transkription

RNA hat den Nachteil, dass sie durch RNasen schnell abgebaut wird und von der Taq-Polymerase schlecht als Matrize erkannt wird. Daher werden mit Hilfe der reversen Transkriptase, einem in RNA-Viren vorkommenden Enzym, aus einzelsträngiger RNA komplementäre cDNA-Stränge hergestellt (cDNA, complementary DNA). cDNA ist wesentlich stabiler als RNA, kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden und z.B. für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) genutzt werden.

Die verwendete reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus, point Mutant, Promega), benötigt hierzu Desoxyribonukleosid Triphosphate (dNTP), Magnesium-Ionen (MgCl im 5x M-MLV Puffer) und nicht-spezifische Primer (Random Hexamere).

Da Gesamt-RNA eingesetzt wird, die sowohl mRNA, als auch rRNA enthält, und da die reverse Transkriptase beide Formen in cDNA umschreibt, enthält auch die erhaltene cDNA alle Sequenzen aus mRNA und rRNA. Diese Transkription erfolgt optimalerweise im Verhältnis 1:1. Für die Reaktion wurden jeweils so viele  $\mu\text{l}$  der extrahierten gesamt-RNA gelöst in Rnase-freiem Wasser auf 15  $\mu\text{l}$  (CL) oder 25  $\mu\text{l}$  (GC und TI) aufgefüllt, dass eine Konzentration von 1000 ng RNA (CL) bzw. 500 ng RNA (GC und TI) erreicht wurde. Die RNA wurde bei  $65^{\circ}\text{C}$  für 5 Min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für den Mastermix wurden folgende Inhaltsstoffe in ein Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

<b>Mastermix für 1 Ansatz (<math>\mu\text{l}</math>):</b>	
RNA-H <sub>2</sub> O	26
5x M-MLV Puffer	12
Random-Hexamere (50 $\mu\text{M}$ )	3
dNTP's (10 mM)	3
M-MLV RT-Rnase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	1

Tab.9: Mastermix für den Ansatz der **CL**

Bei den CL wurden zu je 45  $\mu\text{l}$  des Mastermix **15  $\mu\text{l}$**  RNA-Lösung gegeben, die 1000 ng RNA enthielt (Gesamt-Reaktionsvolumen von 60  $\mu\text{l}$ ) und vermischt. Die erhaltene cDNA hatte dann eine Konzentration von **16,66 ng/ $\mu\text{l}$**  und wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

<b>Mastermix für 1 Ansatz (µl):</b>	
RNA-H <sub>2</sub> O	16
5x M-MLV Puffer	12
Random-Hexamere (50 µM)	3
dNTP's (10 mM)	3
M-MLV RT-Rnase (200 U/µl)	1

Tab.10: Mastermix für den Ansatz der **GC und TI**

Bei den GC und der TI wurden zu je 35 µl des Mastermix **25 µl** RNA-Lösung gegeben, die 500 ng RNA enthielt (Gesamt-Reaktionsvolumen von 60 µl) und vermischt. Die erhaltene cDNA hatte in dem Fall dann eine Konzentration von **8,33 ng/µl**.

Im Anschluss wurden die Proben generell wie folgt inkubiert und am Ende 2 Min bei 90°C denaturiert, um die gebildeten Stränge zu trennen und die temperaturempfindlichen RT-Enzyme, sowie die RNA-Matrize zu zerstören.

<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [ Min ]</b>
48	50
21	10
90	2
4	Pause

Tab.11: Cyclerprogramm für die RT-PCR

### 3.14 Primeroptimierung

Die Primer wurden nach Synthetisierung durch die Firma MWG in lyophilisiertem Zustand versendet. Nach Erhalt wurden sie mit RNase freiem Wasser auf 200 pmol verdünnt. Diese Stammlösung wurde dann zu Arbeitslösungen 1:5 mit RNase freiem H<sub>2</sub>O zu einer Endgebrauchslösung mit 20 pmol/µl verdünnt.

### 3.14.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Vervielfachung bestimmter DNA-Sequenzen. Der zwischen zwei Primern liegende DNA-Bereich wird mit Hilfe thermostabiler Enzyme, den DNA-Polymerasen, amplifiziert. Grundsätzlich besteht eine PCR immer aus sich wiederholenden Zyklen mit folgenden Reaktionsschritten:

Bei der Denaturierung (94°C) wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Beim Primer-Annealing lagern sich die Primer bei einer Temperatur von 55°C bis 68°C an die Einzelstrang-DNA-Matrize. Bei der anschließenden Elongation herrscht eine für die DNA-Polymerase optimale Temperatur von 72°C bis 75°C, was eine Primerextension durch Einbau von Nucleotiden am 3'-Ende, ermöglicht.

Um die optimalen Annealing Temperaturen der Primer zu ermitteln wurde mit cDNA verschiedener Gewebe (meist CL-Zyklus, CL-Luteolyse, Leber) sogenannte Gradienten-Block-PCRs durchgeführt. Hierbei werden in den verschiedenen Reihen des Thermocyclers während des Annealing-Schrittes verschiedene Temperaturen erreicht (vorher genau festgelegt). Dies ermöglicht es mit nur einem Reaktionsansatz die Amplifizierung gleichzeitig bei verschiedenen Annealing Temperaturen durchzuführen.

Anschließend können mit der Gelelektrophorese die Produkte sichtbar gemacht werden und damit festgestellt werden, bei welcher Annealing-Temperatur am meisten reines Produkt gebildet wurde.

Hierfür wurde 1 µl cDNA mit 23 µl des MasterMix mit folgender Zusammensetzung vermischt:

<b>Mastermix für 1 Ansatz (µl):</b>	
RNase-freies Wasser	18,9
10x Puffer (mit MgCl)	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
forward Primer	0,5
reverse Primer	0,5
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1

Tab.7: Mastermix für die Gradienten-Block-PCR

Der Reaktionsansatz wird gemischt, kurz abzentrifugiert und in den vorgeheizten Block-Cycler gestellt. Die Proben werden 2 Min bei 94°C denaturiert, anschließend erfolgt die spezifische PCR. Abgeschlossen wird die Reaktion mit einer letzten 2-minütigen Extensionsphase.

Cyclerprogramm	Zyklus Einstellung
Denaturierung, 94°C, 2 Min 0 Sek	
Zyklen (35)	Denaturierung: 94°C, 45 Sek
	Annealing (Primer-spezifisch): 58-64°C, 45 Sek
	Elongation: 72°C, 45 Sek
Extensionsphase, 72, 2 Min 0 Sek	
Pause 4°C	

Tab.8: Cyclerprogramm für die Gradienten-Block-PCR

### 3.14.2 Gelelektrophorese mit Agarosegel

Zur Kontrolle des gebildeten PCR-Produktes werden jeweils 5 µl Produkt mit 1 µl Bromphenolblau-Glycerin (oder LoadingDye) gemischt und in die Taschen eines 1.5%igen Agarosegels pipettiert. Dieses enthält pro 10 ml Gel 0,5 µl Ethidiumbromid, welches später, unter UV-Licht Doppelbanden sichtbar werden lässt und mit einem Video-Dokumentationssystem aufgenommen wurden. Zur Überprüfung der Produktlänge lässt man außerdem 0,5 µl eines 100 bp-Ladders mitlaufen, der vorher ebenfalls mit LoadingDye vermischt wurde. Die Elektrophorese erfolgt über 45 Min bei 80 Volt.

Für etablierte Primerpaare genügt die Bestimmung und Bestätigung der Produktlänge zur Identifizierung des PCR-Produktes. Für neu erstellte Primerpaare wird das PCR-Produkt aus dem Agarosegel extrahiert und gereinigt und anschließend sequenziert. Die Sequenz wird dann mit dem entsprechenden bovinen Genabschnitt aus der Ensembl- oder Pubmed-Datenbank verglichen.

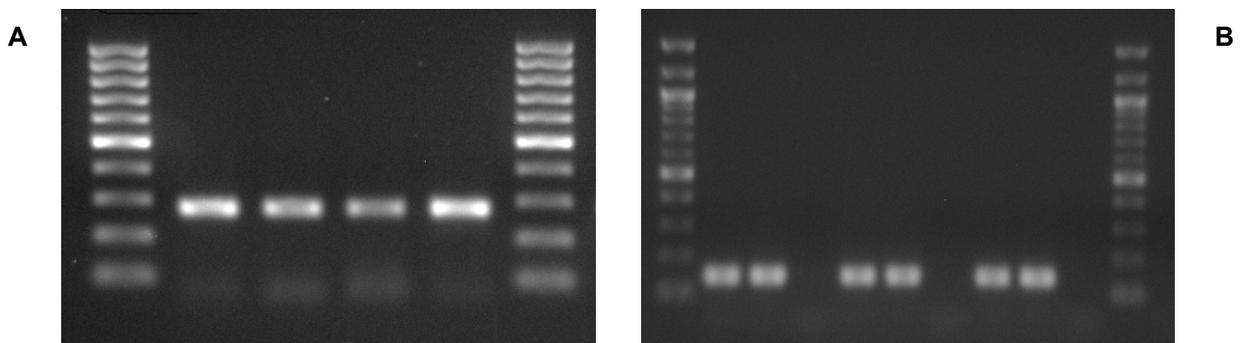


Abb.20: Agarosegelbilder von **A** VEGF-A<sub>121</sub>. CL-Zyklus Proben 3-1, 3-2, 6-3 und 9-5. Nach Rotogene-Lauf bei 60°C. Produktlänge 280 bp. **B** VEGF-B<sub>167</sub>. Die Probenabfolge ist jeweils CL-Mix, Luteolyse-Mix, Wasser – bei drei verschiedenen Temperaturen und zwar bei 60°C, 62°C und 64°C. Nach GradientenBlock-PCR. Produktlänge 140 bp.

Die PCR Produkte wurden, sofern sie nicht der Literatur entnommen waren, mit Hilfe des Promega Wizard-Kits (SV Gel and PCR Clean-Up System) wie folgt nach einer Gelelektrophorese aus dem 1.8%igem Agarosegel extrahiert, gereinigt und sequenziert (Genomic Service Unit, LMU).

Die aus den verschiedenen real-time PCR erhaltenen Produkte wurden durch eine Gelelektrophorese mit 1,5% Agarose aufgetrennt. Die Produktbanden der untersuchten Primer wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des "Promega-Wizard SV Gel and PCR-Clean-Up-System" aus dem Gel extrahiert:

Als erstes wurden die ausgeschnittenen Banden gewogen und je 10 mg Agarosegel 10 µl eines Membran-Bindungs-Puffers mit in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, welches das ausgeschnittene Gelstück enthielt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 10 Min bei 60°C in einen Heizblock gestellt, wobei sie vorher und währenddessen mehrmals gevortext wurden, um das Agarosegel wieder vollständig zu lösen. Anschließend wurden die Tubes noch kurz abzentrifugiert und ihr Inhalt auf den Filter eines SV Minicolumn in einem neuen Eppendorfgefäß überführt. Beide ineinander gesteckte Gefäße wurden dann bei 14000 rpm für 1 Min zentrifugiert und das erhaltene Eluat verworfen. Als nächstes wurden die SV Minicolumns zweimal gewaschen, das erste Mal mit 700 µl einer Membran-Wasch-Lösung (abzentrifugiert bei 14000 rpm für 1 Min) und noch einmal mit 500 µl derselben Waschlösung bei 14000 rpm für 5 Min. Die Minicolumns wurden dann noch einmal bei 14000 rpm für 1 Min zentrifugiert und anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Während des letzten Schrittes wurde die extrahierte DNA aus dem Minicolumn gelöst, indem 30 µl 10 mM TRIS/10 mM HCl (pH 8.0) zugegeben wurden, welche erst 2 Min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 14000 rpm für 1 Min zentrifugiert wurden. Die erhaltene Lösung enthält die cDNA und muss bei -20°C gelagert werden.

Die Sequenzierung wurde vom "Cycle, Clean & Run"-Service der LMU München durchgeführt. ([www.genetik.biologie.uni-muenchen.de/sequencing](http://www.genetik.biologie.uni-muenchen.de/sequencing)).

Dazu mussten 6 µl der erhaltenen Lösung nach der Extraktion mit je entweder 1 µl forward oder reverse Primer zusammen in separate Reaktionsgefäße gegeben werden. Die geforderte Primerkonzentration von 3,2 pmol pro Tube wurde durch Lösung in TRIS-Puffer erreicht. Für die gereinigten cDNA-Proben wurde die maximal vom Sequenzierungs-Service empfohlene Menge gewählt. Die Konzentration der cDNA in der Lösung wurde durch Messung mit dem NanoDrop1000 ermittelt. Die Ergebnisse wurden durch Gelelektrophorese-Läufe überprüft, bei denen die Intensität der cDNA-Proben-Banden mit denen des Ladders verglichen wurde. Anschließend wurden auch die cDNA Lösungen entsprechend mit TRIS verdünnt.

Die von dem Service der LMU ermittelte Sequenz wurde dann mit dem entsprechenden bovinen Genabschnitt aus der Ensembl- oder Pubmed-Datenbank verglichen.

### 3.15 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Neue PCR Varianten, wie z.B. der Rotor-Gene oder Light-Cycler mit modernen Anfärbungstechniken und Detektions-Systemen, ermöglichen die zeitgleiche Sichtbarmachung der ablaufenden PCR-Reaktion und gleichzeitig die Quantifizierung des DNA-Gehaltes der Probe noch im Reaktionsgefäß. Das Grundprinzip im Rotor-Gene-PCR ist das gleiche wie bei der Block-PCR: Durch die Denaturierung bei 95°C über 10 Min werden die cDNA-Einzelstränge getrennt. Es folgt die Amplifikationsphase, in der das Annealing der Primer und die Elongation des Produktes stattfindet. Die Amplifikation wird über mehrere Zyklen wiederholt, bis die Plateauphase erreicht ist, in welcher die Reaktionsbedingungen keine weitere Amplifizierung mehr erlaubt.

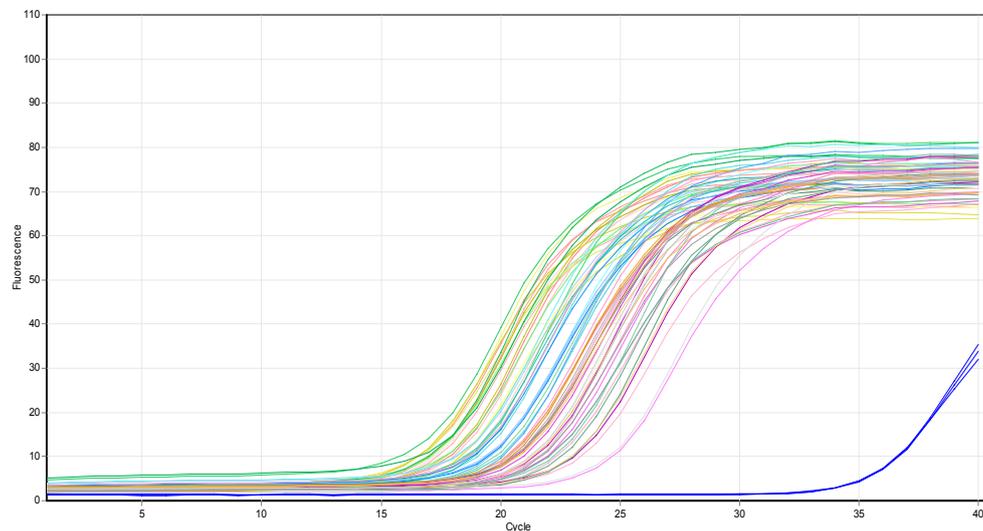


Abb.21: Die original Amplifikationskurve von HIF-1 $\alpha$  im CL, während des Zyklus und der Gravität.

Der Unterschied besteht im Wesentlichen in der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Im Rotor-Gene wird SYBR-GREEN eingesetzt, ein Farbstoff, welcher sich in die doppelsträngige DNA einlagert und Licht im Wellenlängenbereich von 560 nm abstrahlt, wenn er mit 497 nm angeregt wurde. Mit jedem Zyklus wird die Menge an DNA durch die Polymerase verdoppelt und somit am Ende des Elongation-Schrittes ein immer stärkeres Lichtsignal gemessen. Dieser Vorgang kann am Computerbildschirm mit Hilfe von einer Analyse Software für jede Probe einzeln beobachtet werden, selbst wenn der Reaktionsvorgang noch nicht abgeschlossen ist. Abb. 21 zeigt eine charakteristische Amplifikationskurve, welche von der Rotor-Gene Software berechnet wurde und die in vier Phasen eingeteilt werden kann. Während der Phase 1 findet eine exponentielle Amplifikation statt, das Fluoreszenzsignal liegt aber unter einem von der Software berechnetem und

korrigiertem Hintergrundrauschen. Phase 2 ist die exponentielle Amplifikationsphase, Phase 3 die lineare Amplifikationsphase, in welcher die PCR an Effizienz verliert und Phase 4 die Plateauphase.

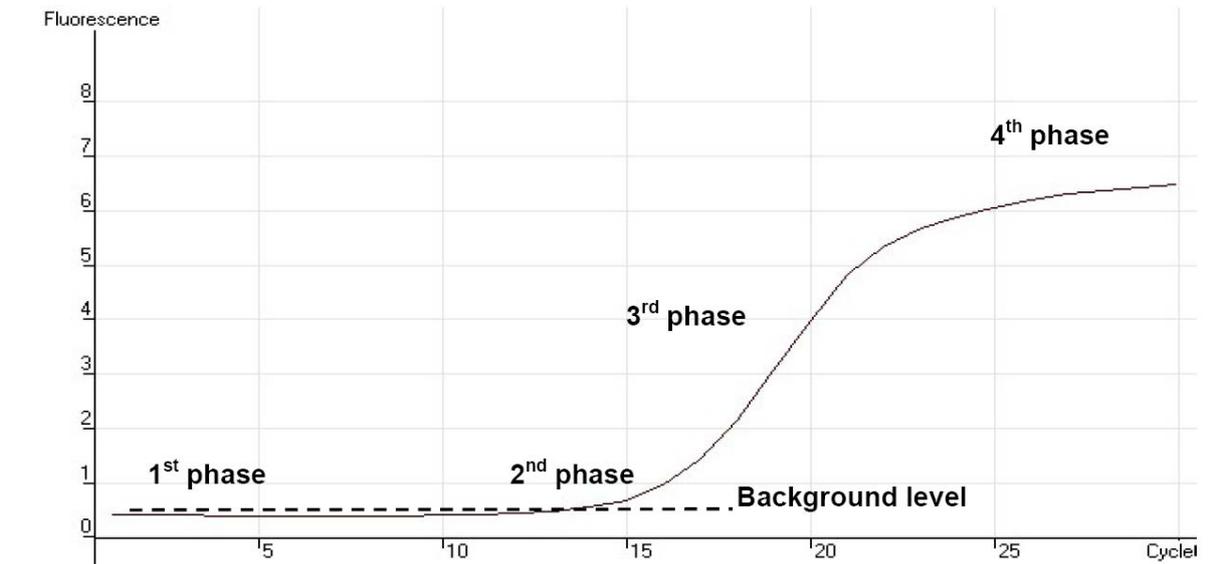


Abb.22 : Sigmoidale Amplifikationskurve eines qRT-PCR Durchganges:

1. Phase: Hintergrundfluoreszenz („Grundrauschen“),
2. Phase: exponentielle Amplifikationsphase,
3. Phase: linearer Bereich der exponentiellen Anstiegsphase,
4. Phase: Plateauphase

Nach Beendigung des Laufes wird mittels der „comparative quantitation“ Methode des Rotor-Gene Analyse Software V5.0 der so genannte „Crossing Point“ (cp) berechnet. Der cp einer Probe beschreibt diejenige Zyklenzahl, an der die zweite Ableitung der sigmoidalen Fluoreszenzkurve ihr Maximum hat, d.h. dort, wo die positive Beschleunigung des Fluoreszenzanstiegs am höchsten ist (2. Phase). Je mehr DNA also in der Probe war, desto schneller wird ein Fluoreszenzsignal erreicht das über dem Hintergrundrauschen liegt, umso niedriger ist der cp-Wert im Vergleich zur Probe mit weniger DNA Gehalt.

An die Amplifikationsphase schließt sich eine Schmelzphase an, in welcher die Temperatur in kleinen Schritten von 60°C bis 99°C erhöht wird, bei gleichzeitiger kontinuierlicher Messung des Fluoreszenzsignals. So entsteht eine Schmelzkurve, die einen plötzlichen Abfall in der Signalintensität bei der Schmelztemperatur und damit die Auftrennung des spezifischen PCR-Produktes zeigt und auch als Peak (Abb.2) dargestellt werden kann. Der produktspezifische Schmelzpunkt ist abhängig vom Gehalt an Guanin und Cytosin-Basen im Produkt (G/C-Gehalt).

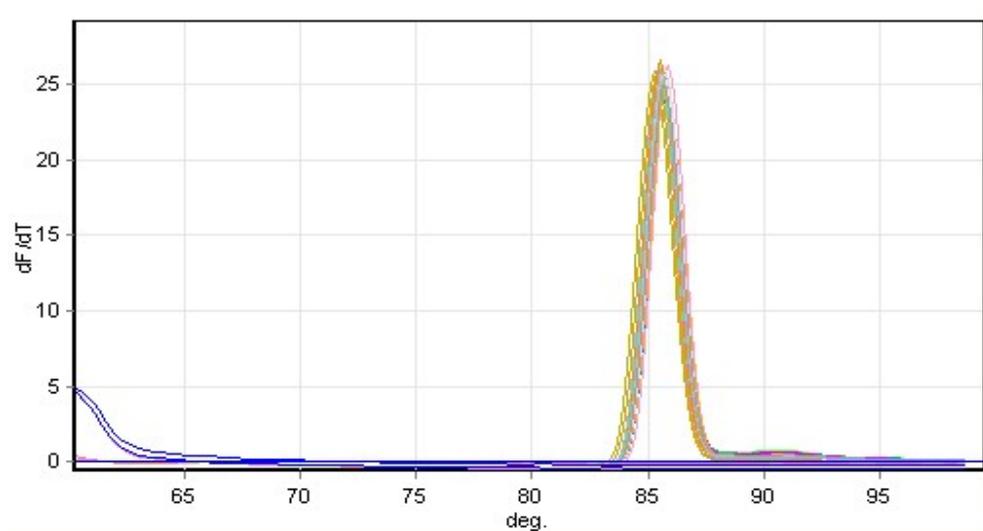


Abb.23: Eine typische Schmelzkurve, deren Schmelzpunkt, hier etwa bei 86°C, dem eines spezifischen Produktes entspricht. In diesem Fall handelt es sich um die original Schmelzkurve von calcr1 im CL während des Zyklus und der Gravität. (Annealing-Temperatur: 66°C)

Für den Ansatz der PCR wurde der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit von Roche verwendet.

<b>Mastermix für 1 Ansatz (µl):</b>	
PCR-H <sub>2</sub> O	6,4
MgCL	1,2
Forward Primer (20 µM)	0,2
Reverse Primer (20 µM)	0,2
LightCyCLer FastStart Mix	1,0

Tab.12: Zusammensetzung des LightCycler FastStart Mastermix in µl

Zu 9 µl des Mastermix werden dann 1 µl cDNA hinzu pipettiert und die geschlossenen Rotor-Gene Reaktionsgefäße werden in das Karussell eingesetzt. Man gibt die primerspezifischen Einstellungen für den PCR-Lauf in den Computer ein und startet den Rotor-Gene.

<b>Cyclerprogramm</b>	<b>Zyklus Einstellung</b>
Denaturierung, 95°C, 10 Min 0 Sek	
Zyklen (40)	Denaturierung: 95°C, 10 Sek
	Annealing (Primer-spezifisch): 64°C, 10 Sek
	Elongation: 72°C, 15 Sek
Abkühlung, 40°C, 1 Min 0 Sek	
Schmelzkurve, 60-99°C, schrittweise in 5 Sek Abständen	

Tab.13: Die grundsätzlichen Einstellungen für den Rotor-Gene.

Nach der beschriebenen Primeroptimierung ergaben sich folgende Annealing-Temperaturen und Schmelzpunkte bei der qPCR:

<b>Primer</b>	<b>Annealing-Temperatur [°C]</b>	<b>Schmelzpunkt [°C]</b>
<b>Hauskeeping Gen</b>		
<b>Histon</b>	<b>60</b>	<b>88</b>
<b>Angiogene Faktoren</b>		
<b>HIF-1α</b>	<b>62</b>	<b>84,5</b>
<b>Nrp.-1</b>	<b>66</b>	<b>93</b>
<b>Nrp.-2</b>	<b>64</b>	<b>93,5</b>
<b>VEGF-A<sub>121</sub></b>	<b>60</b>	<b>88,5</b>
<b>VEGF-A<sub>165</sub></b>	<b>60</b>	<b>87</b>
<b>VEGF-A<sub>189</sub></b>	<b>60</b>	<b>87</b>
<b>VEGF-B<sub>167</sub></b>	<b>60</b>	<b>87</b>
<b>VEGF-B<sub>186</sub></b>	<b>60</b>	<b>87</b>

<b>Anti-angiogene Faktoren</b>		
<b>Vasohibin-1</b>	<b>62</b>	<b>91,5</b>
<b>Vasohibin-2</b>	<b>66</b>	<b>90,5</b>
<b>TSP-1</b>	<b>58</b>	<b>90</b>
<b>TSP-2</b>	<b>64</b>	<b>95</b>
<b>CD36</b>	<b>60</b>	<b>83</b>
<b>CD47</b>	<b>60</b>	<b>81,5</b>
<b>Lymphangiogene Faktoren</b>		
<b>VEGF-C</b>	<b>64</b>	<b>88</b>
<b>VEGF-D</b>	<b>66</b>	<b>87</b>
<b>VEGF-R3</b>	<b>68</b>	<b>92</b>
<b>PDGF-A</b>	<b>60</b>	<b>93</b>
<b>PDGF-R<math>\alpha</math></b>	<b>60</b>	<b>91</b>
<b>PDGF-R<math>\beta</math></b>	<b>68</b>	<b>89</b>
<b>Podoplanin</b>	<b>64</b>	<b>90</b>
<b>Prox-1</b>	<b>62</b>	<b>89</b>

Tab.14: PCR-produktspezifische Angaben zu Annealing-Temperatur und Schmelzpunkt der untersuchten Faktoren

Die PCR mit dem Rotor-Gene hat gegenüber der Block-PCR eine Reihe von Vorteilen: Als erstes ist, wie beschrieben, eine „real-time“ Beobachtung der Amplifizierung möglich und weiterhin die quantitative Messung der individuellen Zyklenzahl der untersuchten Faktoren. Durch die Verwendung von Materialien mit geringer Wärmekapazität können im Rotor-Gene Aufheiz- und Abkühlraten von bis zu 20°C pro Sekunde erreicht werden. Durch einen Ventilator wird die Temperatur homogen im Gerät und damit gleichmäßig auf die Reaktionsgefäße verteilt. Hierdurch ist eine exaktere Amplifikation des gewünschten Produktes möglich. Außerdem können durch das geringe Reaktionsvolumen von 10 µl und das effektive Heiz- und Kühlsystem die Elongationszeiten so kurz gehalten werden, dass lange PCR-Produkte, wie sie bei Vorhandensein von genomischer DNA entstehen können, gar nicht erst amplifiziert werden. Zudem ist der Zeitaufwand wesentlich geringer. Die Möglichkeit von methodischen Fehlern wird durch weniger Zwischenschritte von der cDNA

bis zu den Rohdaten geringer. Durch die sehr sensitive Methode können auch sehr geringe Mengen von DNA amplifiziert und somit auch sehr kleine Unterschiede festgestellt werden. Um sicher zu gehen, dass die Unterschiede bei den Crossing Points auch wirklich durch unterschiedliche Mengen an RNA in den Proben zustande kommen und nicht andere Faktoren die Differenzen zwischen den Proben bewirken, wird ein so genanntes Housekeeping-Gen (HKG) als Referenz-Gen verwendet.

Für etablierte Primerpaare genügt die Identifizierung des PCR-Produktes anhand des charakteristischen Schmelzpunktes und der spezifischen Produktlänge im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel (vgl. 3.14.2). Dabei sollte die Schmelzkurve keine unspezifischen Produkte aufweisen und auf dem Gelbild nur eine spezifische Bande sichtbar sein.

### 3.16 Housekeeping Gene

HKG sind Gene, von denen angenommen wird, dass sie in den verschiedenen Geweben nicht reguliert sind, z.B. 18s, welches in der Nukleinsäuren-Synthese involviert ist oder GAPDH, welches in der Glykolyse eine Rolle spielt und eben Histon, um das in jeder Zelle die DNA gewunden ist. Die mRNA-Expression von Histon zeigte nach diesen Daten keine signifikante Regulierung in den verschiedenen Geweben des Ovars und Entwicklungsstadien der Follikel. Deshalb wurde Histon als Referenz-Gen ausgewählt und alle Daten der Proben-Gene gegen Histon normalisiert.

Der normalisierte cp-Wert wird als  $\Delta cp$  bezeichnet. Die Formel für die Normalisierung lautet folgend:

$$\Delta cp = cp_Z \times - cp_{\text{Histon}} \times$$

$\Delta cp$  = normalisierter Crossing Point

$cp_Z \times$  = Crossing Point des Zielgens der Probe  $\times$

$cp_{\text{Histon}} \times$  = Crossing Point von Histon der Probe  $\times$

Um die Unterschiede der mRNA Expression zwischen den einzelnen Gruppen für den jeweilig untersuchten Faktor in Zahlen zu fassen, wurde der Mittelwert der  $\Delta cp$  für jede Gruppe ermittelt. Da das PCR-Produkt idealerweise in jedem Zyklus verdoppelt wird, ergibt sich ein  $2^n$ -facher Unterschied in der Menge der exprimierten mRNA, „n“ ist dabei die Differenz zwischen den Mittelwert der  $\Delta cp$  Werte. Damit die Stärke der mRNA Expression an den Graphen schnell ablesbar ist, wurden die Werte als  $40^{-\Delta cp}$  bzw. bei Histon als  $40^{-cp}$  dargestellt.

Housekeeping-Gene (HKG) sind Gene, die permanent auf dem gleichen Level exprimiert werden (sollen), um die Zellfunktionen aufrecht zu erhalten und das Überleben der Zelle zu sichern. Es wird angenommen, dass die mRNA von HKG im Überschuss exprimiert wird, so dass die Zellen in der Lage sind ineffektive post-transkriptionale Prozesse, oder solche rund um die Translation, zu kompensieren (Warrington et al., 2000). Es hat sich bei der quantitativen Messung von Genexpression im Laufe der Zeit durchgesetzt, dass die Ergebnisse normalerweise zu einer internen Kontrolle in Bezug gesetzt werden. Damit sollen Schwankungen bei der eingesetzten mRNA-Menge oder –Qualität ausgeglichen werden, die durch Diskrepanzen bei der Effizienz der mRNA-Extraktion auftreten können, oder durch die Tatsache dass die mRNA von verschiedenen Individuen gewonnen wird. Durch das Ausschließen von unspezifischen Veränderungen soll Interpretationsfehlern vorgebeugt werden. Im Idealfall sollen die experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression der HKG haben (Bustin, 2000). Es besteht allgemeine Übereinstimmung, dass ein HKG als Kontroll-Gen genügt, um die Expression der gewonnenen Daten zu normalisieren. Histon ist ubiquitär in jeder Zelle im Zellkern vorhanden und wird deshalb allgemein als Housekeeper anerkannt.

Histone sind Proteine, die im Zellkern von Eukaryoten vorkommen. Sie sind als Bestandteil des Chromatins für die Verpackung der DNA, aber auch für die Expression mancher auf ihr codierten Gene von essentieller Bedeutung. Um das große Genom der Eukaryoten im Zellkern unterbringen zu können, ist es nötig, die DNA besonders zu verpacken. Bei Eukaryoten geschieht dies in Chromosomen, deren kleinste Verpackungseinheit ein Nukleosom ist. Ein Nukleosom besteht aus acht Histonen, aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Die DNA ist 1,65x um ein Nukleosom gewickelt, was einer DNA-Länge von 146 Basenpaaren entspricht. Die nicht assoziierte DNA, die benachbarte Nukleosomen verbindet, wird "Linker DNA" genannt. Das Histon H1 bindet DNA direkt neben Nukleosomen und erlaubt die nächst höhere Verpackungseinheit der DNA. Histone bestehen aus einem globulären Zentrum und flexiblen endständigen Armen, die viele basische Aminosäuren besitzen. Die DNA ist hingegen negativ geladen, so dass eine elektrostatische Anziehung besteht. Die Histon-Proteine wurden 1884 vom deutschen Mediziner und Physiologen Albrecht Kossel entdeckt. Bis in die frühen 90er Jahre wurden Histone als reines Packmaterial nuklearer DNA verkannt. Erst in den letzten beiden Jahrzehnten konnte ihre Bedeutung für epigenetischen Mechanismen beschrieben werden.

### 3.17 Protein-Extraktion

Die Aufbereitung von Gewebe für Protein-Analysen erfolgt auf Eis (+4°C). Dabei werden 0,1 g Gewebe in 1 ml Gewebepuffer (PBS mit Proteasehemmer) gegeben und in FastPrep Tubes 40 Sek lang geschreddert. Anschließend lässt man das Homogenisat 30 Min lang ruhen und zentrifugiert es danach 15 Min bei 4°C und 10000 U/Min. Daraufhin wurde der überstand vorsichtig in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und sofort bei -20°C eingefroren.

### 3.18 Enzymimmuntest (EIA)

Die Abb. 24 stellt den Ablauf eines EIA dar. Auf diese Art wurde auch die FF in Kapitel 3.9.3 auf ihre Hormonkonzentrationen (E2 und P4) hin untersucht.

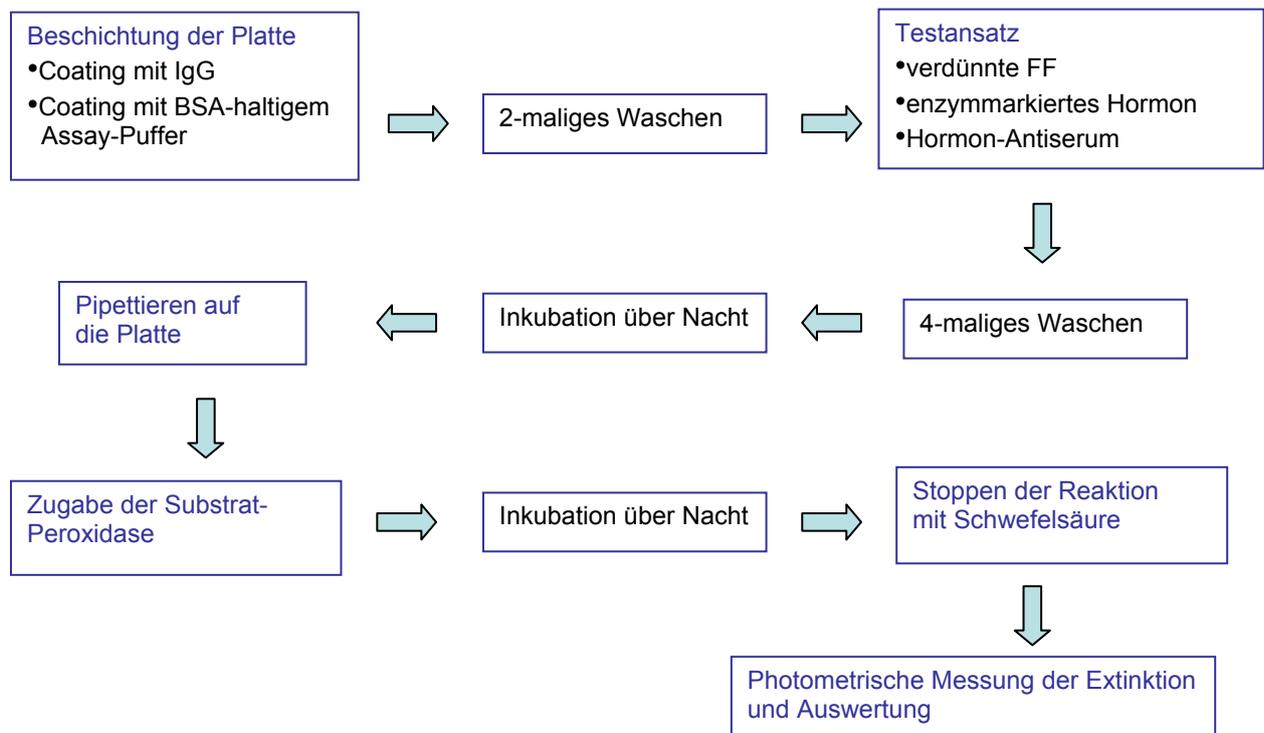


Abb.24: Prinzipielle Durchführung des Enzymimmunassays

### 3.18.1 Oestradiol-17 $\beta$ (E2) und Progesteron (P4) in der Follikelflüssigkeit (FF)

Die gewonnene FF wurde bis zur Hormonbestimmung bei -20°C aufbewahrt. Da die untersuchten Steroide in sehr hohen Konzentrationen vorkommen, war teilweise eine bis zu 1000-fache Verdünnung der Proben mit Assay-Puffer nötig, um den Messbereich nicht zu überschreiten. Es wurden E2 und P4 analysiert.

Dazu wurden die gefrorenen FF in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Um die E2- und P4-Konzentrationen zu messen wurde die sog. Doppelantikörper-Technik verwendet. (Prakash et al., 1987; Meyer et al., 1990; Meyer et al., 1989).

Beschichtung der Mikrotiterplatten:

Als erstes wurden die Mikrotiterplatten mit Schaf-Anti-Kaninchen-IgG beschichtet (100  $\mu$ l pro Well/Vertiefung), das in Coating-Puffer gelöst wurde (1  $\mu$ g IgG /100  $\mu$ l), gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 1°C. Nach der Inkubation wurde der Coating-Puffer abgekippt und 250  $\mu$ l eines BSA-enhaltenden Assay-Puffers wurde in die Wells gegeben. BSA soll unspezifische Bindungsstellen an den Oberflächen der Wells abblocken. Die Platten wurden anschließend auf einen Schüttler gestellt und für 15-30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der Puffer abgekippt wurde, wurden die Platten zweimal mit Tween-80 0,05 % gewaschen und gut ausgeklopft.

Testprozedur:

Für jede Messung wurde eine Standardkurve erstellt, indem ein unmarkiertes P4 oder E2 verwendet wurde. (Die Konzentrationen für P4 reichten von 0,05 bis 25 ng/ml und für E2 von 0,1 bis 50 pg/50  $\mu$ l). Die Verdünnung erfolgte bei P4 mit 1:20000 horseradish peroxidase (HRP) gekennzeichnetem P4 und bei E2 1:12000 mit HRP-gekennzeichnetem E2 (Progesteron-6 $\beta$ -hydroxyhemisuccinat-HRP, Oestradiol-6-carboxy-methyl-oxim-HRP).

Kaninchen-Anti-P4 (Antikörper (AK) gegen Progesteron-7 $\alpha$ -Carboxyethylthioether-BSA) wurde 1:150000 und Kanninchen–Anti-E2 (AK gegen 6-Keto-17 $\beta$ -Oestradiol-6-Carboxymethyloxim-BSA) wurde 1:400000 verdünnt.

20  $\mu$ l der unverdünnten Probe oder des Standards wurden in jede Vertiefung (Well) pipettiert. Danach kamen 100  $\mu$ l mit dem HRP-gekennzeichneten P4 oder E2 und 100  $\mu$ l des sekundären AK (Anti-E2 oder Anti-P4) in jedes Well dazu. Das nicht markierte Protein der Probe und das des Standards entsprechend, konkurrieren mit dem Enzym-gekennzeichneten Protein um freie Bindungsstellen am sekundären AK. Um unspezifische Bindungen abschätzen zu können, wurde Assay-Puffer ohne Anti-P4 oder Anti-E2 anstelle

der Probe genommen. Die Mikrotiterplatten wurden dann wieder über Nacht bei 4°C, im Dunkeln und leicht schwankend, inkubiert. Am nächsten Morgen wurden sie ausgekippt und viermal mit je 400 µl Twenn-80 0,05% gewaschen. Um die Färbung zu starten wurden 11 ml von Substrat A und B zusammengemischt und davon dann je 150 µl pro Well auf die Platten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 40 Min bei 37°C im Dunkeln, wurde die Färbung mit 50 µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt.

### Analyse:

Die Extension der Färbung wurde bei 450 nm durch ein Photometer gemessen und mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms analysiert (SLT-Easy-Fit, SLT, Crailsheim). Je mehr die Proben an P4 oder E2 enthalten, umso niedriger ist die Extinktion. Die ED<sub>50</sub> lagen für P-4 bei 6 ng/ml und für E2 bei 3,5 pg/ml. Der „intra-assay“ Varianzkoeffizient betrug für P4 4-5% und 6-7 % für E2. Der „inter-assay“ Varianzkoeffizient lag für P4 bei 8-9 % und bei 9-10 % für E2.

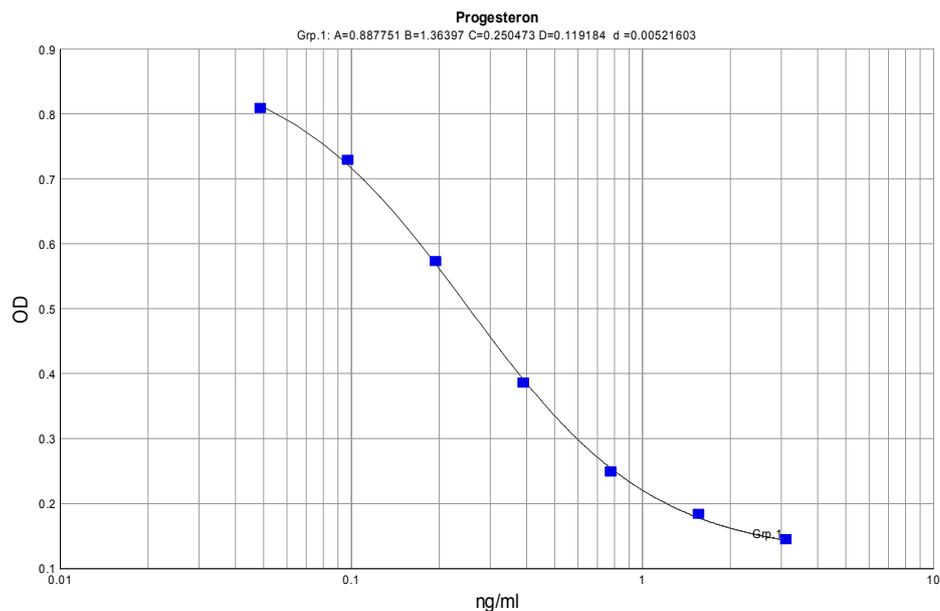


Abb.25: Standardkurve von Progesteron in ng/ml in der Follikelflüssigkeit der Follikelproben vom Schlachthof. OD = Optische Dichte

### 3.18.2 Kommerzielle ELISA-Kits (VEGF-C und VEGF-D)

Diese komplett gelieferten Tests von R&D Systems verwendeten die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Ein monoklonaler Antikörper (AK), spezifisch für VEGF-D oder VEGF-C war bereits auf die gelieferte Mikrotiterplatte beschichtet. Standard und Proben mussten in die Vertiefungen (Wells) der Platte pipetiert werden und jegliches vorhandene VEGF-C oder VEGF-D wurde von dem vorhandenen unbeweglichen (immobilized) AK gebunden. Nachdem sämtliche ungebundene Substanzen gewaschen wurden, wurde ein Enzym-gebundener polyklonaler AK spezifisch für VEGF-C oder VEGF-D in die Wells gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift um alle ungebundenen Enzym-gebundenen Reagenzien zu entfernen, wurde eine Substrat-Lösung zu den Wells gegeben und je nach Anteil der gebundenen VEGF-C –oder VEGF-D-Menge aus dem ersten Schritt, entwickelt sich Farbe. Die Farbentwicklung wurde dann gestoppt und die Farbe gemessen.

Im Kit enthalten waren: VEGF-C bzw VEGF-D Mikrotiterplatte, VEGF-C oder VEGF-D Conjugate (polyklonaler AK gegen VEGF-C oder VEGF-D, gebunden an Meerrettichperoxidase), VEGF-C oder VEGF-D Standard (rekombinantes VEGF-C oder VEGF-D in einem Puffer), Assay Diluent Puffer, Tierserum, Waschpuffer, Farbreagenz A und B, Stop-Lösung und Platten-Cover.

### 3.18.3 Kommerzielles DuoSet für ELISA (VEGF-R3)

Auch das DuoSet Kit enthielt die wesentlichen Komponenten, die für einen Sandwich-ELISA nötig sind.

Mitgeliefert wurden: Capture Antikörper (Maus-Anti-Human VEGF-R3), Detection Antikörper (biotinyliertes Maus-Anti-Human VEGF-R3), Standard (rekombinantes humanes VEGF-R3) und Streptavidin-HRP.

Außerdem benötigt waren: PBS, Waschpuffer, Reagenz-Lösung, Substrat-Lösung und Stop-Lösung.

Bei dem DuoSet musste die Plattenpreparation selbst vorgenommen werden. Die Vorgehensweise entspricht der allgemeinen unter 3.18 beschriebenen (Coaten, Waschen, Blocken, Waschen). Die anschließende Testprozedur erfolgt ebenfalls nach dem beschriebenen Prinzip.

### 3.19 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie können Proteine in Zellen von Gewebeschnitten sichtbar gemacht und damit lokalisiert werden. Ein spezifischer Antikörper (AK) gegen das gesuchte Protein wird auf den Gewebeschnitt gegeben. Danach wird ein zweiter Antikörper hinzugefügt, der den Spezies-spezifischen Teil des vorher verwendeten AK erkennt und an ihn bindet. Außerdem ist der zweite AK spezifisch markiert, so dass durch ihn der gebildete Komplex sichtbar gemacht werden kann. Hier wurden die Primären AK aus der Maus oder dem Kaninchen gewonnen und waren gegen bovine (HIF-1 $\alpha$ ) oder gegen humane Proteine (Podoplanin - mit boviner Kreuzreaktivität) gerichtet. Die Visualisierung wurde dann über einen Anti-Mouse-, bzw. Anti-Rabbit-AK erreicht, der mit horse radish peroxidase konjugiert war.

#### 3.19.1 Nachweis für HIF-1 $\alpha$ an Gefrierschnitten von CL

Es wurden Gewebeschnitte von CL der Stadien Tag 1-2, 3-4, 5-7, 8-10, 10-12, 13-16 und >18 erstellt und auf ihren HIF-1 $\alpha$ -Gehalt hin untersucht. Dazu wurden Gewebeproben in Tissue-Tek gebettet und in einem Cryotom in 6 $\mu$  dicke Scheiben geschnitten, die sofort auf vorher mit je 7 $\mu$ l Poly-L-Lysine beschichteten Objektträgern fixiert wurden. Nachdem die Schnitte 10 Min bei Raumtemperatur getrocknet waren, wurden sie für 15 Min in eine 3,7 %ige Formaldehydlösung, gelöst in 7,4%iger PBS-Tween-Lösung (PBS-T), gegeben. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS-T für je 5 Min. Um endogene Peroxidasen zu blocken wurden die Schnitte dann für 30 Min in 1%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (wiederum gelöst in PBS-T) inkubiert. Es folgte wieder dreimaliges Waschen für je 5 Min mit PBS-T. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 Min in 1%iges Ziegen Serum (1:10 verdünnt in PBS-T) gegeben, um eventuelle Hintergrundsignale zu reduzieren. Danach wird der primäre Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  (gelöst in PBS-T) auf die Gewebe gegeben und zwar jeweils 120 $\mu$ l in den Verdünnungen 1:2000 oder 1:5000 pro Objektträger mit je 2 Schnitten des gleichen CLs – und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zudem wurden Negativkontrollen für den primären AK erstellt, bei dem anstatt des beschriebenen Vorgehens kein AK auf den Schnitt aufgebracht wurde, sondern weiterhin das Ziegen Serum auf dem Schnitt belassen wurde. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 x 5 Min mit PBS-T gewaschen und anschließend der sekundäre AK (hier ein Anti-Mouse HRP, gelöst in PBS-T) in einer Verdünnung von 1:200 für 45 Min, bei Raumtemperatur, auf die Schnitte gegeben – auch auf die Negativkontrollen.

Nachdem die Gewebe wiederum nach der vorherigen Art und Weise gewaschen wurden, erfolgte die Visualisierung der Peroxidase mit DAB. Dabei werden die Schnitte mit 0,01%

DAB und 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS für 15 Min im Dunkeln inkubiert. Es folgt wieder dreimaliges Waschen für 5 Min in PBS-T und ein kurzes Eintauchen in A. bidest, bevor Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer erfolgte. Hier wurden die Gewebe 10 -15s in Hämalaun gefärbt und dann 30 - 45s in Leitungswasser gebläut. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und zwar für je 10s in 50-100% EtOH, 2 Min in 100% EtOH und 2 Min in Xylol (Rotihistol). Abschließend wurden die Schnitte fixiert, indem ein Tropfen Eukitt auf jeden Objektträger gegeben, sowie ein Deckglas aufgebracht wurde und sie dann beschwert trockneten.

### 3.19.2 Nachweis für VEGF-R3 an Gefrierschnitten von CL

Der Antikörper gegen VEGF-R3 war eigentlich der, der bei dem EIA verwendet wurde und der auf seine Tauglichkeit für die Immunhistochemie hin untersucht werden sollte.

### 3.19.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin = H.E. : Hämatoxylin (Hämalaun) ist ein (bei niedrigem pH) positiv geladener Farbstoff und färbt daher negativ geladene („basophile“) Gewebebestandteile blau, vor allem Nukleinsäuren, aber auch saure Proteoglykane. Eosin: negativ geladener Farbstoff, färbt Proteine des Zytoplasmas hellrot („Acidophilie“).

#### *Färbung der Gefrierschnitte:*

Die Objektträger werden für 3 Min in Aqua bidest gebracht und anschließend 2-3 Min in Hämalaun inkubiert (1.Färbung). Es folgte eine 1-2 minütige Bläuung unter fließendem Leitungswasser (alkalisch). Danach erfolgt die 2.Färbung in 1% Eosin (in Aqua bidest.) für 7 Min. Anschließend wurden die Schnitte jeweils nacheinander jeweils kurz in EtOH 90%, EtOH 100%, Rotihistol/EtOH je 50% und Rotihistol eingetaucht. Abschließend wurden die Proben mit EUKITT eingedeckelt.

## **3.20 Datenverarbeitung**

Die statistische Auswertung der Rohdaten des EIA und der normalisierten Daten der qRT-PCR erfolgte mit der Sigma-Stat Statistiksoftware Version 3.0 für Windows (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA). Signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) zwischen den Gruppen wurden mittels ONE WAY ANOVA mit anschließendem Holm-Sidak-Test berechnet. Alle Datenangaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden mit Hilfe von Säulendiagrammen oder anhand immunhistologischer Bilder dargestellt. Wenn Unterschiede im Text als statistisch signifikant bezeichnet werden, liegen dem immer p-Werte mit  $p < 0,05$  zugrunde.

Damit auf den ersten Blick erkennbar ist, um welches Gewebe und welche Messung es sich handelt, sind die Säulen unterschiedlich farbig ausgefüllt:

- : Expression der mRNA im CL des Zyklus und der Gravidität
- : Expression der mRNA im CL während der induzierten Luteolyse
- : Expression der mRNA in den GC
- : Expression der mRNA in der TI
- : Proteinkonzentration im CL des Zyklus und der Gravidität

### 4.1 Housekeeping-Gen

Für die Normalisierung der Expressionsdaten aus der qRT-PCR wurde die mRNA Expression des Housekeeping-Gens Histon herangezogen. Die Crossing Points (cp) der einzelnen Proben und Gruppen zeigen zwar geringfügige Schwankungen, sind jedoch nicht statistisch signifikant reguliert. Dies gilt sowohl für die Messungen der CL während Zyklus, Gravidität und induzierter Luteolyse, als auch für die der GC und TI von Follikeln unterschiedlicher Entwicklungsstadien während des Follikelwachstums.

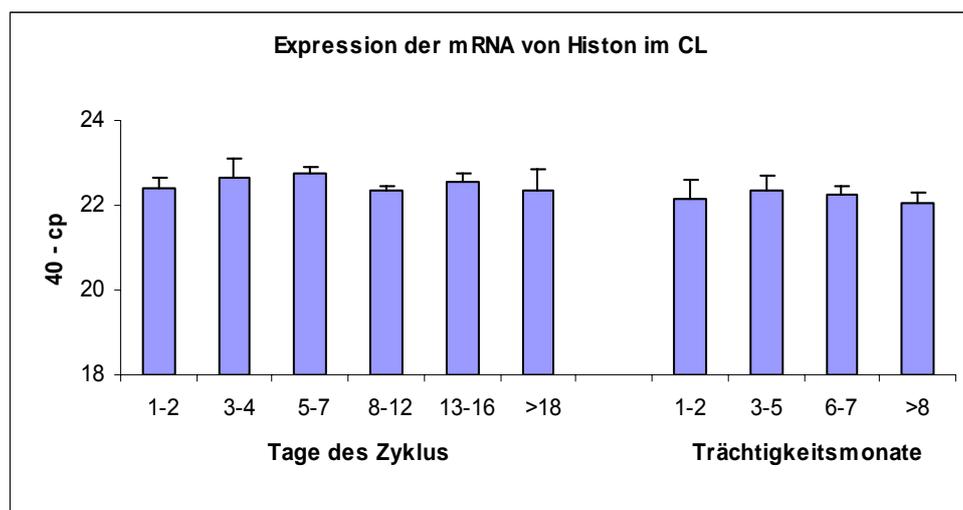


Abb.26: Expression der mRNA von Histon im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als  $40 - \text{Mittelwert der cp} \pm \text{SEM}$  ( $n=6-7$ ) dargestellt.

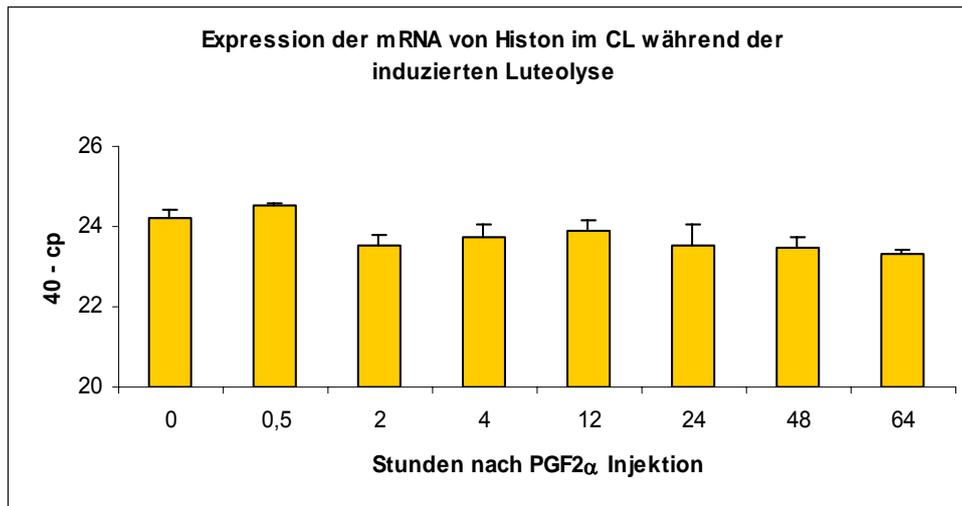


Abb.27: Expression der mRNA von Histon im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF<sub>2</sub> $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt.

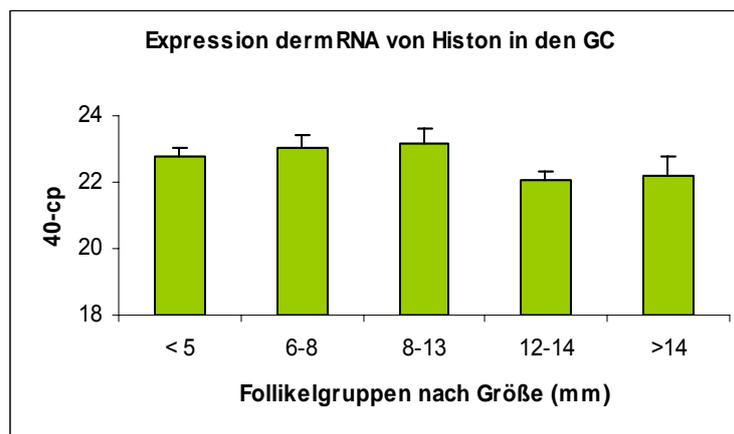


Abb.28: Expression der mRNA von Histon in den Granulosazellen (GC) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelwachstums. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der cp  $\pm$  SEM (n=7-12) dargestellt. Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

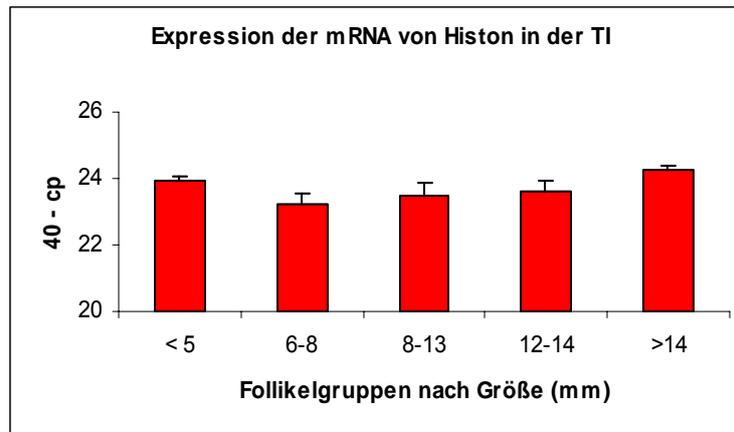


Abb.29: Expression der mRNA von Histon in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der cp  $\pm$  SEM (n=7-12) dargestellt. Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5 - 5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

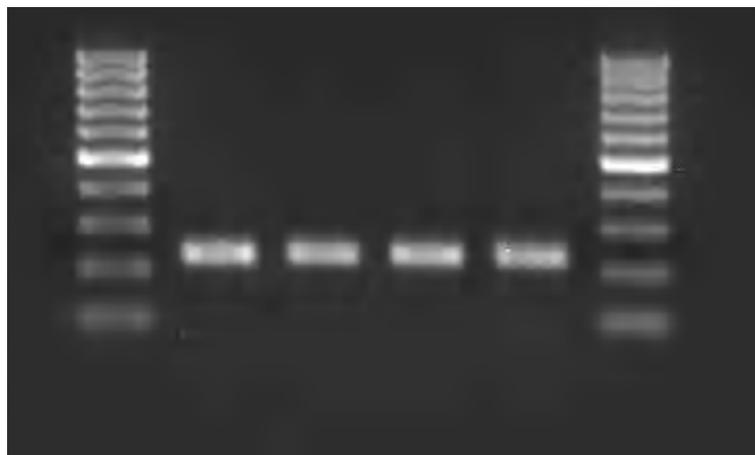


Abb.30: Agarosegelbild von Histon. CL-Luteolys-Mix: 0,5h, 2h, 4h, und 12h nach PGF $2\alpha$ . Nach Rotorgene-Lauf bei 60°C. Produktlänge 232 bp.

## 4.2 Angiogene Faktoren

### 4.2.1 VEGF-A, VEGF-B und ihre Isoformen

Die VEGF-A und VEGF-B Isoformen im CL während des Zyklus und der Gravidität:

*VEGF-A:*

Die Ergebnisse der VEGF-A Isoformen im CL während des Zyklus und der Gravidität sind in Abb.31 dargestellt.

Zu Beginn des Zyklus haben der Expressionsspiegel von VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub> etwa die gleiche Höhe wie während der Gravidität. Die Expression von VEGF-A<sub>189</sub> ist am Tag 1-2 ein wenig schwächer. Im Verlauf des Zyklus fallen alle drei Isoformen von VEGF-A nach den Zyklustagen 8-12 signifikant ab, um zur Regression hin noch weiter signifikant herabreguliert zu werden. Nur bei VEGF-A<sub>189</sub> fällt die Expression vom Zyklusbeginn bis zu den Tagen 5-7 ab, wird dann aber wieder hochreguliert, um sich danach so wie die anderen VEGF-A Isoformen zu verhalten.

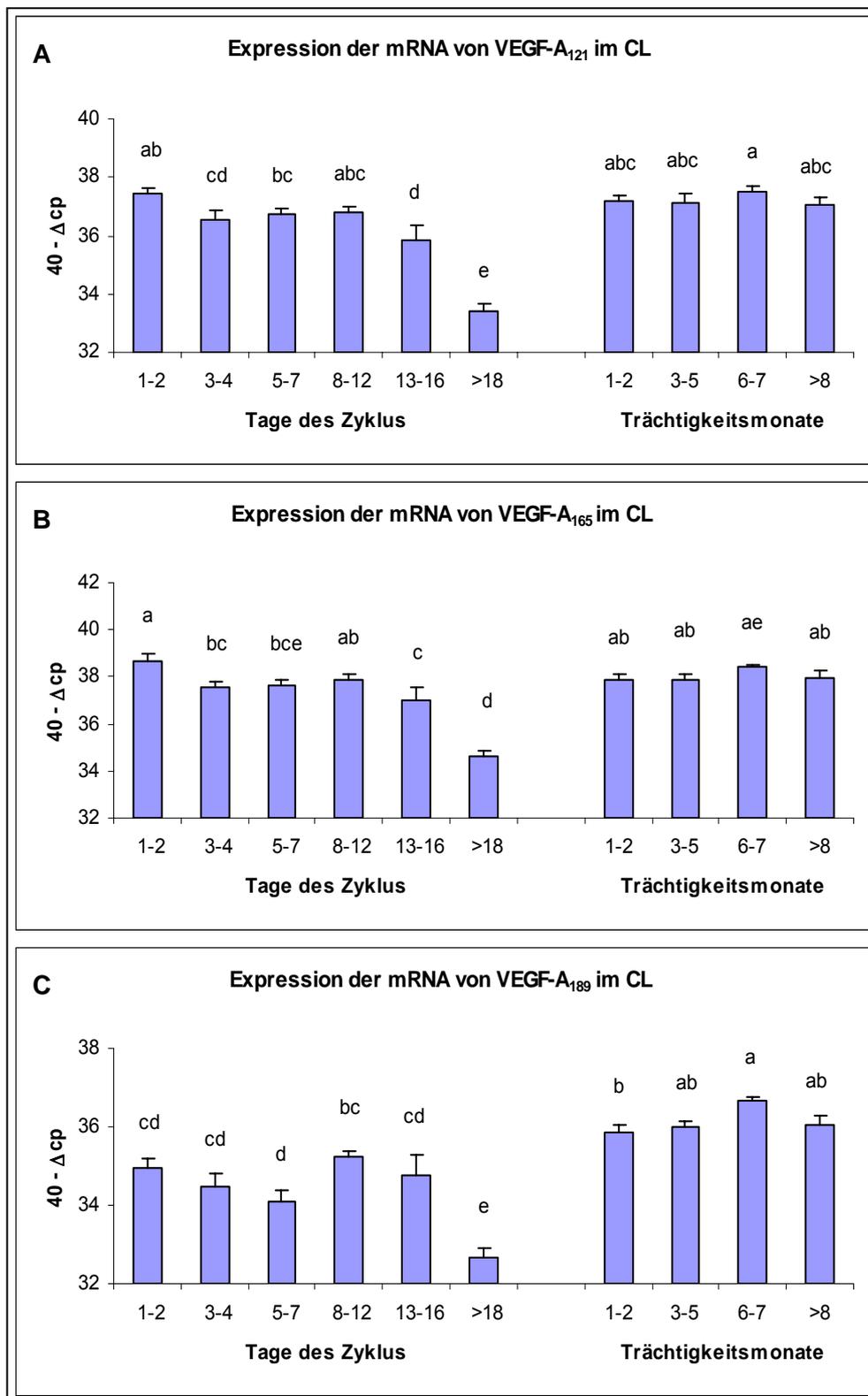


Abb.31: Expression der mRNA von **(A)** VEGF-A<sub>121</sub>, **(B)** VEGF-A<sub>165</sub> und **(C)** VEGF-A<sub>189</sub> im CL. während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der Δcp ± SEM (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

**VEGF-B:**

Auch die Isoformen von VEGF-B beginnen etwa in der Höhe, die sich auch während der Gravidität messen lässt. Beide Formen zeigen das gleiche Regulationsverhalten während des Zyklus und zwar einen steten Abfall bis zu den Tagen 8-12, einen weiteren signifikanten Abfall während der Tage 13-16 und dann eine erneute drastische Aufregulierung während der Regression. In diesem Punkt unterscheiden sich die Isoformen von VEGF-A und B deutlich.

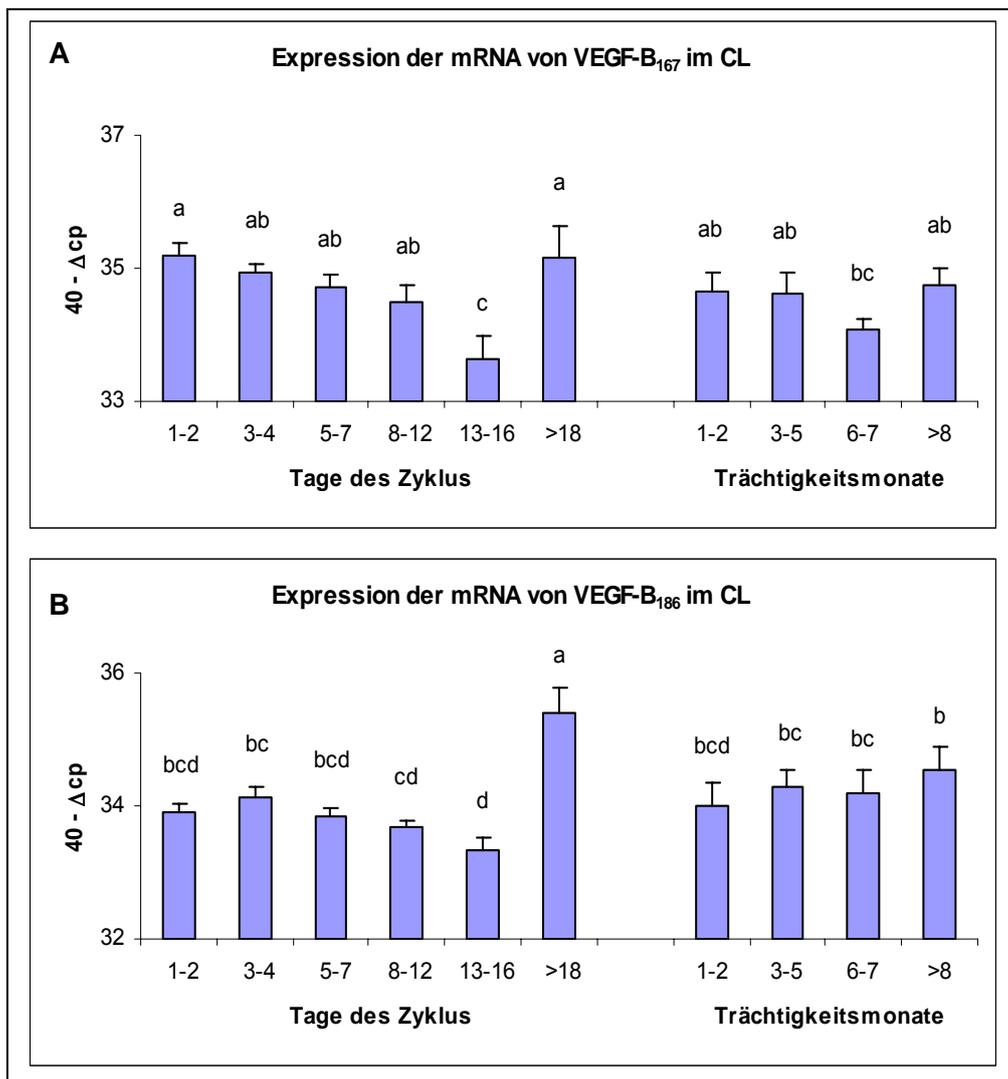


Abb.32: Expression der mRNA von **(A)** VEGF-B<sub>167</sub> und **(B)** VEGF-B<sub>189</sub> im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der Δcp ± SEM (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

### Die VEGF-A und VEGF-B Isoformen im CL während der induzierten Luteolyse:

#### *VEGF-A:*

Alle drei Isoformen von VEGF-A verhalten sich auch während der induzierten Luteolyse vergleichbar. VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub> sind bis 2 h nach der PGF<sub>2</sub> $\alpha$  Injektion hochreguliert und fallen dann zu den Zeitpunkten 4 h, 12 h und 24 h nach Injektion dreimal signifikant ab. Nur bei VEGF-A<sub>189</sub> bleibt der Expressionsspiegel bis 4 h nach Auslösung der Luteolyse oben, fällt dann aber in ähnlicher Weise wie VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub> ab.

In den Trächtigkeitsmonaten >8 kann für alle drei Faktoren ein leichter, jedoch nicht statistisch signifikanter Wiederanstieg beobachtet werden.

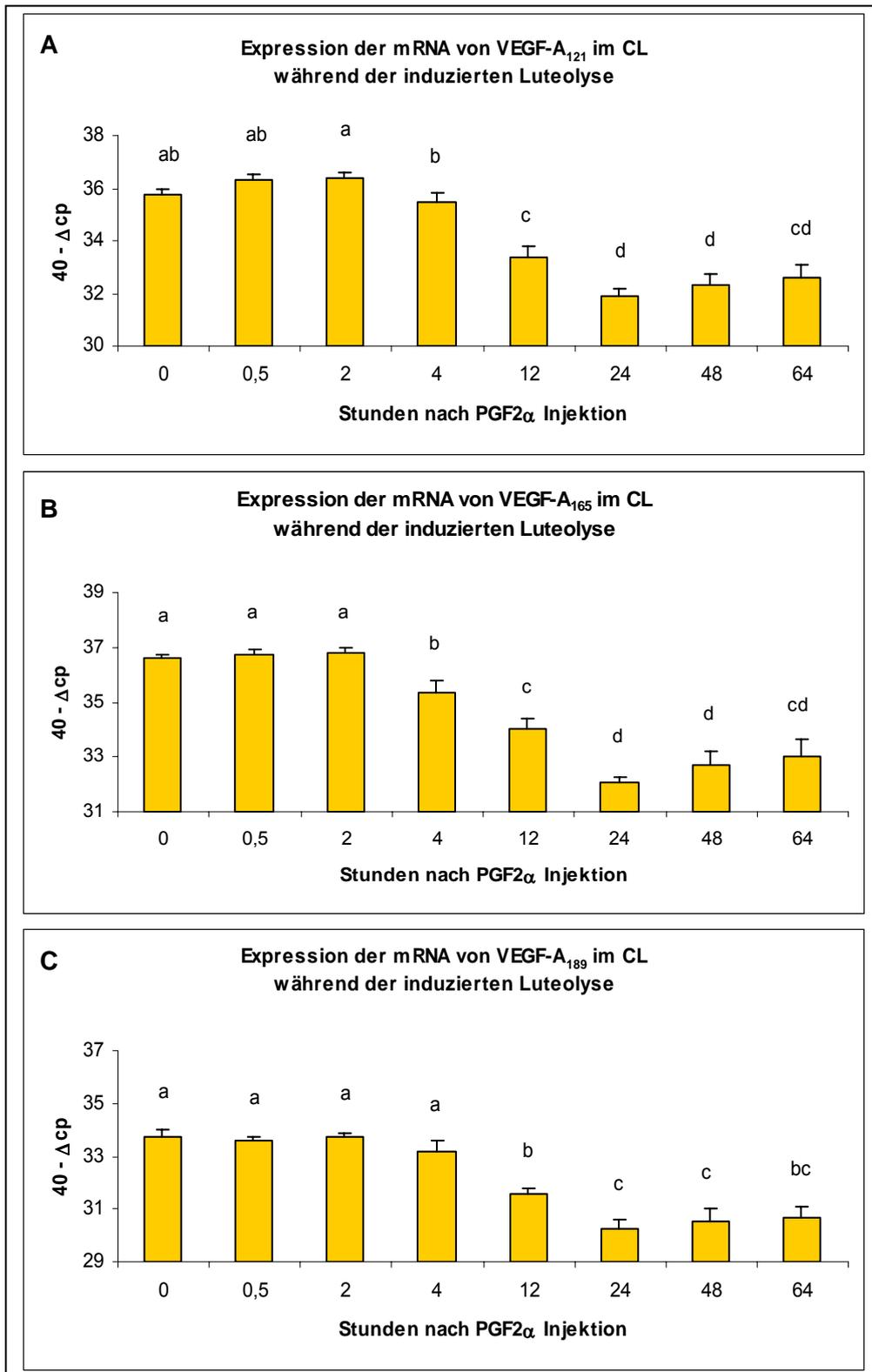


Abb.33: Expression der mRNA von **(A)** VEGF-A<sub>121</sub>, **(B)** VEGF-A<sub>165</sub> und **(C)** VEGF-A<sub>189</sub> im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF2 $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

*VEGF-B:*

Die Faktoren VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub> verhalten sich während der induzierten Luteolyse anders als die VEGF-A Isoformen. Es ist kein Abfall nach 2 h oder 4 h zu beobachten. Der Expressionsspiegel bleibt konstant oben. Nach 48 h steigen die Werte noch weiter an, jedoch nur im Falle von VEGF-B<sub>186</sub> signifikant. VEGF-B<sub>167</sub> wird nicht statistisch relevant reguliert.

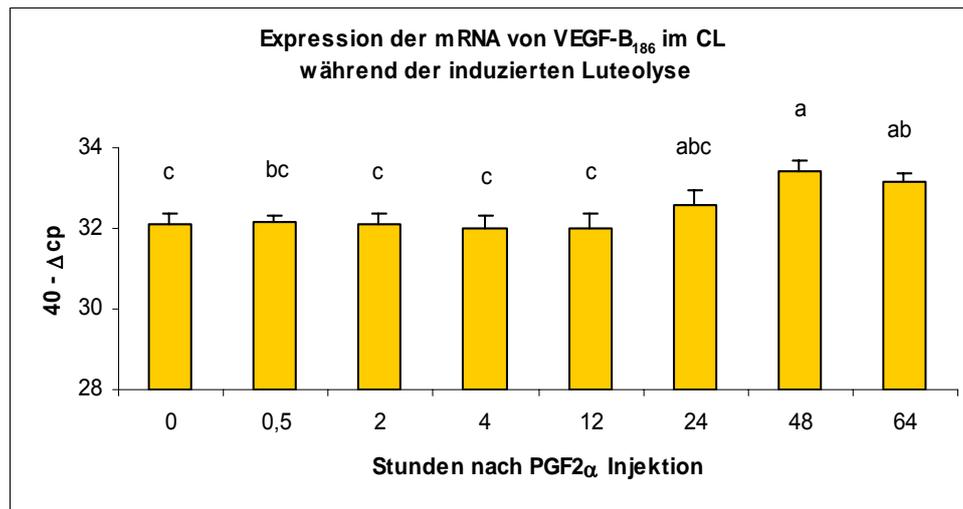


Abb.34: Expression der mRNA von VEGF-B<sub>186</sub> im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF2 $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

### Die VEGF-A und VEGF-B Isoformen in den GC

*VEGF-A:*

Alle drei Faktoren steigen mit der Größenzunahme der Follikel an. Eine signifikante Aufregulierung ist zu beobachten, wenn ein durchschnittlicher Follikeldurchmesser von 12-14 mm erreicht ist.

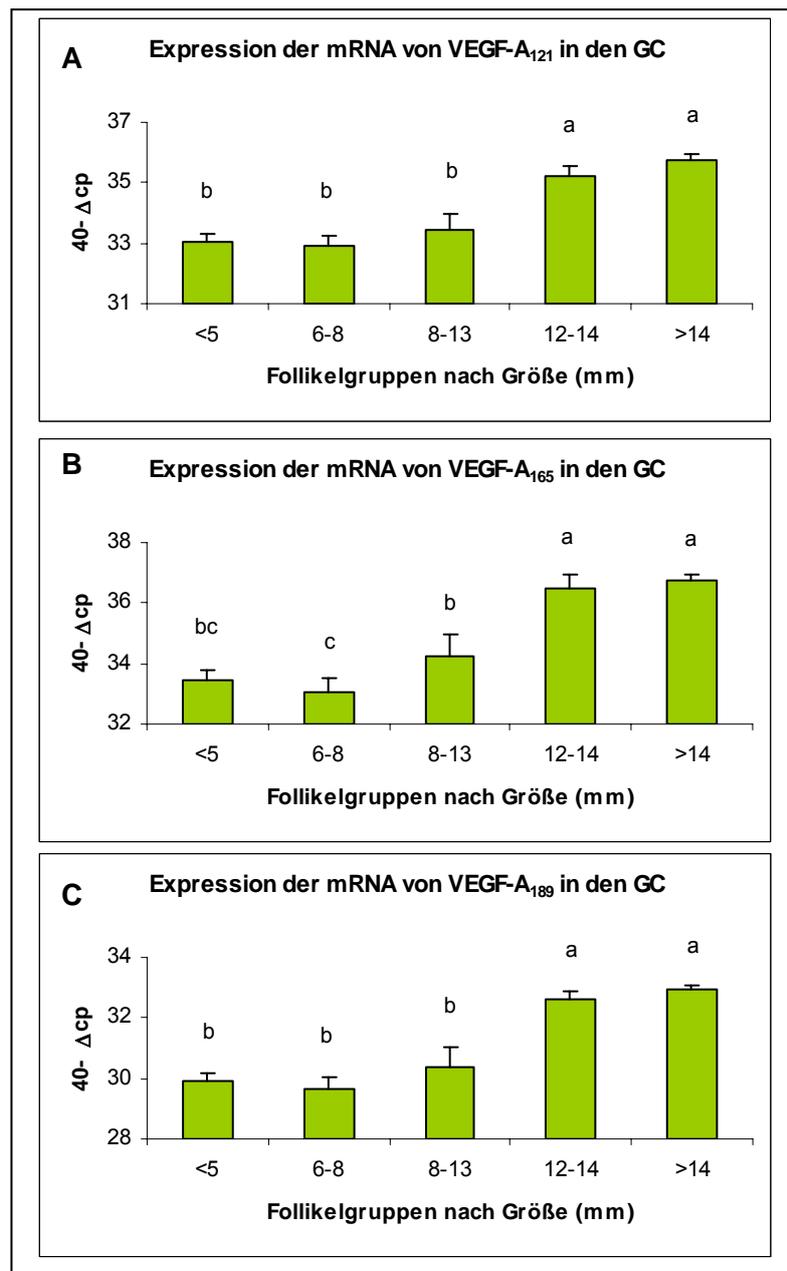


Abb.35: Expression der mRNA von **(A)** VEGF-A<sub>121</sub>, **(B)** VEGF-A<sub>165</sub> und **(C)** VEGF-A<sub>189</sub> in den Granulosazellen (GC) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5 - 5 ng/ml; 8-13 mm = 5 - 40 ng/ml; 12-14 mm = 40 - 180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

**VEGF-B:**

Bei den qPCR Läufen des Faktors VEGF-B<sub>167</sub> ergaben sich bei beiden Follikelgeweben Probleme bei der Messung. Obwohl exakt der gleiche Primer wie bei den CL verwendet wurde (wo eine einheitliche Schmelzkurve gebildet wurde) konnte die Isoform zwar nachgewiesen, aber aufgrund des nicht eindeutigen Produktes, nicht ausgewertet werden. Sämtliche Möglichkeiten der Primeroptimierung wurden erfolglos ausgeschöpft (nicht gezeigte Ergebnisse).

Das Expressionsverhalten von VEGF-B<sub>186</sub> zeigt ebenfalls eine Zunahme der Werte mit dem Größenwachstum der Follikel und wird mit dem Erreichen von 12-14 mm signifikant höher reguliert als bei den kleinsten untersuchten.

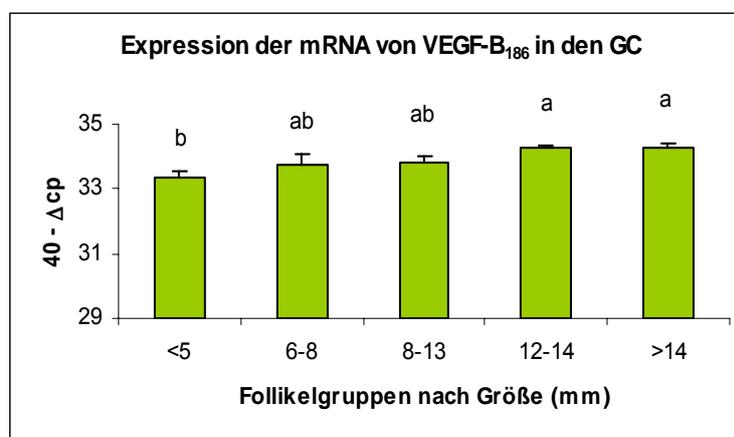


Abb.36: Expression der mRNA von VEGF<sub>186</sub> in den Granulosazellen (GC) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5 - 5 ng/ml; 8-13 mm = 5 - 40 ng/ml; 12-14 mm = 40 - 180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

Die VEGF-A und VEGF-B Isoformen in der TI:

**VEGF-A:**

Für die VEGF-A Isoformen in der TI sind die gemessenen mRNA-Werte untereinander nicht statistisch signifikant reguliert. Für VEGF-A<sub>121</sub> lässt sich jedoch ein Anstieg erkennen, der dem in den GC entspricht, nämlich eine Aufregulierung beim Erreichen von 12-14 mm Follikeldurchmesser (nicht gezeigte Ergebnisse).

**VEGF-B:**

Auch in der TI der Follikelproben konnte für VEGF-B<sub>167</sub> keine Auswertung erfolgen, da sich die qPCR-Läufe nicht zufrieden stellend optimieren ließen (nicht gezeigte Ergebnisse).

VEGF-B<sub>186</sub> zeigt in der TI eine konstante Expression von den Follikeln unter 5 mm Größe bis hin zu denen mit 12-14 mm Durchmesser. Danach fallen die Expressionswerte signifikant ab.

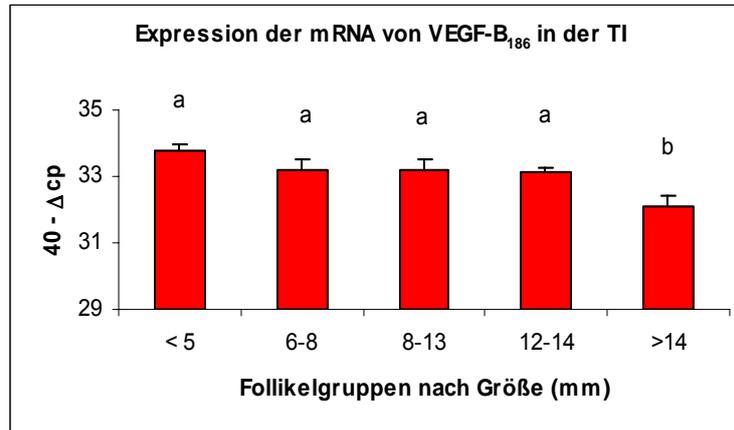


Abb.37: Expression der mRNA von VEGF-B<sub>186</sub> in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5 - 5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

#### 4.4.2 Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (Nrp.)

##### Nrp.-1 und Nrp.2 im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Die mRNA-Expression von Nrp.-1 im CL steigt, während der lutealen Phase, bis zu den Tagen 8-12 an und erreicht zu diesem Zeitpunkt ihren Expressionshöhepunkt. Danach lässt sich ein Abfall mit drastischer Verstärkung während der Regression beobachten. Die Expression des Faktors ist während der Trächtigkeit insgesamt sehr hoch reguliert und zeigt ganz zu Beginn der Gravidität sogar die höchsten Werte an.

Die Expressionsdaten von Nrp.-2 im CL während des Zyklus und der Gravidität zeigen im Vergleich zu Nrp.-1 keinen Abfall während der Regression. Im Gegenteil, am Ende der lutealen Phase sind die Werte, nach kleineren Schwankungen im Verlauf des Zyklus, hier am höchsten. Während der Trächtigkeit wird Nrp.-2 konstant exprimiert.

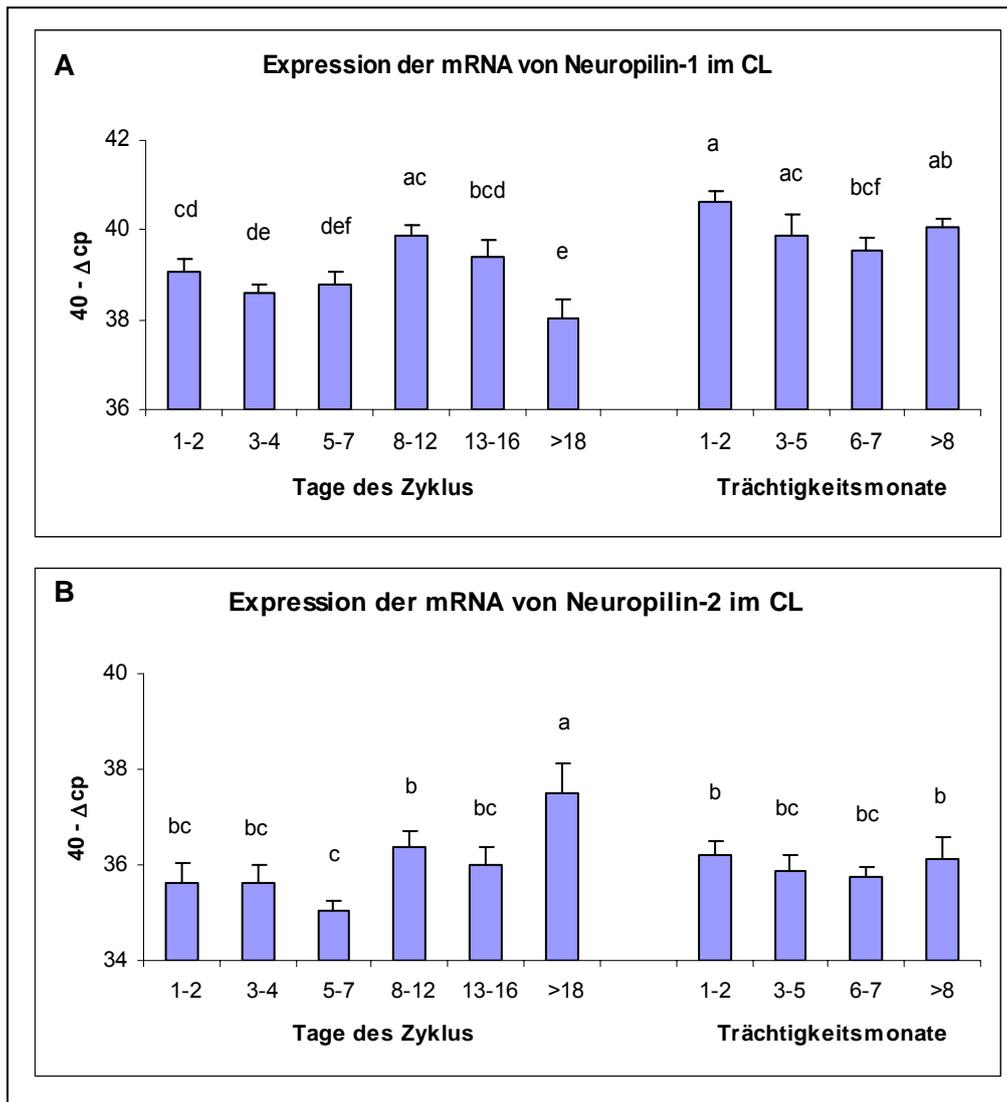


Abb.38: Expression der mRNA von **(A)** Neuropilin-1 und **(B)** Neuropilin-2 im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als  $40 - \Delta cp \pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Nrp.-1 und Nrp.2 im CL während der induzierten Luteolyse:

Während der funktionalen Luteolyse bleibt Nrp.-1 kontinuierlich hoch exprimiert. Erst nach 24 h fallen die Werte signifikant.

Die mRNA-Expression von Nrp.-2 während der induzierten Luteolyse ist nach 0,5 h kurzfristig aufreguliert. Nach 2 h lässt sich ein Abfall auf ein niedrigeres Niveau beobachten.

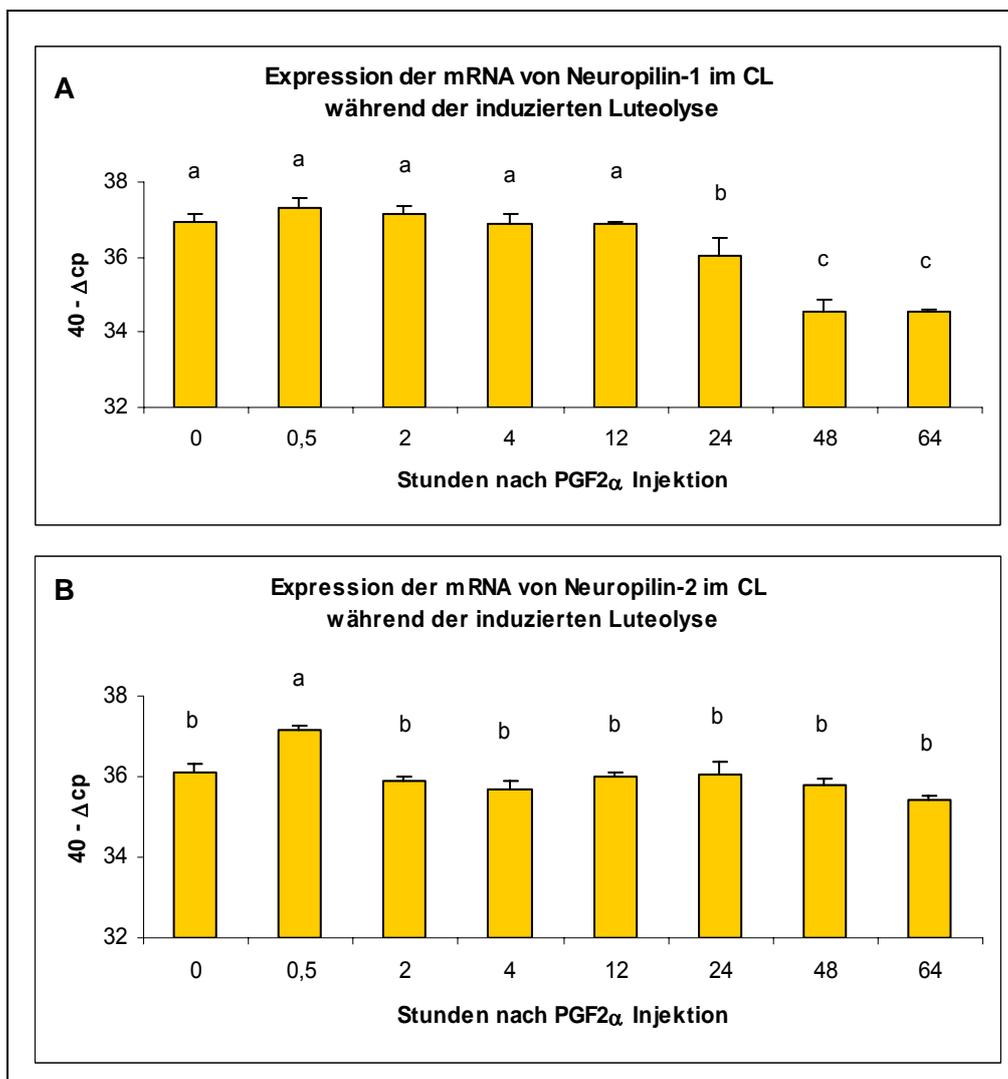


Abb.39: Expression der mRNA von **(A)** Neuropilin-1 und **(B)** Neuropilin-2 im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF2 $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Nrp.-1 und Nrp.2 in den GC:

Mit der Größe der Follikel nimmt auch die gemessene Menge an mRNA von Nrp.-1 in den GC zu und erreicht die höchste Expression bei einer Größe von über 12 mm.

Die Expressionsdaten von Nrp.-2 in den GC sind bis zu einer Follikelgröße von 8-13 mm hochreguliert, fallen jedoch mit der weiteren Größenzunahme signifikant ab.

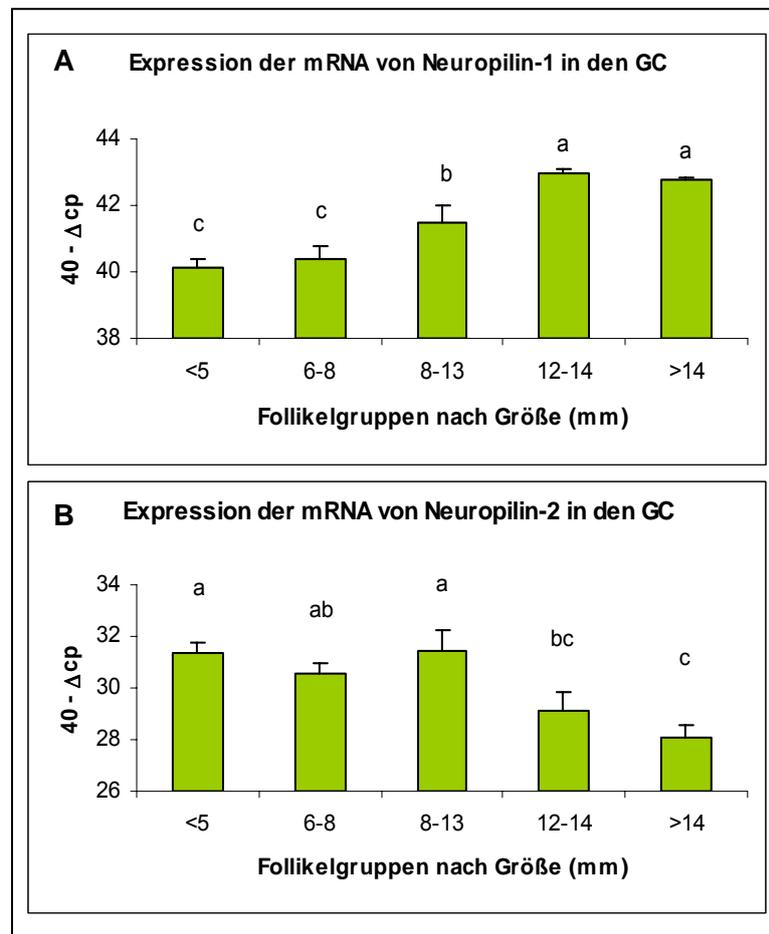


Abb.40: Expression der mRNA von **(A)** Neuropilin-1 und **(B)** Neuropilin-2 in den Granulosazellen (GC) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

Nrp.-1 und Nrp.-2 in der TI:

In der TI zeigen beide Faktoren das gleiche Expressionsverhalten. Bis zu einem Follikeldurchmesser von 12-14 mm sind die Werte auf etwa dem gleichen Niveau und fallen bei der weiteren Größenzunahme statistisch signifikant ab.

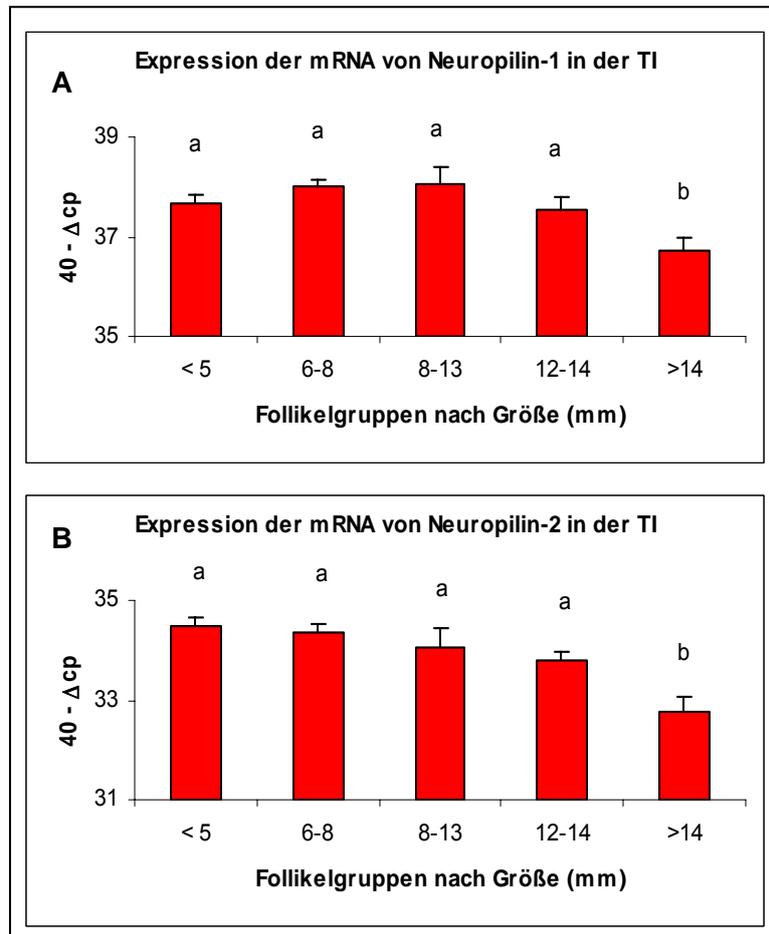


Abb.41: Expression der mRNA von **(A)** Neuropilin-1 und **(B)** Neuropilin-2 in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml; 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

### 4.2.3 Hypoxia-induzierter-Faktor (HIF-1 $\alpha$ )

#### HIF-1 $\alpha$ im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Für das CL-Gewebe wurde HIF-1 $\alpha$  sowohl auf seine mRNA-Expression, als auch auf der Proteinebene mittels Immunhistochemie, untersucht.

#### 4.2.3.1 Expression der mRNA

Der Faktor HIF-1 $\alpha$  schwankt am Anfang der lutealen Phase leicht, bleibt jedoch bis zu den Tagen 5-7 sehr viel höher reguliert als im weiteren Verlauf des Zyklus, wo ein erster drastischer Abfall an den Tagen 8-12 zu beobachten ist. Ein weiterer signifikanter Abfall erfolgt während der Regression. Die mRNA während der Trächtigkeit ist relativ niedrig exprimiert.

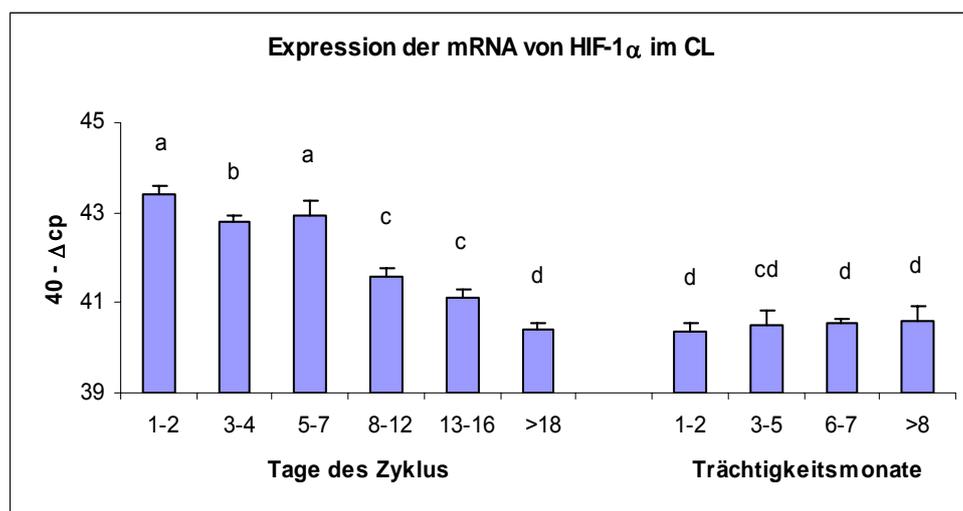


Abb.42: Expression der mRNA von HIF-1 $\alpha$  im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

#### HIF-1 $\alpha$ im CL während der induzierten Luteolyse:

Während der induzierten Luteolyse zeigt die mRNA Expression von HIF-1 $\alpha$  keine signifikanten Veränderungen (nicht gezeigte Ergebnisse).

HIF-1 $\alpha$  in den GC und der TI:

In den GC steigt mit dem Durchmesser der Follikel auch die gemessene Menge an mRNA von HIF-1 $\alpha$  an und zwar signifikant bei der Entwicklung der Follikel von 6-8 mm auf 8-13 mm Größe und dann noch einmal beim Erreichen von 12-14 mm.

Auch in der TI wird die mRNA von HIF-1 $\alpha$  signifikant aufreguliert, wenn die Follikel einen Durchmesser von 12-14 mm erlangt haben. Bei einer Größe von >14 mm sinkt die Expression wieder signifikant ab.

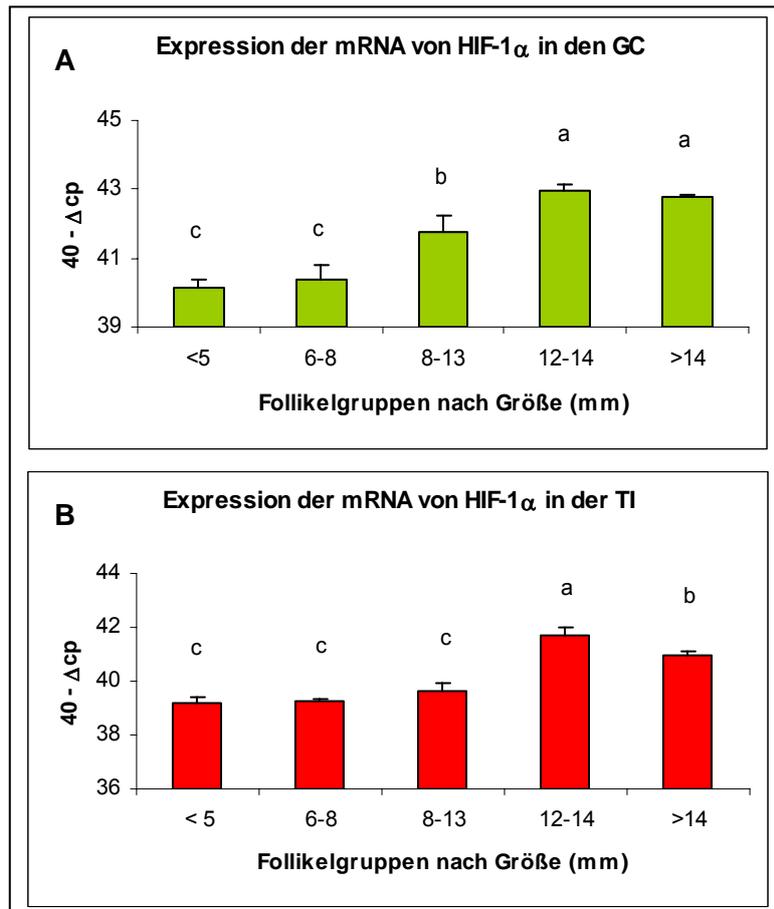


Abb.48: Expression der mRNA von HIF-1 $\alpha$  (**A**) in den Granulosazellen (GC) und (**B**) in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

#### 4.2.3.2 Proteinlokalisation (Immunhistochemie)

Um die Betrachtung der Gefrierschnitte im Folgenden zu erleichtern, wurde die Abb.43 eingefügt. Sie zeigt einen jungen CL kurz nach der Ovulation. Für die Proteinlokalisation von HIF-1 $\alpha$  wurden CL der Zyklustage 1-2 verwendet. Auf den Schnitten (Abb.44) sind die Hohlräume und Falten zu erkennen, die sich nach der Ovulation und dem Austritt der FF dadurch bilden, dass die ehemalige Follikelblase kollabiert.

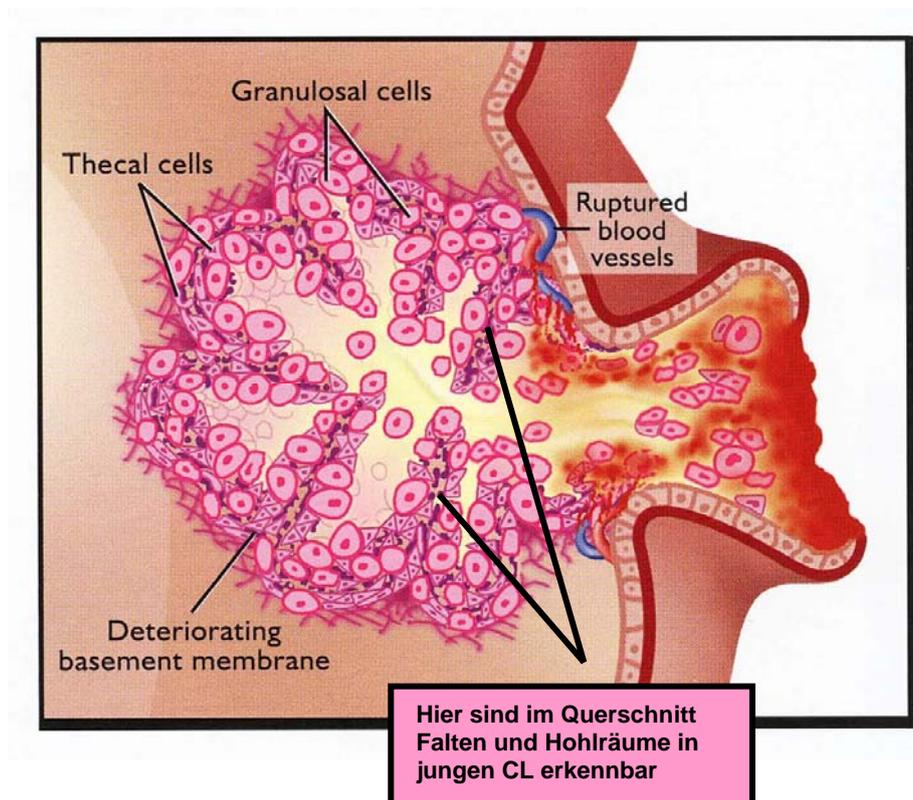


Abb.43: Kollabierte Follikelblase nach der Ovulation und Faltenbildung. Abgewandelt aus Senger (2003)

In der Abb.44 ist zu sehen, dass das HIF-1 $\alpha$  Protein in Zellen des bovinen CL des Zyklus nachgewiesen und lokalisiert werden konnte. Auf den ersten Blick fallen in den jungen CL (Tag 1-2) deutlich braun gefärbte Areale, umgeben von ungefärbten auf. Diese DAB-positiven (Visualisierung der Peroxidase durch DAB, vgl. 3.19.1) Bereiche liegen um die Hohlräume herum, die sich in den vor kurzem entstandenen CL erkennen lassen. Diese bilden sich, wenn nach dem Austritt der FF während der Ovulation, die vormals flüssigkeitsgefüllte Blase kollabiert. Es ist bekannt, dass aus den Gefäßen der TI Leukozyten in das neue CL einwandern, die ehemalige GC durchqueren und sich in der Nähe eines engen Hohlraumes zwischen zwei Falten ansammeln. Um diese These zu stützen wurde als nächstes eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnitten der gleichen CL vorgenommen.

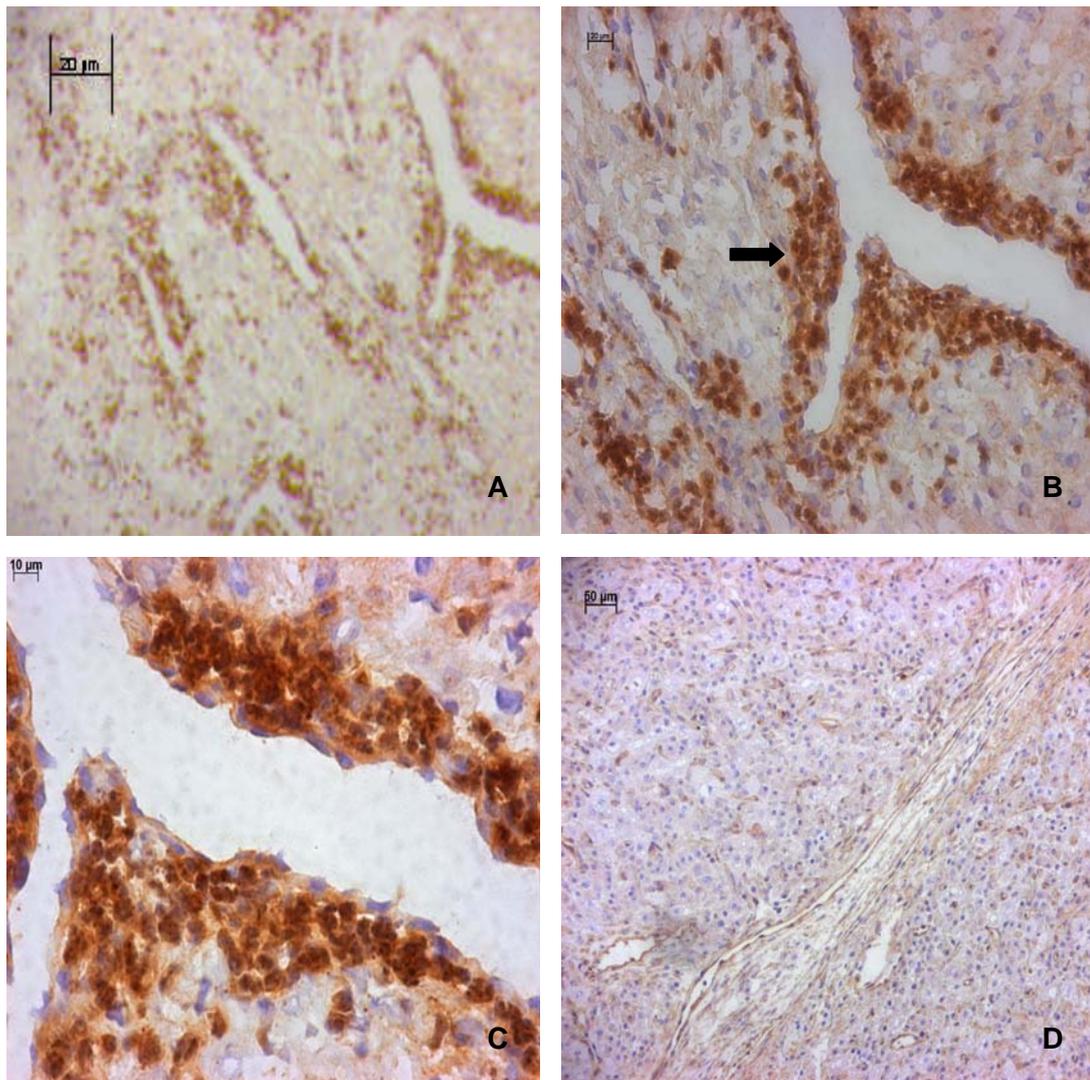


Abb.44 : Immunhistochemische Untersuchung von HIF-1 $\alpha$ . **(A)** CL Tag 1-2, 10x vergrößert **(B)** CL, Tag 1-2, 20x vergrößert **(C)** CL, Tag 1-2, 40x vergrößert. Verdünnung des HIF-1 $\alpha$ -AK je 1:2000. **(D)** CL Tag 5-7, 10x vergrößert

Ergebnisse der Hämalaun-Eosin-Färbung:

Bei den Zellen, die entlang der Falten in den jungen CL, bei der immunhistochemischen Untersuchung von HIF-1 $\alpha$ , stark angefärbt waren, handelt es sich nach persönlicher Diskussion mit Herrn Prof. Schams, um eosinophile Granulozyten. Durch die H.E.-Färbung werden, besonders deutlich in den 100x Vergrößerungen, die eosinophilen Granula im Zytoplasma der Immunzellen erkennbar.

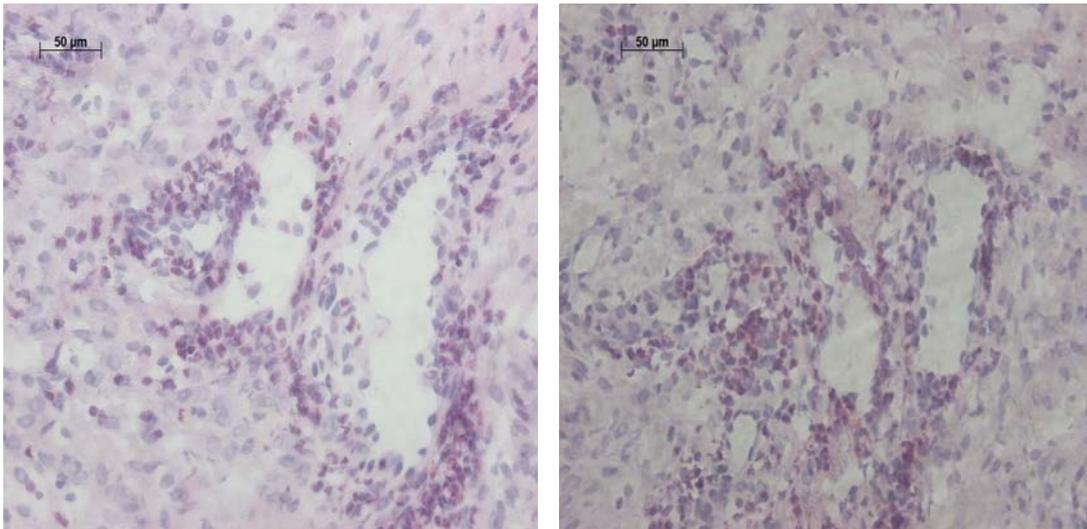


Abb.45: Hämalaun-Eosin-Färbung von CL Tag 1-2, **20x** vergrößert

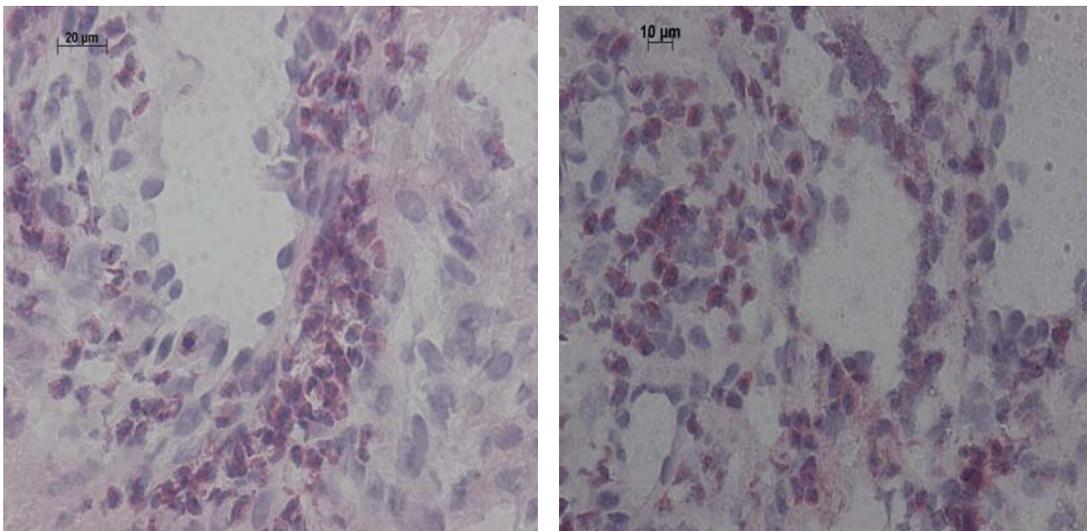


Abb.46: Hämalaun-Eosin-Färbung von CL Tag 1-2, **40x** vergrößert

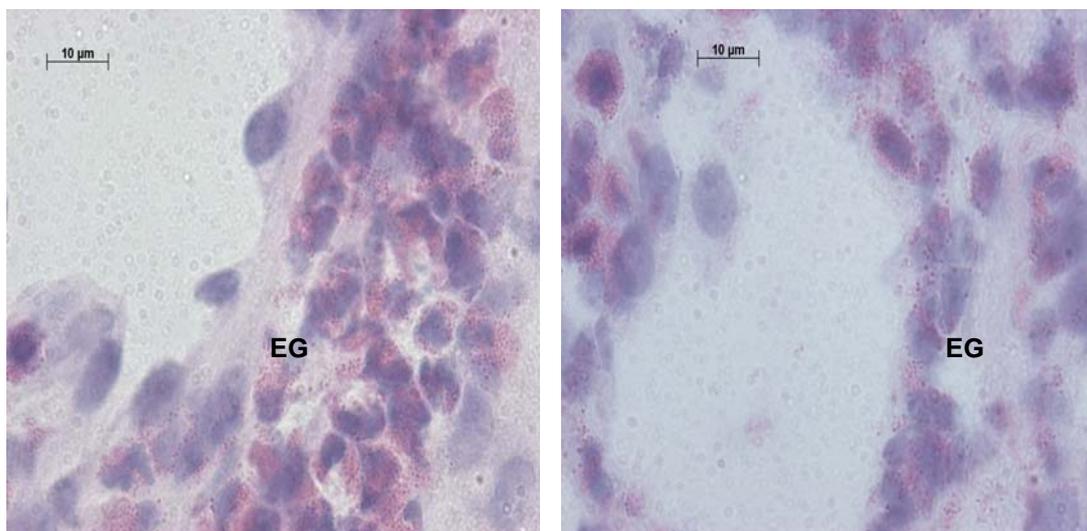


Abb.47: Hämalaun-Eosin-Färbung von CL Tag 1-2, **100x** vergrößert. Die eosinophilen Granula (EG) in den Leukozyten sind eindeutig erkennbar.

### 4.3 Anti-angiogene Faktoren

#### 4.3.1 Vasohibin-1 und Vasohibin-2

##### Vasohibin-1 und Vasohibin-2 im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Die Expression der beiden Faktoren bleibt, trotz gemessener Schwankungen von Vasohibin-2 an den Tagen 5-7, während der gesamten lutealen Phase und über die Trächtigkeit hinweg, auf etwa dem gleichen Expressions-Niveau.

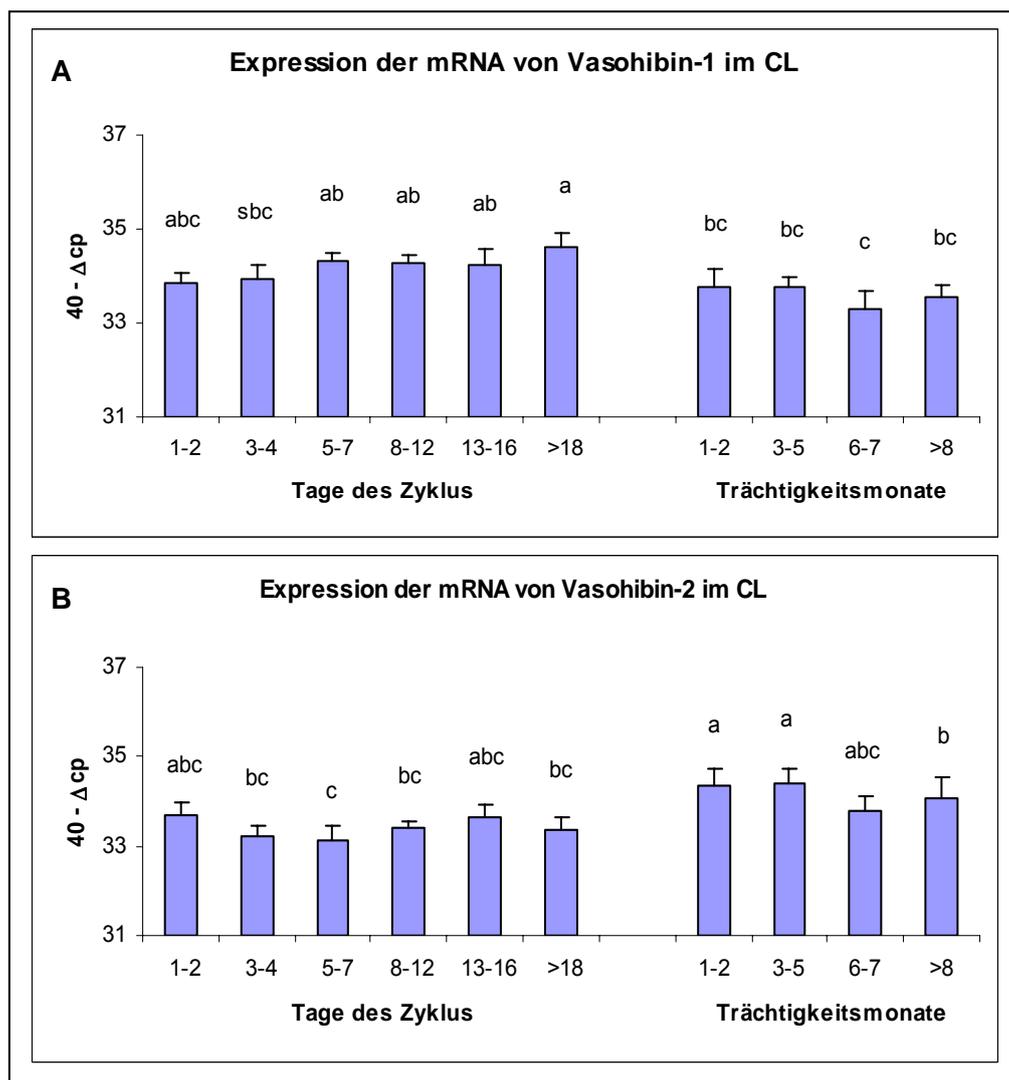


Abb.49: Expression der mRNA von **(A)** Vasohibin-1 und **(B)** Vasohibin-2 im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als  $40 - \Delta cp \pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Vasohibin-1 und Vasohibin-2 im CL während der induzierten Luteolyse:

Sowohl Vasohibin-1, als auch Vasohibin-2 zeigen keine signifikanten Veränderungen ihrer mRNA-Expression im CL während der Luteolyse (nicht gezeigte Ergebnisse).

Vasohibin-1 und Vasohibin-2 in den GC:

Die Faktoren Vasohibin-1 und Vasohibin-2 werden in den kleinen Follikeln am meisten exprimiert. Vasohibin-1 zeigt bei den Follikeln mit einem Durchmesser von unter 5 mm deutlich die höchsten Expressionswerte. Ab einer Follikelgröße von 6-8 mm ist ein signifikanter Abfall der mRNA von Vasohibin-1 und in den GC zu beobachten.

Bei Vasohibin-2 bleiben die Werte noch bis zu einer Größe von 13 mm hochreguliert. Mit dem weiteren Follikelwachstum geht die Expression der Vasohibine dann signifikant zurück.

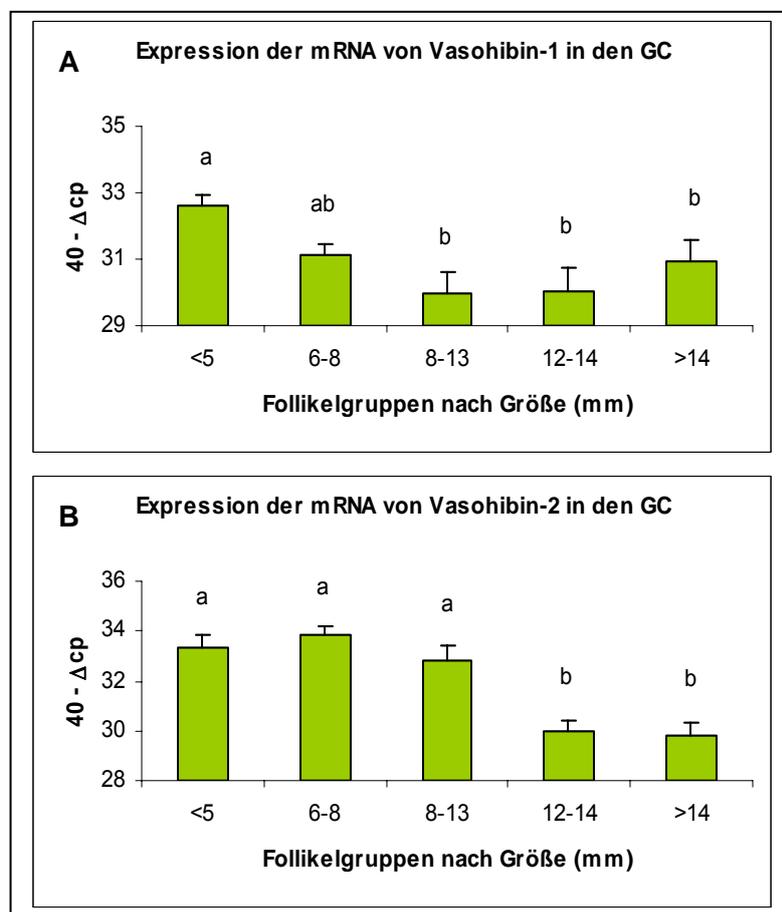


Abb.50: Expression der mRNA von **(A)** Vasohibin-1 und **(B)** Vasohibin-2 in den Granulosazellen (GC) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

Vasohibin-1 und Vasohibin-2 in der TI:

Die mRNA von Vasohibin-1 und Vasohibin-2 sind auch in der TI von den kleinsten Follikeln am meisten zu finden. Bei den weiterentwickelnden sinkt die Expression der Vasohibine dann ab. Vasohibin-1 fällt bei einem Durchmesser von 12-14 mm signifikant ab und Vasohibin-2 sogar zweimal und zwar bei einer Follikelgröße von 8-13 mm und über 14 mm.

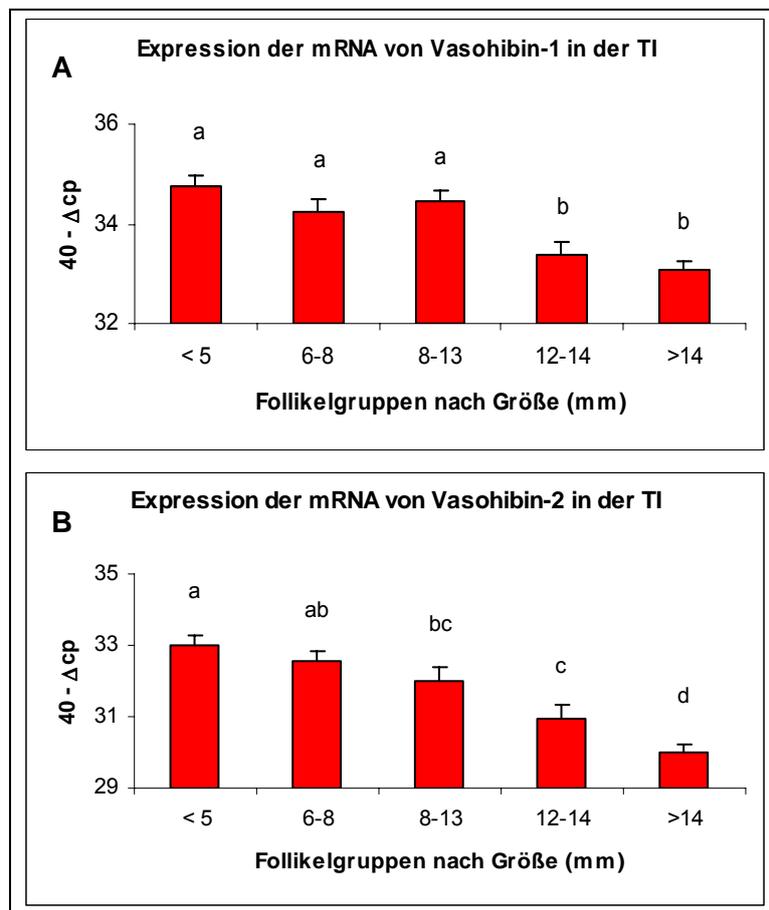


Abb.51: Expression der mRNA von **(A)** Vasohibin-1 und **(B)** Vasohibin-2 in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

### 5.4.2 Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 (TSP)

#### TSP-1 und TSP-2 im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Die Expressionslevel von TSP-1 und TSP-2 im CL bleiben während des gesamten Zyklus hoch. Bei TSP-1 ist der Gipfel der gemessenen mRNA-Werte an den Tagen 3-4, jedoch ist keine Abregulierung während der Regression erkennbar. Im Gegenteil, die Werte sind so hoch, dass sie zu diesem Gipfel nicht signifikant niedriger sind. Bei TSP-2 ist der höchste Expressionsspiegel sogar zum Zeitpunkt der Regression zu beobachten und auch hier sind die Werte zu Beginn und am Ende der lutealen Phase untereinander nicht signifikant verändert. Bei beiden Faktoren liegen die Expressionsdaten während der Trächtigkeit etwas niedriger als während des Zyklus vor und zeigen über den Verlauf der Gravidität hinweg keine signifikanten Veränderungen.

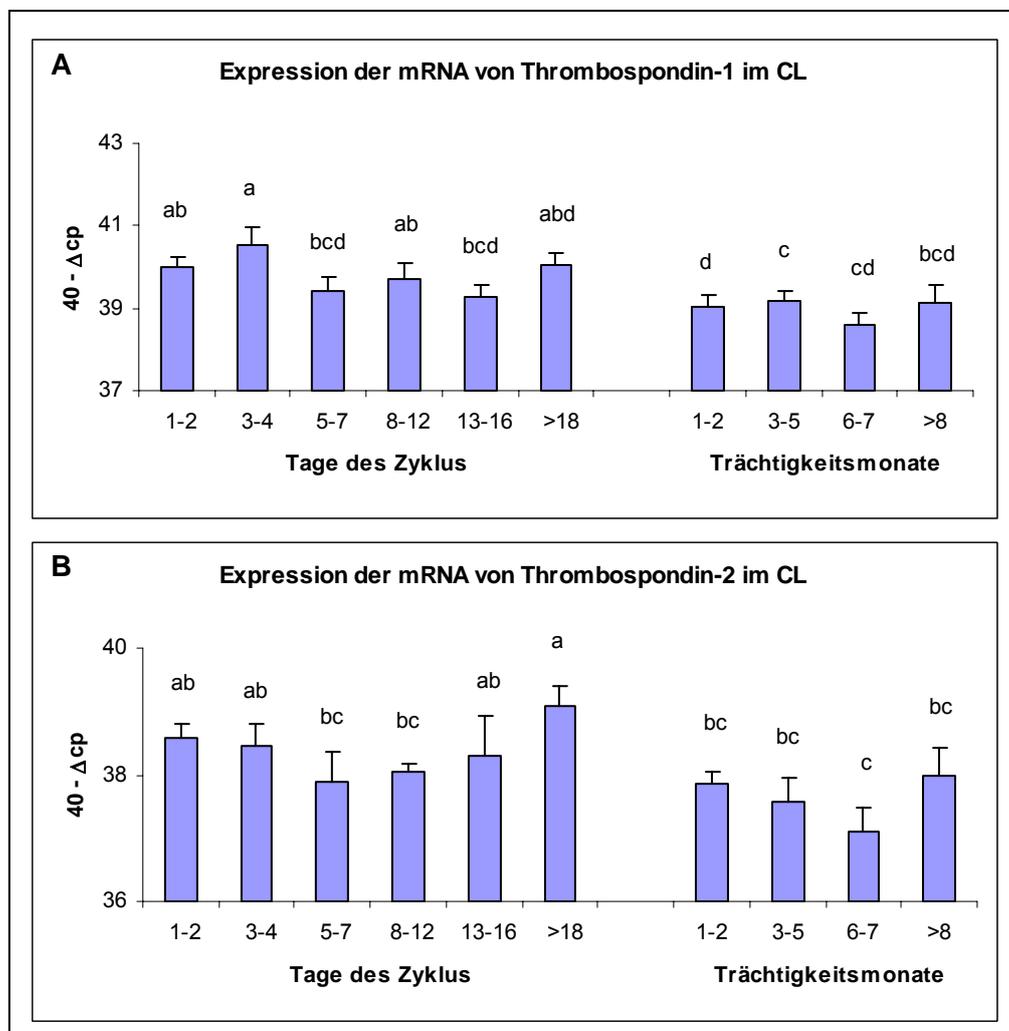


Abb.52: Expression der mRNA von **(A)** Thrombospondin-1 und **(B)** Thrombospondin-2 im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

TSP-1 und TSP-2 im CL während der induzierten Luteolyse:

Während der Luteolyse zeigen die beiden Faktoren unterschiedliches Verhalten. TSP-1 steigt vom Zeitpunkt der Injektion von PGF<sub>2</sub> $\alpha$  bis 12 h danach signifikant an und fällt nach 24h ebenfalls in signifikanter Art und Weise sofort wieder ab. Nach 64 h lässt sich dann wieder ein Anstieg der Werte beobachten.

Bei TSP-2 steigt die Menge der nachgewiesenen mRNA nach Auslösung der Luteolyse zu den Zeitpunkten 0,5 h und 12 h signifikant an und bleibt dazwischen gleichmäßig hochreguliert. Nach 48 h und 64 h fallen die Werte dann wieder ab.

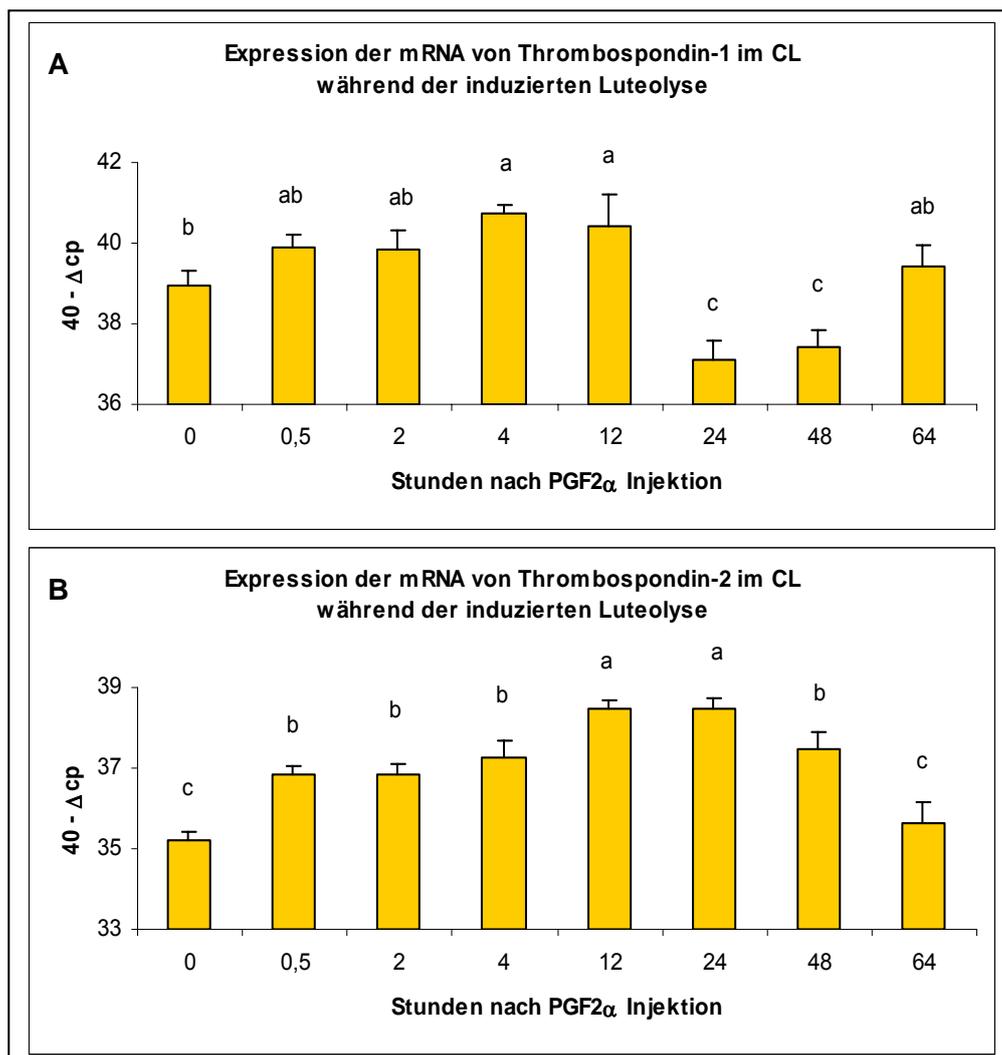


Abb.53 Expression der mRNA von **(A)** Thrombospondin-1 und **(B)** Thrombospondin-2 im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF<sub>2</sub> $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

TSP-1 und TSP-2 in den GC:

Die Faktoren TSP-1 und TSP-2 werden in den kleinsten Follikel am stärksten exprimiert. Während des weiteren Wachstums fällt die gemessene Menge mRNA in den Follikeln signifikant ab.

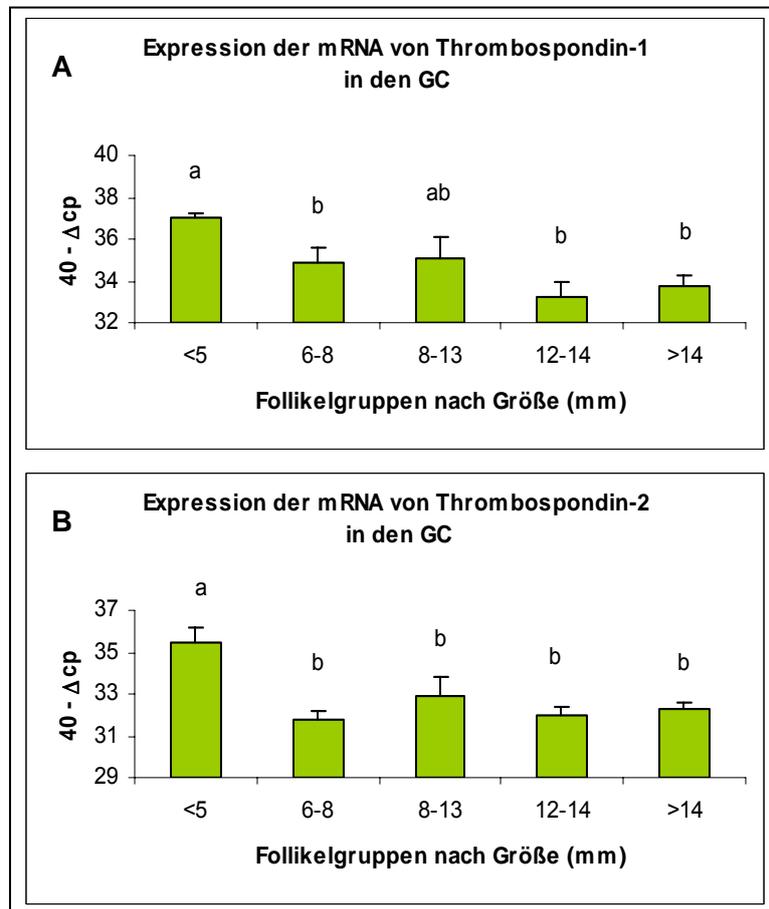


Abb.54 Expression der mRNA von **(A)** Thrombospondin-1 und **(B)** Thrombospondin-2 in den Granulosazellen (GC) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als  $40 - \Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml; 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5- 0 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

TSP-1 und TSP-2 in der TI:

In der TI es so, dass die Werte für TSP-1 nicht statistisch signifikant reguliert sind, sich jedoch ein tendenzieller Abfall bei den reifen Follikeln mit über 14 mm Größe erkennen lässt (nicht gezeigte Ergebnisse). TSP-2 dagegen ist in den kleinsten Follikeln am höchsten exprimiert, um danach mit zunehmender Größe signifikant abzufallen.

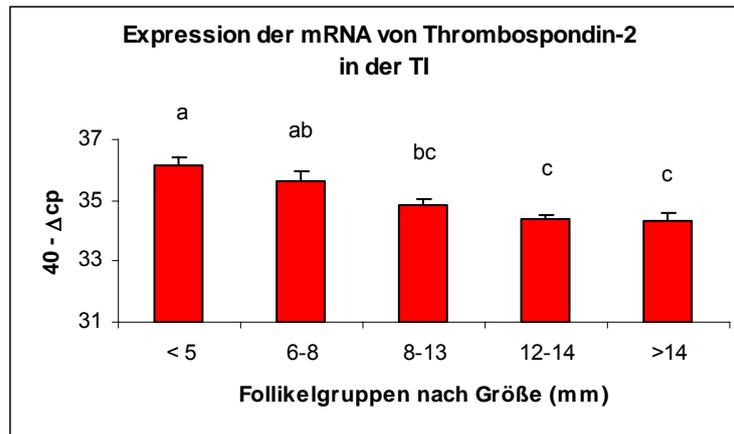


Abb.55: Expression der mRNA von Thrombospondin-2 in der Theka interna (TI) (verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

5.3.3 Oberflächenantigene CD36 und CD47

CD36 und CD47 im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Im CL sieht man, nach einem kurzen Abfall von den Tagen 1-2 zu den Tagen 3-4, eine zweistufige signifikante Erhöhung der CD36 Expression. Ein weiterer signifikanter Anstieg der Expression erfolgt während der Regression. Im Verlauf der Trächtigkeit ist die Expression von CD36 auf einem konstanten, niedrigen Niveau.

Bei der Expression von CD47 lassen sich während der lutealen Phase keine signifikanten Schwankungen erkennen. Die Daten bleiben vom Beginn der CL-Bildung bis hin zu seiner Regression auf unverändert hohem Niveau. Auch hier ist kein Abfall während der Regression zu erkennen. Die Expression während der Trächtigkeit ist im Vergleich zu der während des Zyklus deutlich schwächer und statistisch nicht signifikant reguliert.

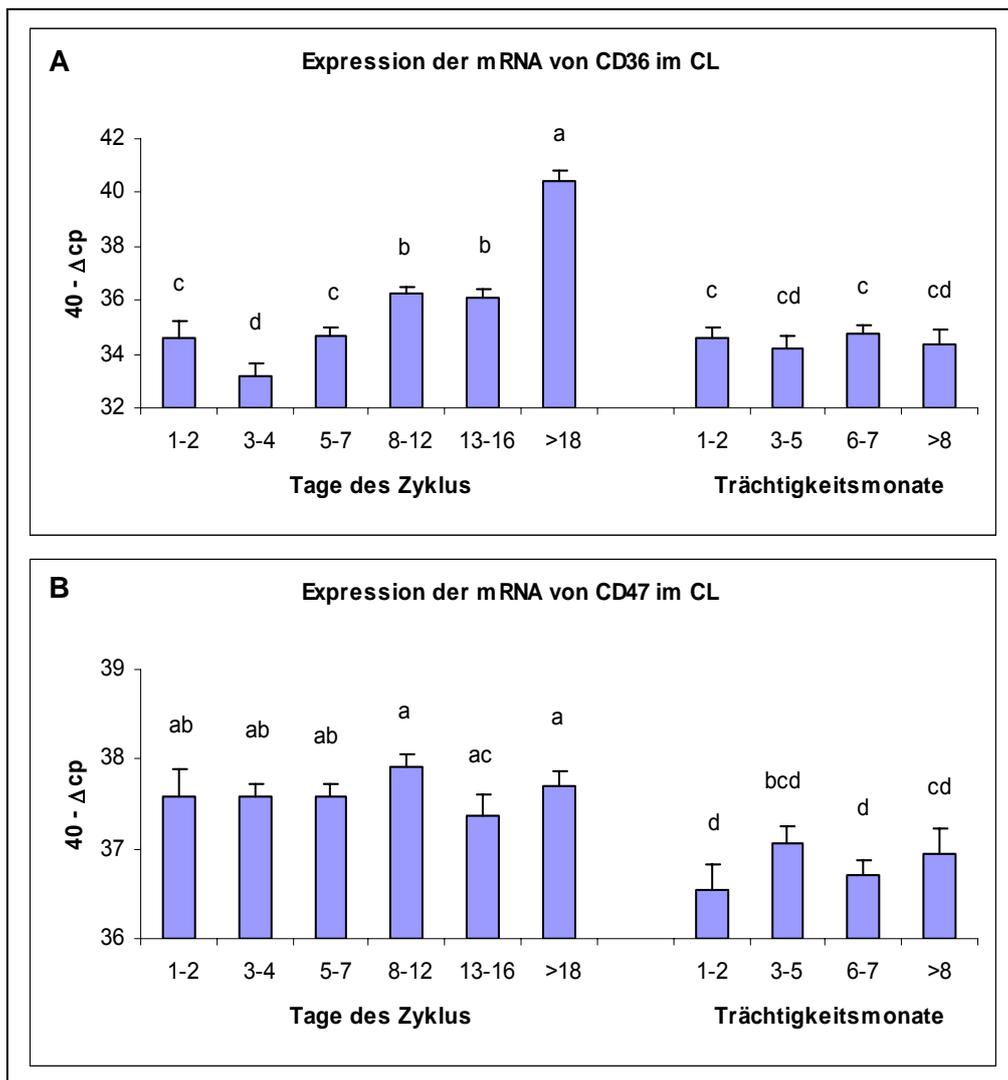


Abb.56: Expression der mRNA von CD36 und CD47 im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

CD36 und CD47 im CL während der induzierten Luteolyse:

Der mRNA-Gehalt von CD36 ist zu Beginn der Luteolyse am niedrigsten, steigt dann bereits nach 0,5 h signifikant an und bleibt bis zum Zeitpunkt 12 h nach Induktion auf etwa dem gleichen Niveau. Ab 24 h ist dann wieder ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen mit Abfall ab 64 h.

Für CD47 sind die Expressionsdaten im CL über den gesamten Zeitraum der Messung konstant auf gleichem Niveau außer einem kurzfristigen signifikanten Anstieg nach 0,5 h.

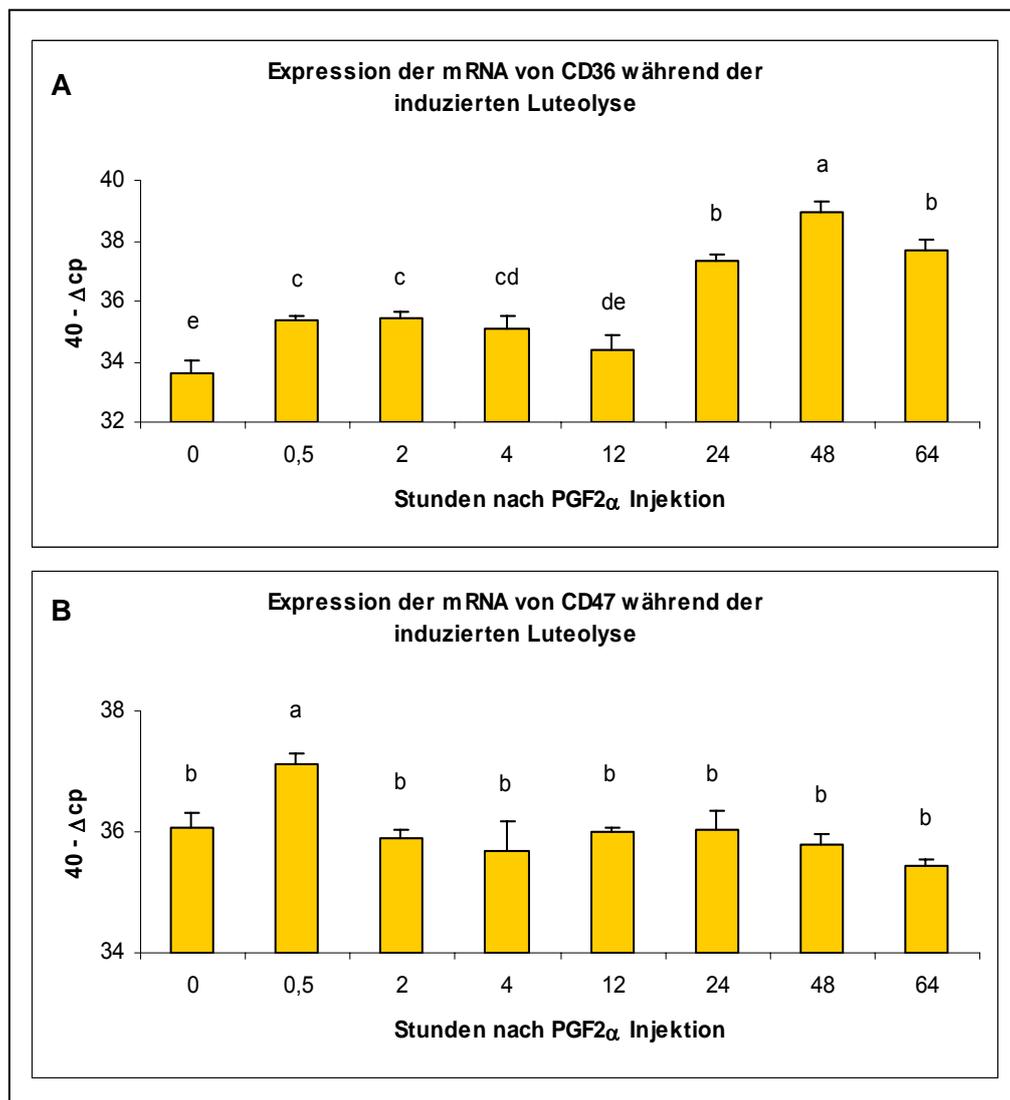


Abb.57: Expression der mRNA von **(A)** CD36 und **(B)** CD47 im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF2 $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

CD36 und CD47 in den GC:

Hier kann ebenfalls beobachtet werden, dass mit der Größenzunahme der Follikel die Expression in den GC abnimmt. Von den Follikeln mit einem Durchmesser von 6-8 mm auf diejenigen mit einer Größe von 12-14 mm und über 14 mm fällt die mRNA-Menge von CD36 jeweils signifikant ab.

Die Daten für den Rezeptor CD47 zeigen in den GC keine signifikanten Veränderungen, sie bleiben auf relativ gleichem Niveau, mit einem schwach zu erkennenden Abfall der Werte bei den größten Follikeln (nicht gezeigte Ergebnisse).

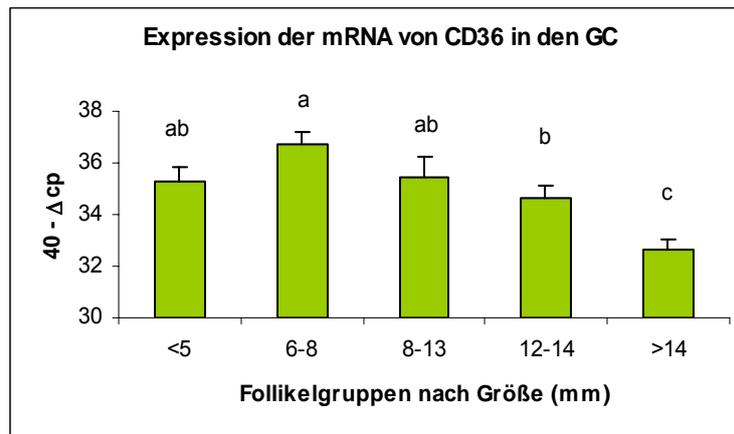


Abb.58: Expression der mRNA von CD36 in den Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml; 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

CD36 und CD47 in der TI:

Die beiden Rezeptoren CD36 und CD47 verhalten sich in der TI gleich. Beide sind in den kleinen Follikeln am meisten exprimiert. Mit Erlangen eines Durchmessers von 12-14 mm beginnt der Abfall der Expression, der bei den reifen Follikeln mit einer Größe von über 14 mm statistisch signifikant niedriger ist als bei denen mit einem Durchmesser vor 8-13 mm oder kleiner.

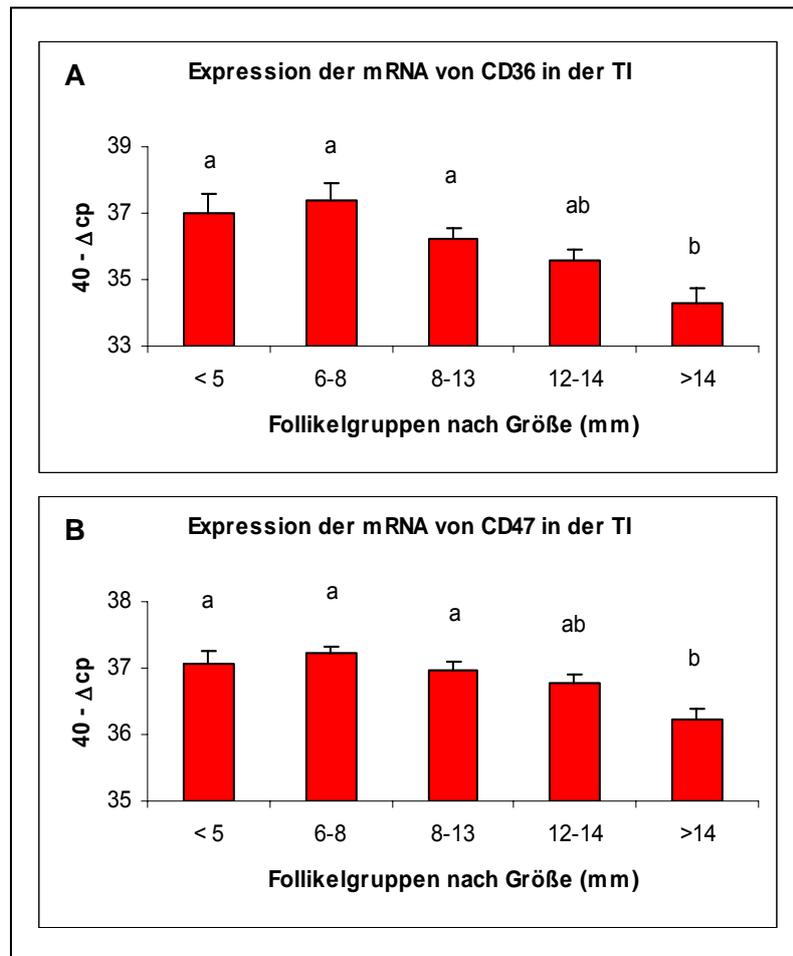


Abb.59: Expression der mRNA von **(A)** CD36 und **(B)** CD47 in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als  $40 - \Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen:  $<5$  mm =  $<0,5$  ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml;  $>14$  mm =  $>180$  ng/ml).

#### 4.4 Lymphangiogene Faktoren

##### 4.4.1 VEGF-Familie (VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3)

###### 4.4.1.1 Expression der mRNA und Proteinkonzentration (ELISA)

###### VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3 im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Für die CL während des Zyklus und der Gravidität wurde, außer den Messungen der mRNA-Expression mit der qPCR, auch eine Analyse der nachzuweisenden Proteinmenge in den Geweben mittels ELISA durchgeführt.

Am Tag 1-2 ist die gemessene mRNA-Expression von VEGF-C am höchsten. Für die Tage 3-4 und 5-7 ist ein Abfall der Expressionswerte zu beobachten, danach steigen sie an den Tagen 8-12 wieder signifikant an und erreichen fast die Höhe des Wertes zu Beginn der CL-Bildung. Im weiteren Verlauf des Zyklus fällt die Expression an den Tagen 13-16 und zur Regression drastisch ab. Die Werte während der Trächtigkeit liegen etwa auf dem Niveau wie zu den Zyklustagen 3-4 und zeigen keine signifikanten Schwankungen. Die gemessene Menge an VEGF-C Protein steigt, nach relativ niedrig liegenden Werten in den jungen CL, ab den Zyklustagen 8-12 erst signifikant und dann noch weiter leicht, an. Die hohen Proteinmengen zum Zeitpunkt der Regression spiegeln dann auch etwa den Spiegel wieder, der in den CL während der Trächtigkeit zu finden ist. Am meisten VEGF-C wurde in den letzten beiden Monaten der Gravidität gemessen.

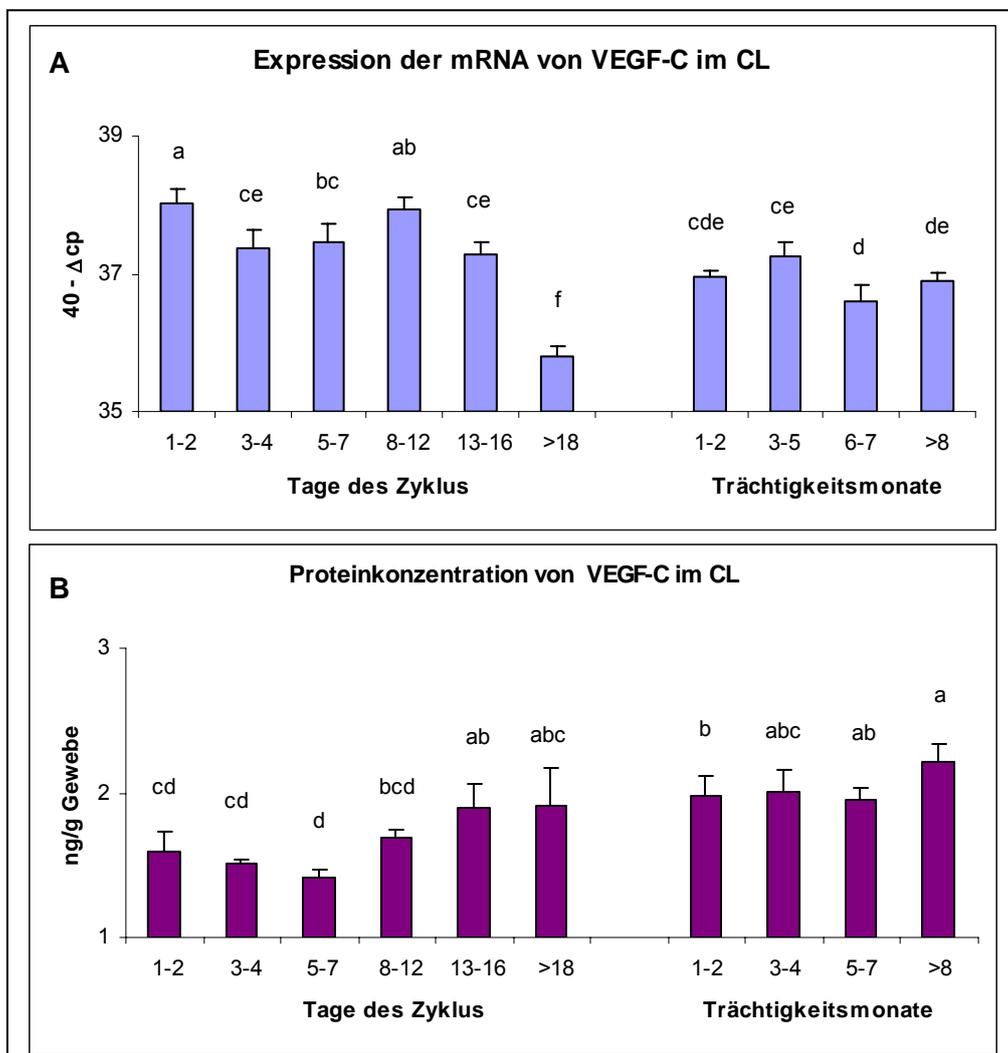


Abb.60: **(A)** Expression der mRNA von VEGF-C im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. **(B)** Proteinmenge von VEGF-C (in ng/g Gewebe) im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Für VEGF-D im CL lässt sich beobachten, dass die mRNA-Menge vom Beginn der lutealen Phase bis zu den Tagen 8-12 kontinuierlich ansteigt und dort ihren Höchstwert erreicht. An den Tagen 13-16 und >18 fällt die Expression jeweils signifikant ab. Die Daten während der Gravidität steigen von den Trächtigkeitsmonaten 1-2 über die Monate 3-5 zu den Monaten 6-7 signifikant an und bleiben für den Rest der Gravidität auf diesem vergleichsweise sehr hohen Niveau.

Für die Proteinmengen von VEGF-D zeigt sich in den CL während des Zyklus ein deutlicher Anstieg der Werte an den Tagen 8-12. Danach fällt die Proteinmenge sofort wieder auf den Level von vor diesem Höhepunkt ab. Während der Trächtigkeit ist dann wieder deutlich mehr VEGF-D nachzuweisen. Es ist signifikant mehr Protein in den CL als während des Zyklus – abgesehen von dem Gipfel an den Tagen 8-12.

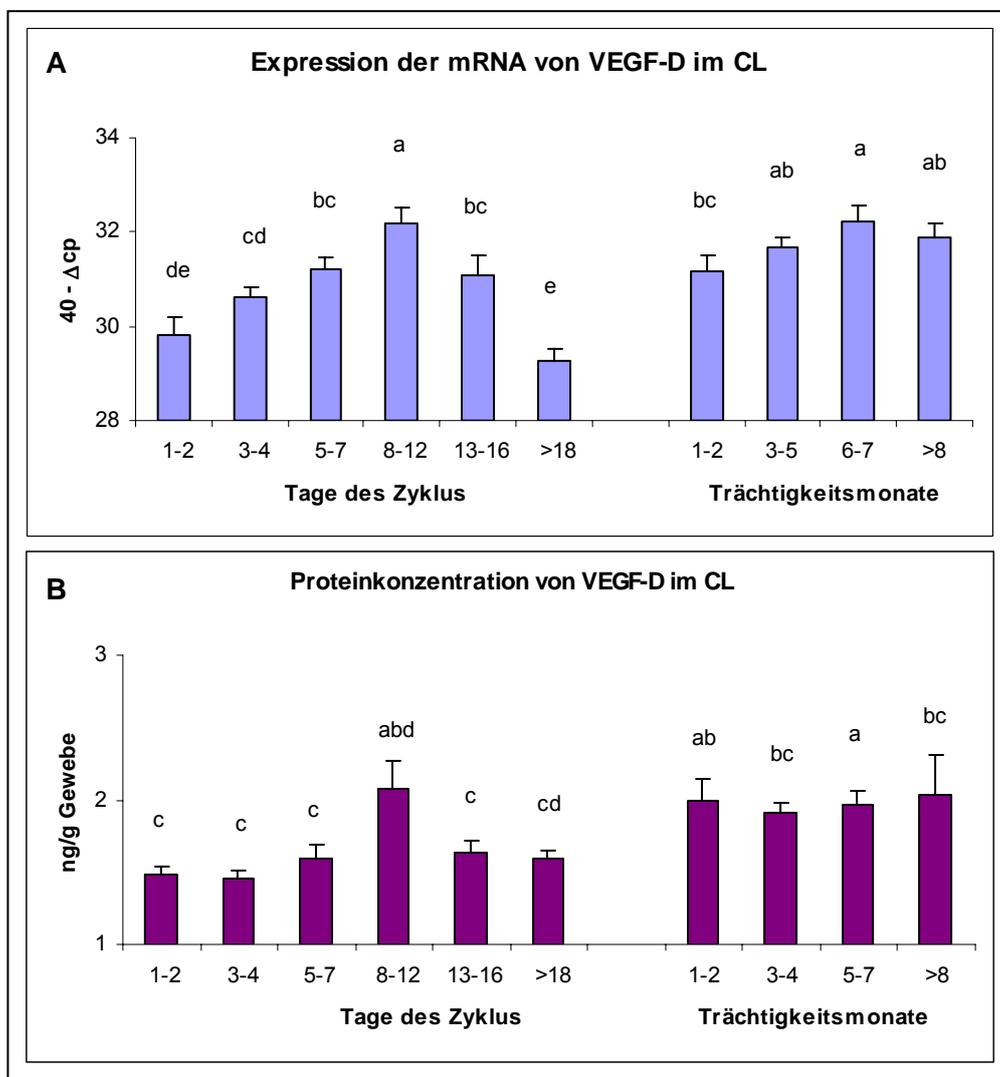


Abb.61: **(A)** Expression der mRNA von VEGF-D im CL während des Zyklus und der Gravidität Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. **(B)** Proteinmenge von VEGF-D (in ng/g Gewebe) im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Die Expressionsdaten für den VEGF-R3 sind vergleichbar mit denen von VEGF-D. Auch hier gibt es einen Anstieg der Werte über den Verlauf des Zyklus bis zu den Tagen 8-12. Dieser Anstieg ist von den Tagen 3-4 und 5-7 signifikant zu den vorherigen CL. Der folgende Abfall der Expression ist zur Regression hin signifikant. Die mRNA-Daten während der Trächtigkeit sind relativ konstant hoch mit signifikantem Abfall in den Trächtigungsmonaten 6-7.

Für die Proteinkonzentration VEGF-R3 zeigt sich im CL während des Zyklus und der Gravidität ein ähnliches Bild. Hier sind die Werte bis zum Tag 7 des Zyklus sogar so niedrig, dass sie unter der Nachweisgrenze von 1,56 ng/g Gewebe liegen. Danach steigen die Werte bis zum Tag 16 deutlicher an, um dann wieder signifikant abzufallen. Die gemessene Proteinmenge während der Gravidität ist ebenfalls konstant und zugleich deutlich höher als während des Zyklus.

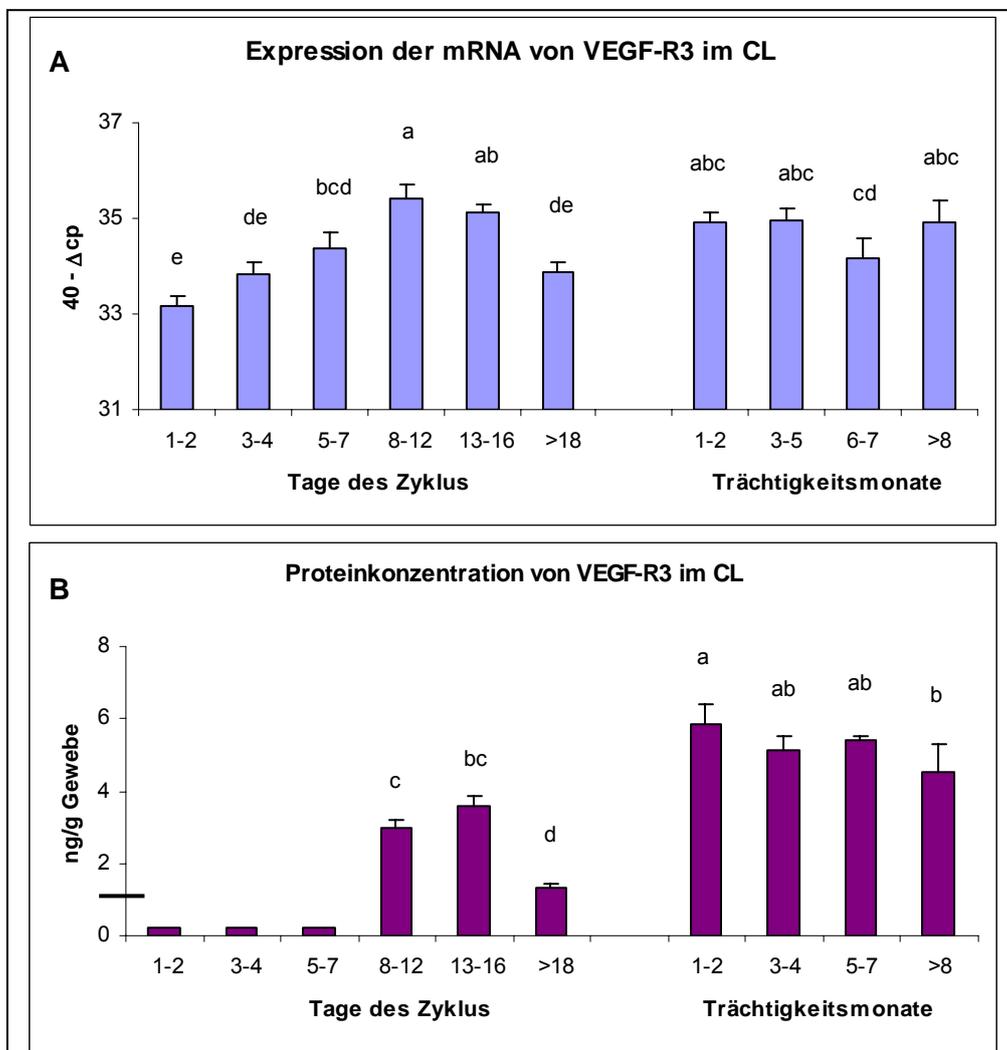


Abb.62: **(A)** Expression der mRNA von VEGF-R3 im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. **(B)** Proteinmenge von VEGF-R3 (in ng/g Gewebe) im CL während des Zyklus und der Gravidität. An den Zyklustagen 1-7 liegen die Werte unter der Nachweisgrenze von 1,56ng/g Gewebe. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

### VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3 im CL während der induzierten Luteolyse:

Im CL während der Luteolyse steigt die Expression von VEGF-C vom Zeitpunkt 0 zum Zeitpunkt 0,5 h nach Injektion von PGF2 $\alpha$  signifikant an und bleiben dann bis 4 h nach Auslösung der Luteolyse hoch. 12 h, 24 h und 48 h danach ist dann jeweils wieder ein signifikanter Abfall der Werte zu beobachten.

Auch VEGF-D hat seinen Expressionshöhepunkt während der Luteolyse 0,5 h nach deren Auslösung. Anschließend erfolgt erst ein leichter Abfall und dann ein jeweils signifikanter zu den Zeitpunkten 4 h und 12 h nach der Injektion von PGF2 $\alpha$ . 24 h nach dieser steigen die Werte wieder signifikant an.

Die mRNA-Menge für den VEGF-R3 schwankt über den Verlauf der Luteolyse. Nur 2 h nach Induktion der Luteolyse ist ein statistisch signifikanter Abfall zu erkennen, ansonsten sind die Veränderungen bis zum Ende der Messzeitpunkte statistisch nicht relevant.

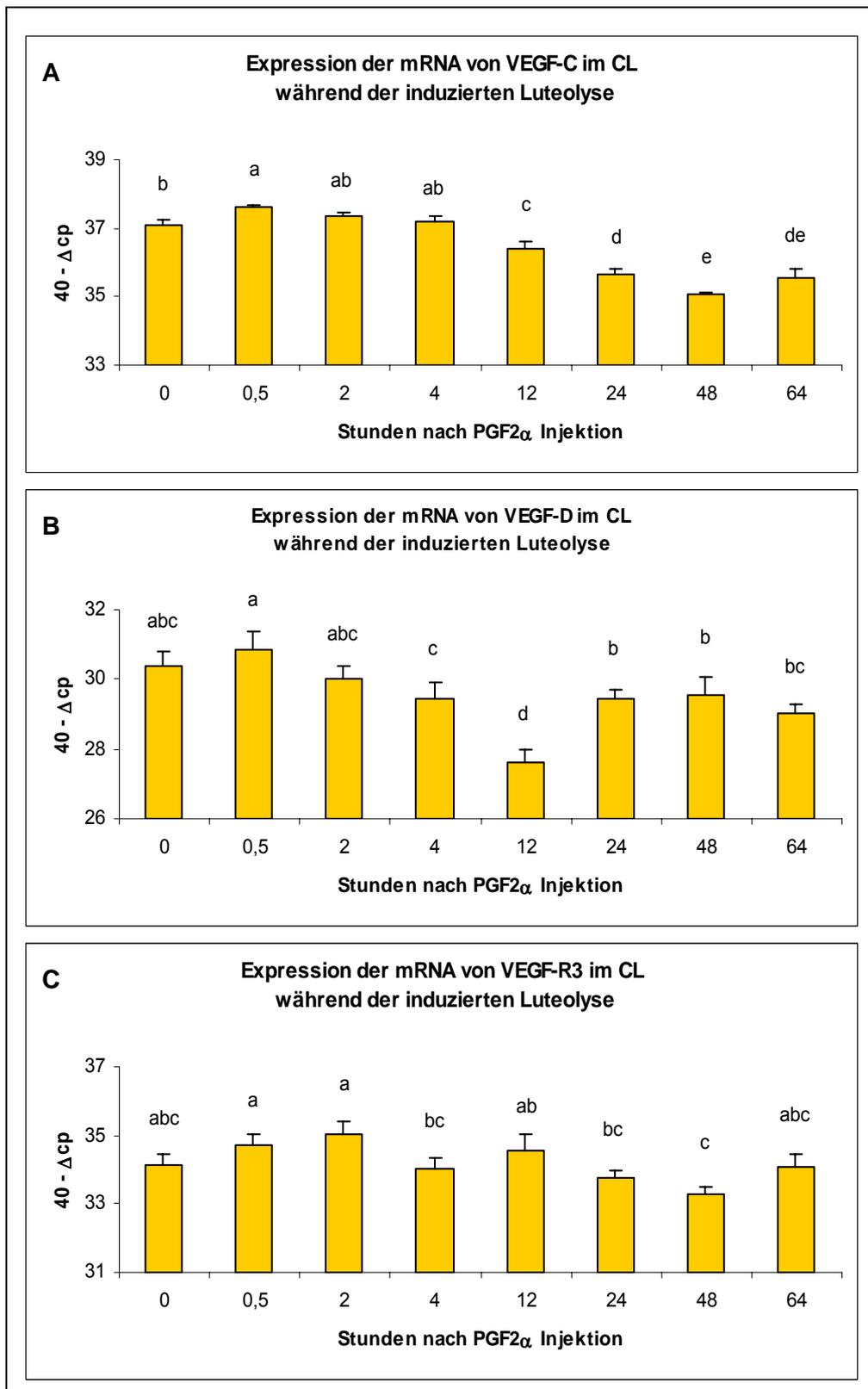


Abb.63: Expression der mRNA von **(A)** VEGF-C **(B)** VEGF-D und **(C)** VEGF-R3 im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF<sub>2</sub> $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

VEGF-C, VEGF-D und ihr Rezeptor VEGF-R3 in den GC und der TI:

Die mRNA-Expression von VEGF-C steigt von den Follikeln mit dem kleinsten Durchmesser, mit dem Wachstum kontinuierlich an und erreicht bei denen einer von Größe 12-14 mm seinen Höhepunkt. Danach fällt die Expression für die Follikel, die größer als 14 mm sind, signifikant ab.

Bei VEGF-D ist die höchste Expression in den kleinsten Follikeln zu beobachten. Zu den Tagen 8-13 fallen die Werte signifikant ab, danach steigen sie mit der weiteren Größenzunahme wieder an.

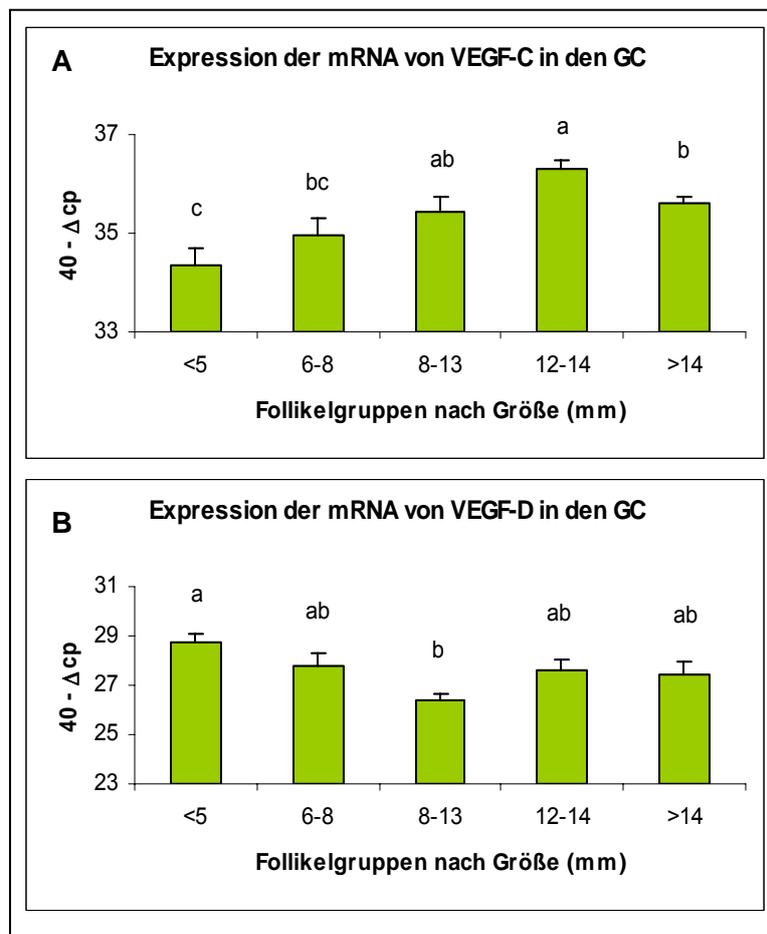


Abb.64: Expression der mRNA von **(A)** VEGF-C und **(B)** VEGF-D in den Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

Wie schon bei dem Faktor VEGF-B<sub>167</sub> ergaben sich auch beim VEGF-R3 Probleme in den GC und der TI. Die Schmelzkurve erlaubte, so wie sie sich darstellte, keine Auswertung der cp-Werte (nicht gezeigte Ergebnisse). Die mRNA-Expression für den Faktor VEGF-C zeigte in der TI ebenfalls keine starke Regulierung im Laufe der Follikelreifung (nicht gezeigte Ergebnisse). VEGF-D ist in den kleinen Follikeln am meisten exprimiert. In der TI von Follikeln mit einer Größe von 8-13 mm fallen die Expressionswerte-Werte signifikant ab und sinken nochmals drastisch bei denen mit 12-14 mm. Danach steigen sie wieder leicht an.

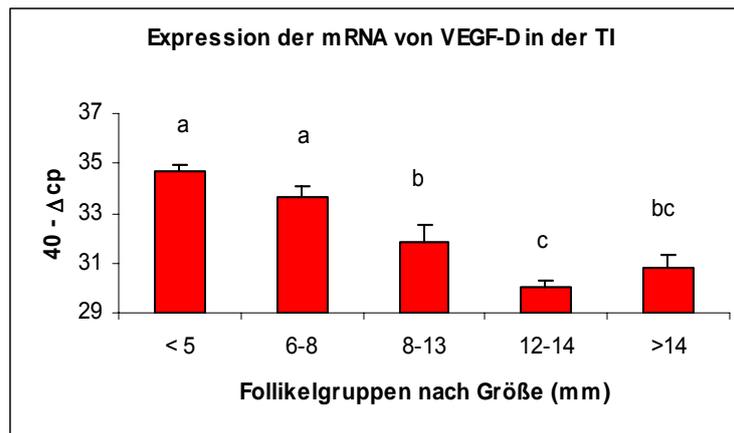


Abb.65: Expression der mRNA von VEGF-D in der Theka interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

Bei der qPCR für den Faktor VEGF-R3 in der TI zeigte sich nur bei den Follikeln der Gruppe 5, also bei denen mit einem Durchmesser von über 14 mm ein Ergebnis. In den kleineren war die mRNA für VEGF-R3 nicht nachweisbar! Auch verschiedene Optimierungsversuche blieben erfolglos. Aus diesem Grund war keine Auswertung über den Verlauf des Follikelwachstums möglich (nicht gezeigte Ergebnisse).

#### 4.4.1.2 Proteinlokalisation (Immunhistochemie)

In der frühen lutealen Phase (Tag 1-2) konnte in einer Vielzahl von Luteinzellen eine Immunreaktivität auf das untersuchte VEGF-R3 Protein beobachtet werden. Hervorstechender war jedoch, dass die Gefäßwände (Endothelzellen und glatte Muskelzellen) durchweg nicht gefärbt waren. Im fortschreitenden Zyklus ging die Zahl der positiv gefärbten Zellen stark zurück. Im CL-Gewebe der Tage 7-8 war die Färbung nur noch auf ein paar wenige intensiv gefärbte Zellen begrenzt. In der spätlutealen Phase verschwand

die Immunreaktivität der Luteinzellen völlig. Dagegen war in diesen Schnitten schließlich eine eindeutige Färbung in den glatten Muskelzellen und EC der Gefäße zu erkennen.

Alle Gewebe wurden mit Haematoxylin gegengefärbt. Ein großer Anteil individueller Zellen zeigt eine positive Färbung in der frühlutealen Phase, die in der Mitte des Zyklus jedoch stark zurückging. Gegen Ende der lutealen Phase war die Immunreaktivität nur noch auf die SCM und die EC von Gefäßen beschränkt. (siehe Pfeile in C). Die sie umgebenden Luteinzellen blieben ungefärbt.

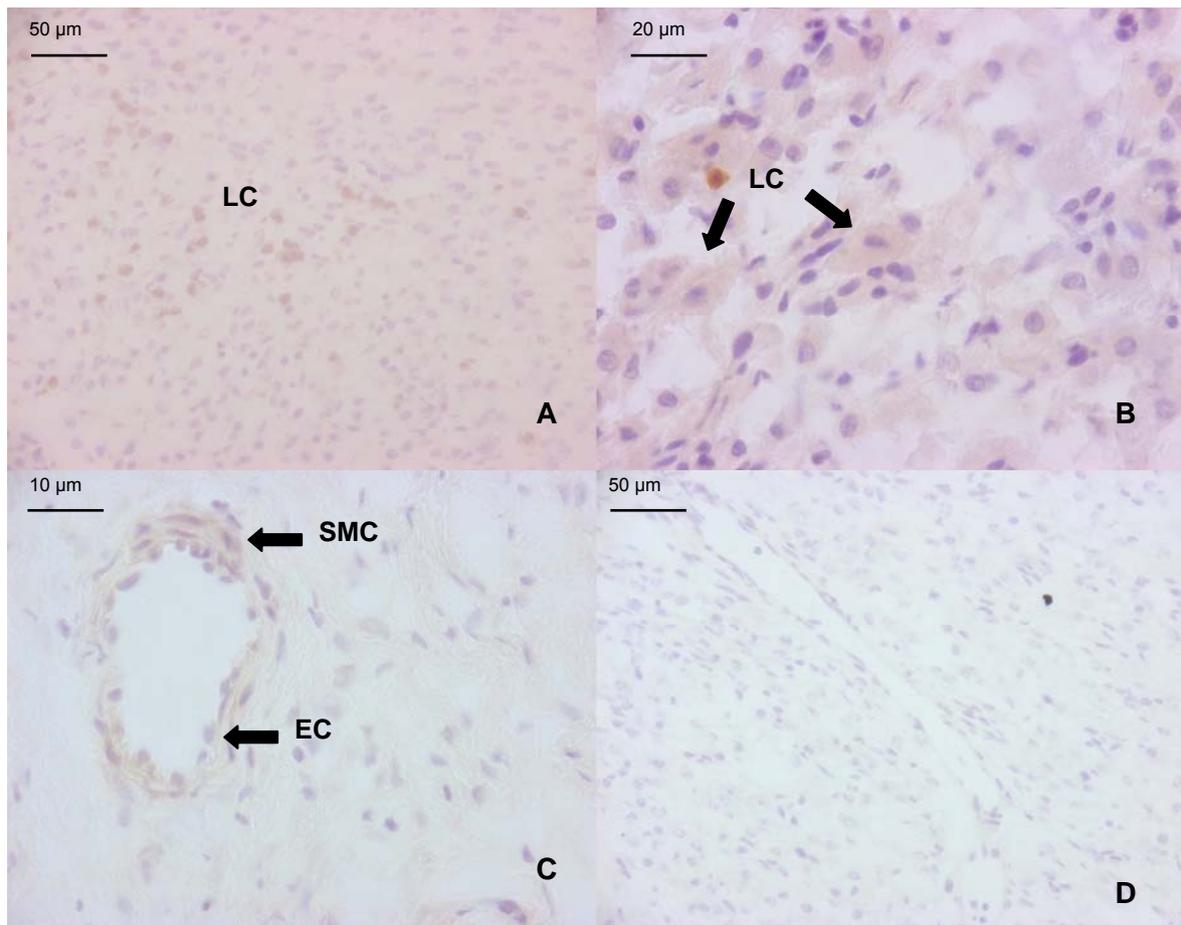


Abb.66: Immunohistochemische Lokalisation von VEGFR-3 im bovines CL. Determination der Protein-Expression von VEGFR-3 in **A** peripheren Bereichen des CL während der postovulatorischen Phase (Tag 1-2); **B** der mittlutealen Phase im CL (Tag 7-8) und **C** in der spätlutealen Phase im CL (Tag 12-14). **D** Negativkontrolle. Als Negativkontrolle wurde ein CL der spätlutealen Phase gewählt und ohne den Primären Antikörper inkubiert. Endothelzellen (EC); Luteinzellen (LC); glatte Muskelzellen der Gefäße (SMC)

#### 4.4.2 Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktoren (PDGF)

##### PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ und PDGF-R $\beta$ im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Im ganz jungen CL sind die Expressionswerte von PDGF-A am höchsten. Bereits an den Zyklustagen 3-4 fallen sie signifikant ab und zeigen im weiteren Verlauf der lutealen Phase, einschließlich der Regression, keine statistisch signifikanten Regulierungen mehr. Dies gilt auch für die Expression während der Trächtigkeit.

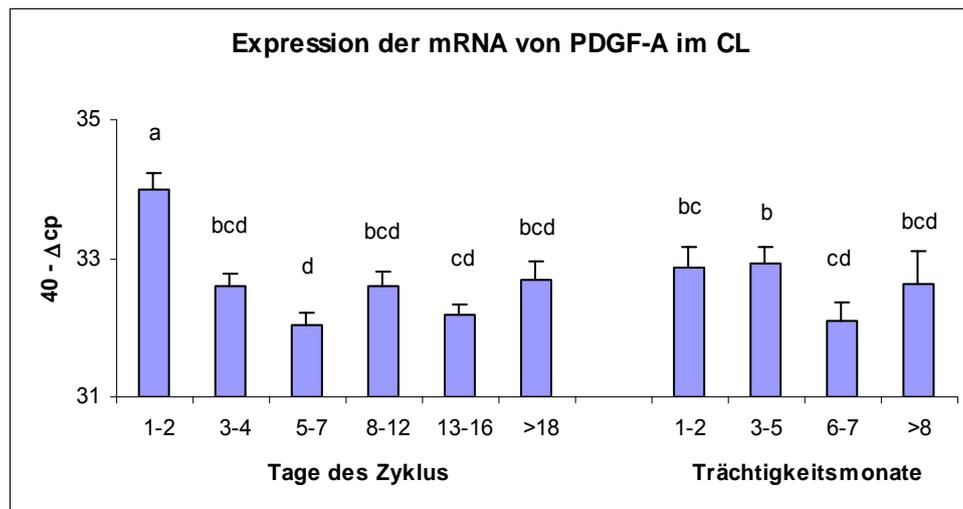


Abb.67: Expression der mRNA von PDGF-A im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als  $40 - \Delta cp \pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Die beiden Rezeptoren verhalten sich während des Zyklus noch unterschiedlich, zeigen aber beide während der Regression sehr hohe Werte. PDGF-R $\alpha$  fällt von seinen Höchstwerten zu Beginn der lutealen Phase bis zu den Tagen 13-16 kontinuierlich und teilweise signifikant ab. PDGF-R $\beta$  hingegen startet sehr niedrig in die luteale Phase und steigt bis zur Regression des CL kontinuierlich an.

Während der Trächtigkeit sind (bis auf einen kurzen Abfall es PDGF-R $\alpha$  in den Monaten 6-7) keine starken Schwankungen mehr zu beobachten, jedoch liegen die Expressionswerte von PDGF-R $\alpha$  sehr viel niedriger, als die von PDGF-R $\beta$ .

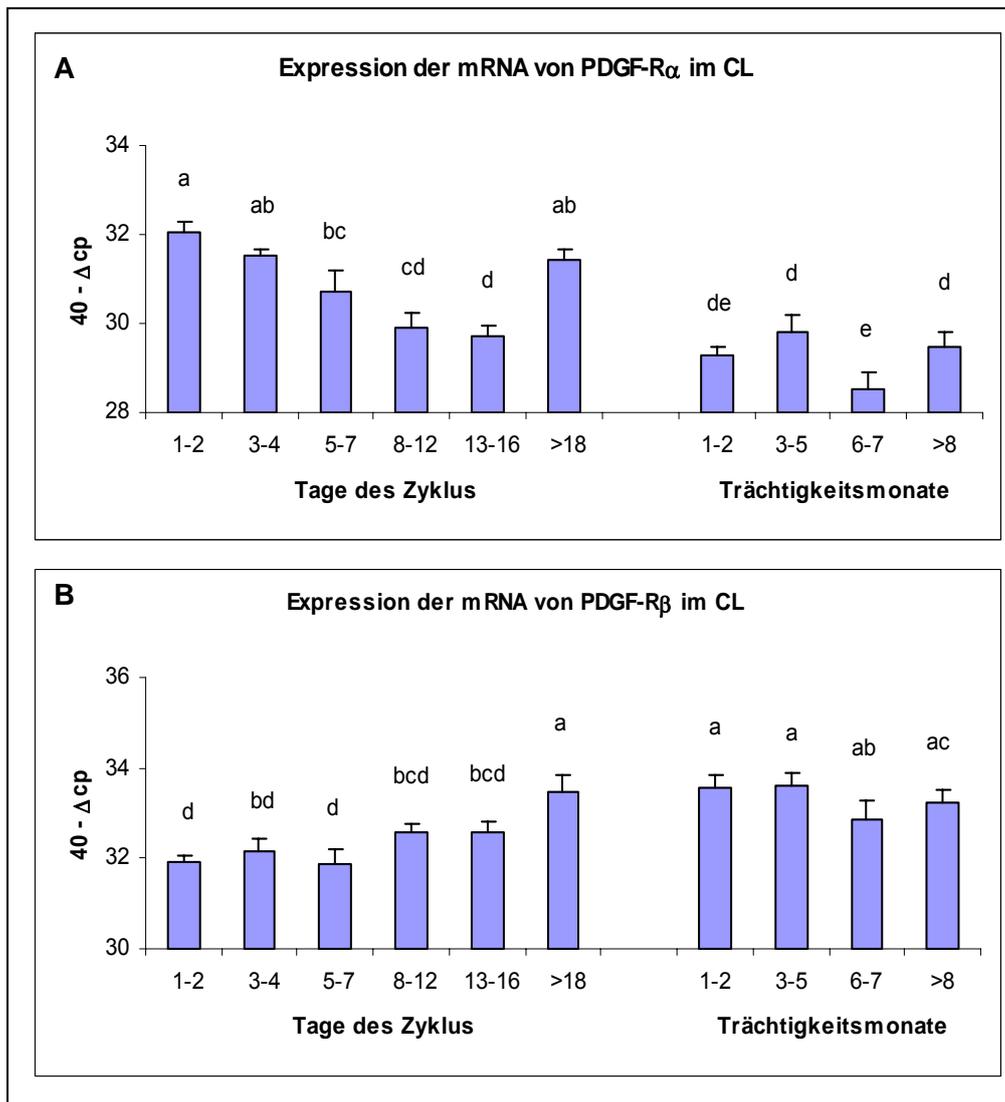


Abb.68: Expression der mRNA von **(A)** PDGF-R $\alpha$  und **(B)** PDGF-R $\beta$  im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

PDGF-A, PDGF-R $\alpha$  und PDGF-R $\beta$  im CL während der induzierten Luteolyse:

Die gemessene mRNA-Menge für PDGF-A steigt während der Luteolyse in den ersten beiden Stunden an und erreicht auch zu diesem Zeitpunkt seine Höchstwerte. 4 h nach Beginn der Luteolyse fallen die Werte wieder auf ihr Ausgangsniveau und bleiben bis zum Ende der Messzeitpunkte auf diesem Niveau.

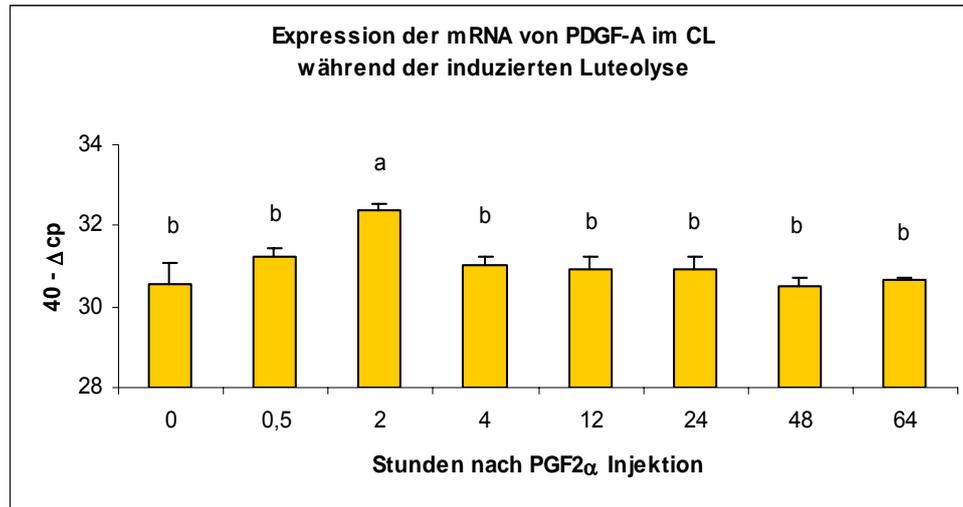


Abb.69: Expression der mRNA von PDGF-A im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF $_{2\alpha}$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

Die Expression von PDGF-R $\alpha$  steigt von Beginn der Luteolyse, über Zwischenstufen, langsam an. Von dem Zeitpunkt 24 h nach der PGF $_{2\alpha}$ -Injektion zu 48 h, danach ist der Anstieg signifikant und bleibt anschließend auch auf diesem hohen Niveau.

Bei PDGF-R $\beta$  ist der einzig signifikante Anstieg der Expression schon 0,5 h nach Induktion der Luteolyse. Danach gibt es keine signifikanten Schwankungen mehr und die Werte bleiben unverändert.

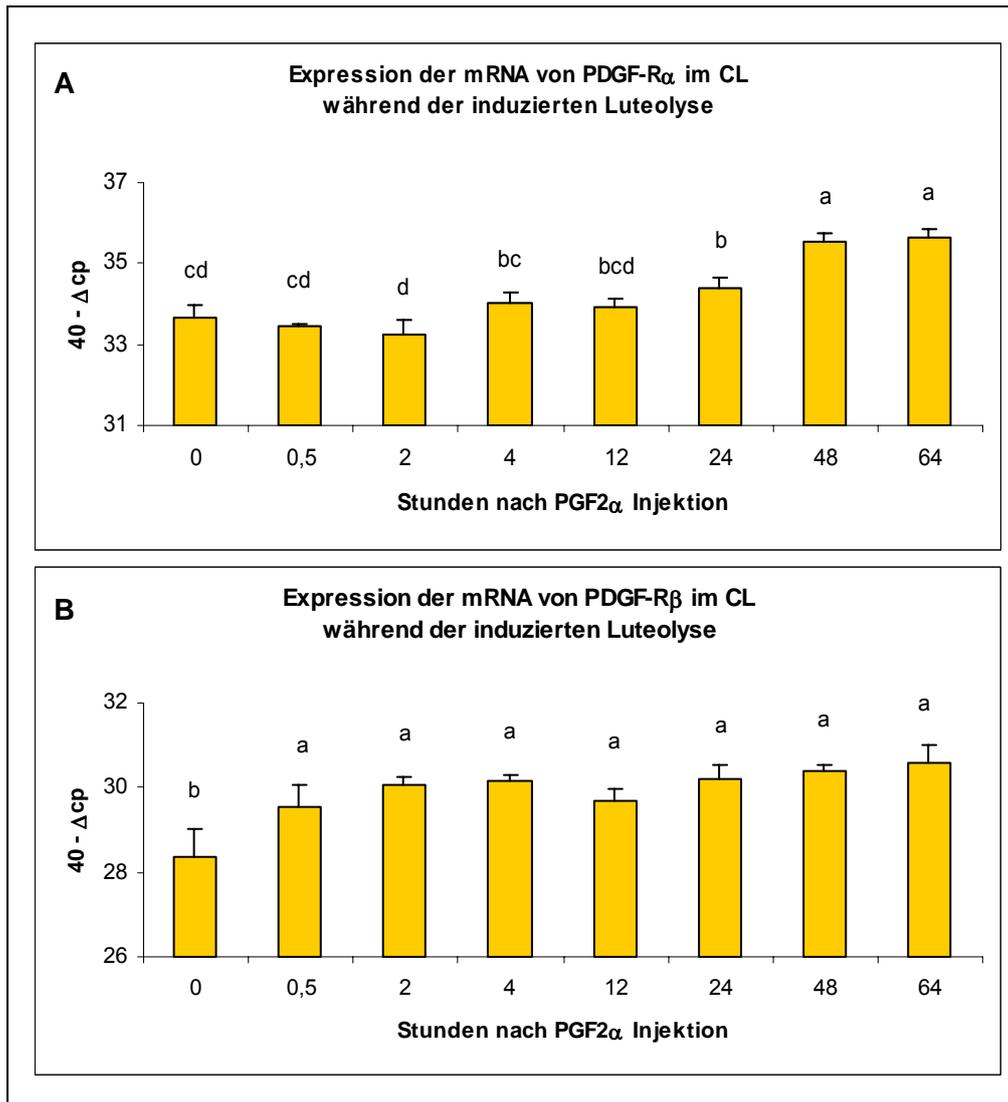


Abb.70: Expression der mRNA von **(A)** PDGF-R $\alpha$  und **(B)** PDGF-R $\beta$  im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF $2\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ und PDGF-R $\beta$ in den GC:

PDGF-A und PDGF-R $\beta$  sind in den GC nicht reguliert (nicht gezeigte Ergebnisse).

Die Expression von PDGF-R $\alpha$  sinkt in den GC mit der Größenzunahme der Follikel immer weiter ab. Der Abfall der mRNA-Expression ist von den Follikeln mit einem Durchmesser von  $< 5$  mm zu denen mit 8-13 mm und größer signifikant.

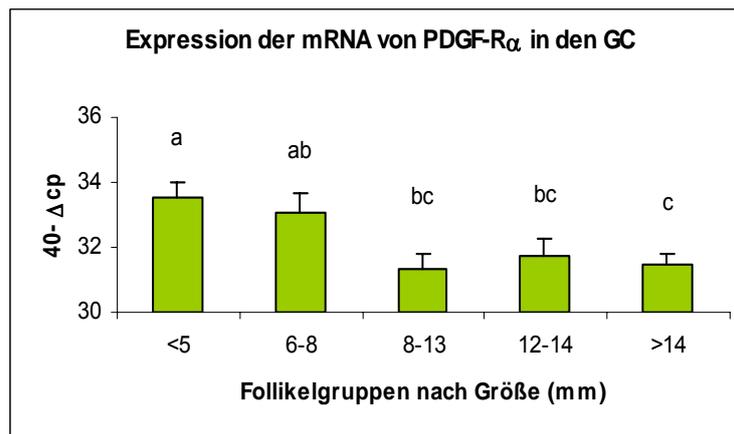


Abb.71: Expression der mRNA von PDGF-R $\alpha$  in den Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

#### PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ und PDGF-R $\beta$ in der TI:

PDGF-A und seine Rezeptoren zeigen eine leicht abfallende Tendenz während der Follikelreifung. Nur bei dem PDGF-R $\beta$  ist der Abfall der mRNA-Werte auch statistisch signifikant. PDGF-A und PDGF-R $\alpha$  sind während des Follikelwachstums nicht reguliert (Ergebnisse nicht gezeigt).

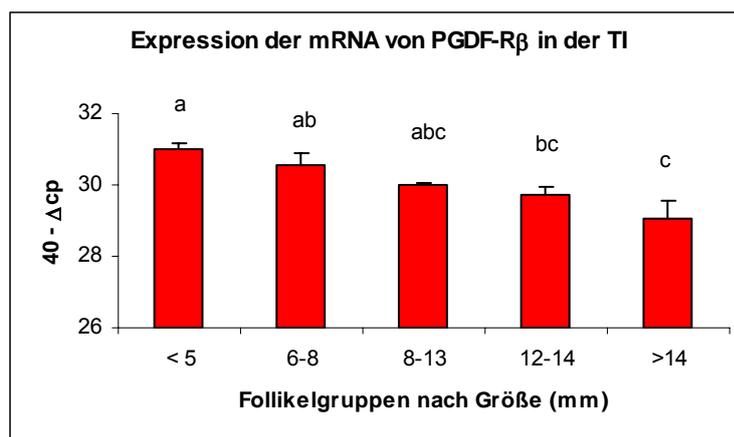


Abb.72: Expression der mRNA von PDGF-R $\beta$  in der Theca interna (TI) verschiedener Entwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta$ cp  $\pm$  SEM (n=7-12) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

4.4.3 Podoplanin

Podoplanin im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Die mRNA-Expression von Podoplanin im CL während des Zyklus und der Gravidität sind zu Beginn der lutealen Phase signifikant niedriger als bei ihrem Gipfel an Tag 13-16. Die Werte entsprechen zu diesem Zeitpunkt denen während der Trächtigkeit. Während der Regression fallen die gemessenen mRNA signifikant ab.

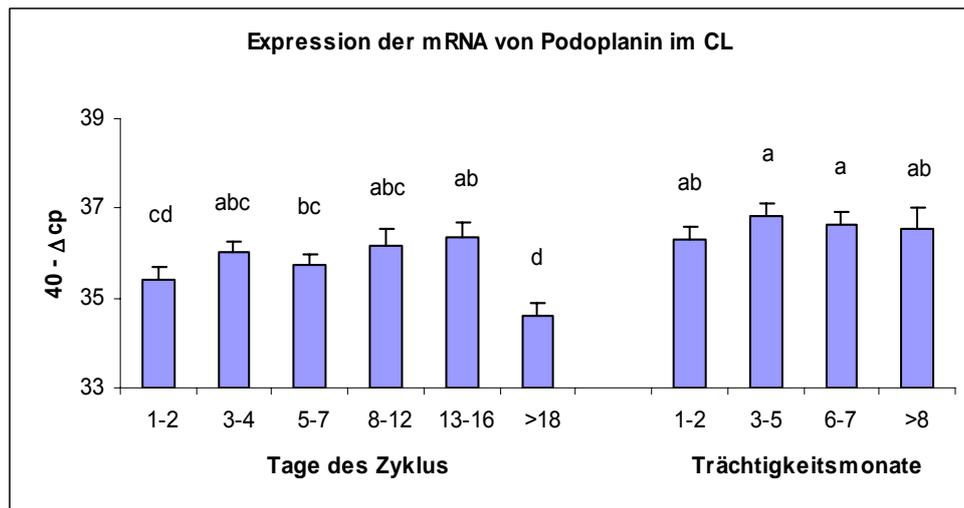


Abb.73: Expression der mRNA von Podoplanin im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=6-7) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

Podoplanin im CL während der induzierten Luteolyse:

Während der induzierten Luteolyse sind die Expressionsdaten zum Zeitpunkt 0,5 h nach der Injektion von PGF2 $\alpha$  noch signifikant niedriger als zu den Zeitpunkten 2 bis 24 h nach Auslösung der Luteolyse. Danach beginnen die Werte abzufallen.

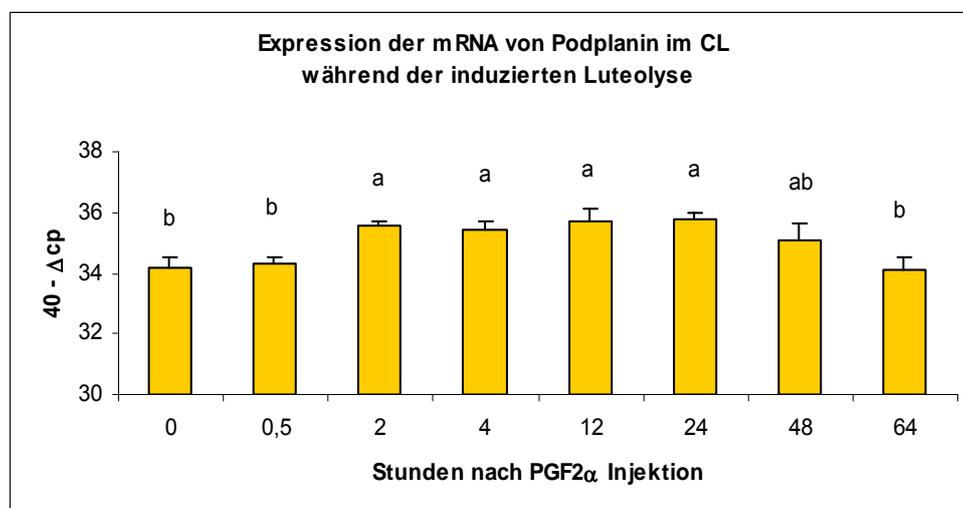


Abb.74: Expression der mRNA von Podoplanin im CL während der induzierten Luteolyse nach PGF2 $\alpha$  Injektion. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  (n=5) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05).

Podoplanin in den GC und der TI:

Während des Follikelwachstums fallen die mRNA-Werte von Podoplanin zum ersten Mal bei einer Follikelgröße von 8-13 mm und ein weiteres mal bei einer Größe von 12-14 mm signifikant ab. Der Faktor konnte zwar in der TI nachgewiesen werden, zeigt aber keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Follikelentwicklung (keine gezeigten Ergebnisse).

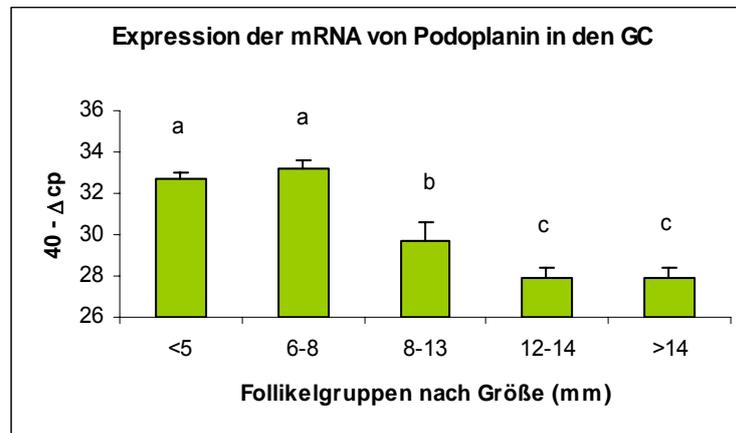


Abb.75: Expression der mRNA von Podoplanin in den Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

4.4.4 Homeobox-containing transcription Factor Prox1 (Prox-1)

Prox-1 im CL während des Zyklus und der Gravidität:

Die Expressionsdaten von Prox-1 sind zu Beginn der lutealen Phase bis einschließlich Tag 5-7 relativ niedrig und zeigen dabei leichte Schwankungen. Ab dem Tag 8-12 steigt die Expression massiv an und bleibt bis zur Regression der CL signifikant hochreguliert. Während der Trächtigkeit sind ebenfalls signifikante Veränderungen erkennbar.

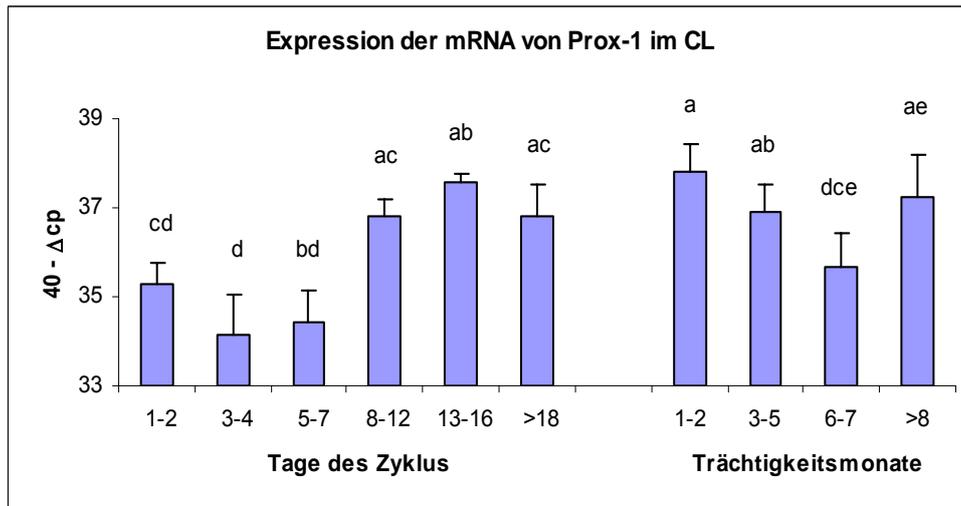


Abb.76: Expression der mRNA von Prox-1 im CL während des Zyklus und der Gravidität. Die Ergebnisse werden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=6-7$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Prox-1 im CL während der induzierten Luteolyse:

Die gemessene mRNA-Menge von Prox-1 während der induzierten Luteolyse steigt nur gering, aber statistisch nicht signifikant an (nicht gezeigte Ergebnisse).

Prox-1 in den GC und TI:

Für die mRNA von Prox-1 in den GC ließ sich keine signifikante Regulation beobachten (keine Ergebnisse gezeigt). In der TI ist die Prox-1 mRNA im Verlauf der Follikelreifung signifikant reguliert. Die Expressionsdaten zeigen einen Abfall von den kleinsten Follikel, über Zwischenstufen, hin zu den niedrigsten Werten bei den reifen Follikeln.

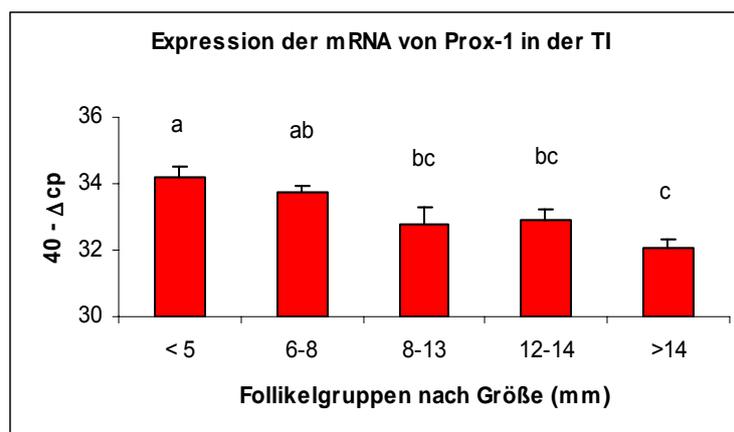


Abb.77: Expression der mRNA von Prox-1 in der Theka interna (TI) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als 40 minus Mittelwert der  $\Delta cp \pm SEM$  ( $n=7-12$ ) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Einteilung der Follikelgruppen erfolgte anhand der Follikelgröße und der Oestradiol- $17\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit (Follikelgruppen: <5 mm = <0,5 ng/ml; 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

---

## 5. Diskussion

### **5.1 Normalisierung der mRNA-Expressionsdaten**

Bei der qPCR können leicht spezifische Fehler bei der Quantifizierung der RNA Transkripte auftreten, die schon durch geringe Schwankungen bei der eingesetzten RNA Menge entstehen. Dies kann durch Pipettierfehler, ungenaues Messen der mRNA Menge in den Extraktionsproben oder fehlerhaftes Verdünnen der Proben bei der RT passieren. Die Quantifizierungsfehler sind besonders dann relevant, wenn die Proben, wie in diesem Fall, von unterschiedlichen Individuen stammen und können zu Fehlinterpretationen der Expressionsprofile der untersuchten Faktoren führen. Die allgemein akzeptierte Methode um solche Fehler zu minimieren und die Varianz zwischen den einzelnen Proben zu korrigieren ist, eine zelluläre RNA zu amplifizieren, die als interne Referenz dient, gegen die die anderen RNA Werte normalisiert werden können (Karge et al., 1998). Der ideale Standard sollte in den Geweben der verschiedenen Individuen und während unterschiedlicher Behandlungen und Zeitpunkten auf konstantem Level exprimiert werden.

Die hier untersuchten Gewebe unterliegen alle massiven Veränderungen. In sehr kurzer Zeit finden drastische Umbauvorgänge statt, die es schwer glauben lassen, dass die Housekeeper auch z.B. während den extrem schnellen Abbauvorgängen während der Luteolyse immer auf gleichem Niveau in allen Zellen des CL zu finden sein sollen. Mit Histon konnte ein nicht regulierter Housekeeper gefunden werden, der zudem das ursprünglich Regulationsverhalten der Faktoren vor der Normalisierung nicht maßgeblich beeinflusste.

## 5.2 Angiogene Faktoren

### 5.2.1 VEGF-A, VEGF-B und ihre Isoformen

#### *VEGF-A und seine Isoformen:*

Für die Isoformen von VEGF-A ließen sich im CL während des Zyklus und der Gravidität sehr deutliche Regulierungen beobachten. Alle drei Faktoren waren zu Beginn der lutealen Phase hoch exprimiert und fielen gegen Ende des Zyklus immer weiter ab, um während der Regression schließlich ihren Tiefpunkt zu erreichen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Berisha et al. (2000b) überein, der die mRNA von gesamt-VEGF-A im bovinen CL untersuchte. Hier wurde die Expression der Isoformen VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> im einzelnen näher beleuchtet und gezeigt, dass im Verlauf des Zyklus alle drei in ähnlicher Weise herunterreguliert werden.

VEGF-A ist der potenteste bekannte natürliche Faktor zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Es wirkt 50.000 Mal stärker als Histamin (Dvorak et al., 1999) und erzielt selbst unter 1nM Effekte. Es ist außerdem ein starkes Mitogen für Endothelzellen (EC) (Connolly, 1991). Im sich entwickelnden und heranwachsenden CL findet massive Gefäßneubildung statt und es wird so zu einem der best durchbluteten Gewebe des Körpers (Wiltbank et al., 1998). Im reifen CL ist nahezu jede parenchymale Zelle mit mindestens einer Kapillare in Kontakt, was die enorme Wichtigkeit der Angiogenese für die CL-Funktion unterstreicht (Christenson und Stouffer, 1996; Gaytan et al., 1999; Kaczmarek et al., 2005). Es ist daher nicht überraschend, dass die höchsten Expressions- und Proteinwerte für VEGF-A zu Beginn der lutealen Phase zu finden sind, während das CL am stärksten vaskularisiert wird. In der Trächtigkeit stellten sich (bis auf einen Anstieg von VEGF-A<sub>189</sub> von den Trächtigkeitmonaten 1-2 auf die Monate 6-7) keine signifikanten Schwankungen dar. Die Expressionsdaten liegen jedoch relativ hoch und so lässt sich mutmaßen, dass VEGF-A eine erhaltende Funktion auf die EC ausübt und, dass alle drei Isoformen daran beteiligt sind. Alan et al. (1995) zeigte nämlich, dass ein gewisser Schwellenwert von VEGF-A nicht unterschritten werden darf und der Faktor notwendig ist, um die Apoptose von EC zu verhindern und neu geformte Blutgefäße zu stabilisieren. Weiterhin ist zu beachten, dass VEGF-A<sub>165</sub> die vorwiegend exprimierte Form war, deren mRNA-Menge dauerhaft über denen von VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> lag. Dies lässt darauf schließen, dass VEGF-A<sub>165</sub> die wichtigste Isoform sein könnte. Sie bindet bekanntlich an beide Co-Rezeptoren, Neuropilin (Npr.)-1 und Npr.-2, wodurch sein vermitteltes Signal verstärkt wird und es eine massivere Antwort hervorruft. Auf die Regulierung von Npr.-1 und Npr.-2 als Co-Faktor für VEGF-A wird später in der Diskussion noch näher eingegangen. Es ist wahrscheinlich auf seine Vielseitigkeit und Effektivität als ein

angiogener Faktor und EC Mitogen zurückzuführen, dass VEGF-A<sub>165</sub> in so großem Umfang exprimiert wird (Ferrara und Davis-Smyth, 1997).

Die Ergebnisse für die VEGF-A Isoformen während der induzierten Luteolyse stehen in Einklang mit denen, die Neuvians et al. (2004) gemacht haben. Allerdings wurde damals die gesamte VEGF-A Expression betrachtet, ohne die einzelnen Isoformen für sich zu bestimmen. Die drei untersuchten VEGF-A Isoformen veränderten sich auch während der Luteolyse in paralleler Weise. Diese Co-Expression und Co-Regulation bekräftigen die Theorie, dass die Isoformen zusammenwirken könnten und gemeinsam einen räumlichen Signalgradienten aufbauen. In Übereinstimmung mit den gefundenen Ergebnissen überwiegen die kleineren und löslicheren Isoformen VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub>. Die Expression der VEGF-A Isoformen beginnt ca. 2 h nach der PGF2 $\alpha$ -Injektion zu fallen, also bereits während der funktionalen Luteolyse. Die VEGF-A produzierenden Zellen (vor allem die glatten Muskelzellen, Pericyten und Lutealzellen) haben das Signal zur Luteolyse erhalten und regulieren infolgedessen, die nun nicht mehr benötigten angiogenen Faktoren herunter (Vonnahme et al., 2006; Berisha et al., 2000b). Der leichte Anstieg gegen Ende der Messung könnte am wachsenden prozentualen Anteil der SMC liegen. Laut der Studie von Neuvians et al. (2004) fällt die VEGF-Protein Konzentrationen nach der Induktion der Luteolyse bereits nach 2 h ab. So wird der stimulierende Effekt dieses Faktors sofort auf ein Mindestmaß reduziert. In dieser Studie wurden auch die mRNA-Regulierungen des VEGF-R1 und VEGF-R2 untersucht. Verglichen mit dem Trend der mRNA von VEGF-A wurde ein verzögerter Abfall während der strukturellen Luteolyse beobachtet (Neuvians et al., 2004). Es wäre möglich, dass durch das Fehlen oder das reduzierte parakrine VEGF-A Signal während der induzierten Luteolyse die mikrovaskuläre EC-Funktion und das Überleben der Zellen nicht ausreichend erhalten werden kann. Die folgende Degradierung des Endothels und der Lutealzellen könnten dann der Grund für die verminderte Produktion der VEGF-Rezeptoren sein.

Im Gegensatz zu Phillips et al. (1990), der in den GC von Ratten wenig oder keine mRNA von VEGF (außer in den Cumuluszellen) nachweisen konnte, ist die der Isoformen von VEGF-A definitiv in den GC des Rindes vorhanden – und stark reguliert. Auch in den GC zeigt sich wieder der parallele Expressionstrend der Isoformen und das tendenzielle Überwiegen der Faktoren VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub>. Alle drei Isoformen steigen mit dem Erreichen einer Follikelgröße von 12-14 mm signifikant an. Auch bei Berisha et al. (2000a) ließ sich diese Entwicklung für gesamt-VEGF-A feststellen. Er beschrieb bereits, dass das Ziel des produzierten VEGF-A wohl nicht in der GC selbst liegt, sondern die EC der TI erreichen sollen, wo seine beiden Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 exprimiert werden (De Vries et al., 1992; Terman et al., 1992). Die starke Expression der mRNA dieser angiogenen Faktoren in den reifen Follikeln unterstützen die Annahme, dass sie für die

Blutgefäßbildung, die das Follikelwachstum und Selektion zum dominanten Follikel begleitet, von großer Bedeutung ist. Es ist bekannt, dass das mikrovaskuläre Netzwerk eines selektierten Follikels mindestens doppelt so stark ausgeprägt ist, wie bei weniger reifen Follikeln. Die größere Kapillardichte führt zu einer höheren Verfügbarkeit von Gonadotropinen des dominanten Follikels (Zeleznik et al., 1981). Dies ist beim Prozess der Selektion eines dominanten Follikels sehr wichtig, da hierbei ein Mechanismus notwendig ist, der es einem einzigen Follikel erlaubt zu überleben, weil für ihn Gonadotropinkonzentrationen herrschen, während die der anderen Follikel nicht mehr ausreichen um sie weiter wachsen zu lassen (Zeleznik und Kubik, 1986). Außerdem bildet das in den GC gebildete VEGF-A einen Gradienten zur TI hin aus. Die Diffusion zur TI wird durch die Dominanz der kleineren, löslicheren Isoformen VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub> noch erleichtert. Dies dürfte dazu führen, dass die Kapillaren sich direkt unterhalb der Basalmembran lokalisieren und damit die kürzeste Diffusionsstrecke zu den GC etablieren (Berisha et al., 2000a).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in der TI für alle drei Isoformen während des Follikelwachstums keine statistisch signifikanten Regulierungen. Zu beachten ist jedoch, dass VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub> durchaus eine ansteigende Tendenz mit Zunahme des Follikeldurchmessers zeigen. Auch hier dominiert die Expression von VEGF-A<sub>165</sub> gegenüber den anderen beiden Isoformen. Die Lokalisation von VEGF-A in der TI und in EC (Berisha et al., 2000a) lässt vermuten, dass Theka VEGF-A direkt die Angiogenese stimulieren und GC VEGF-A als Chemokin die Lokalisation von Kapillaren an der Basalmembran beeinflusst.

### *VEGF-B und seine Isoformen:*

Die VEGF-B Isoformen zeigten einen anderen Trend als die von VEGF-A. Beide Isoformen haben im CL des Zyklus zu Beginn eine höhere Expression als im weiteren Verlauf der lutealen Phase. Sie sanken während der Mitte der lutealen Phase ab, um während der Regression erneut massiv und statistisch signifikant anzusteigen. Während der Gravidität ließ sich für die Faktoren ebenfalls ähnliches Verhalten beobachten. VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>189</sub> zeigen hier keine signifikanten Veränderungen ihrer Expression. Die Expressionsdaten lassen jedoch erkennen, dass VEGF-B<sub>167</sub> der überwiegende Faktor ist. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren überein, die ebenfalls feststellten, dass VEGF-B<sub>167</sub> die wichtigste Isoform von VEGF-B ist (Waltenberger et al., 1994; Olofsson et al., 1998; Scrofani et al., 2000).

Das Expressionsprofil der VEGF-B Isoformen entspricht nicht dem eines klassischen angiogenen Faktors, so wie bei VEGF-A. Es ist auffallend, dass der drastische Abfall in der spätlutealen Phase und während der Regression des CL nicht auftritt. Im Gegenteil, in beiden Fällen gibt es einen klaren Aufwärtstrend. Zahlreiche Studien deuteten die

Redundanz von VEGF-B als angiogenen Faktoren bereits an. Die vorliegenden Ergebnisse lassen ein weiteres Mal in Frage stellen, ob VEGF-B wirklich angiogen wirkt. Seine Aufregulierung scheint vielmehr dem Schutz bereits bestehender Strukturen zu dienen (s. weiter unten). Die VEGF-B Isoformen zeigen eine große Homologie, unterscheiden sich aber im Exon 8, welches auf VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub> hydrophile beziehungsweise hydrophobe Enden überträgt. VEGF-B<sub>167</sub> ist daher membrangebunden, während VEGF-B<sub>186</sub> frei sezerniert wird. So spielt VEGF-B<sub>167</sub> wohl keine direkte Rolle bei der Angiogenese, aber es wurde gezeigt, dass es an Membranen gebunden Heterodimere mit VEGF-A<sub>165</sub> bildet und so seine Bioverfügbarkeit kontrolliert. Die Bedeutung von VEGF-B in der Gefäßneubildung wurde schon länger angezweifelt. Umfassende neue Studien haben dann gezeigt, dass VEGF-B ein wirksamer anti-apoptotischer Faktor ist, der seine Wirkung über den VEGF-R1 vermittelt, was auf eine funktionserhaltende Wirkung für die Kapillar-EC schließen lässt (Li et al., 2008). Beide Isoformen steigen am Ende des Zyklus massiv an, wobei es sich um eine „anti-apoptotische“ Antwort des CL auf die Regression handeln könnte. Die Regression des CL ist durch massive Apoptose gekennzeichnet und es wäre möglich, dass vermehrt VEGF-B gebildet wird, um das umliegende Gewebe vor eben dieser Apoptose zu schützen. Dazu dürfte aber auch VEGF-A benötigt werden. Dieses ist hier jedoch nicht mehr vorhanden und so schreitet die Apoptose voran.

Für die Isoformen von VEGF-B im CL während der induzierten Luteolyse muss bezüglich der Ergebnisse von VEGF-B<sub>167</sub> berücksichtigt werden, dass der Unterschied zwischen den höchsten und den niedrigsten cp-Werten innerhalb eines Zyklus liegt, die Regulationen also relativ schwach waren. Die mRNA Expression schien am Ende der funktionalen Luteolyse am schwächsten zu sein. Ein offensichtlicherer Anstieg während der fortgeschrittenen Luteolyse konnte für die lösliche Form, VEGF-B<sub>186</sub>, bestimmt werden. In der Annahme, dass die VEGF-B Isoformen in SMC exprimiert werden (Aase et al., 1999), welche während der Luteolyse stabil sind, kann der Anstieg als eindeutig transkriptional reguliert, betrachtet werden. In Bezug auf die Theorie von Li et al. (2008) kann dieses Phänomen durch die anti-apoptotischen Effekte von VEGF-B erklärt werden. VEGF-B könnte dazu beitragen diesen Mechanismus einzudämmen oder abzugrenzen, indem es apoptotische Signale blockiert, um allzu exzessive Gewebeauflösung zu verhindern. Nach den beobachteten Resultaten zu urteilen, würde VEGF-B<sub>186</sub> die wichtigere Rolle in diesem Zusammenhang spielen, möglicherweise aufgrund einer effektiveren Verteilung des Faktors im CL und dem umliegenden Gewebe. Diese Theorie sollte noch mit Hilfe spezifischer Apoptose-Assays bestätigt werden, da Li's Analysen hauptsächlich auf das neuronale Überleben in Mäusen und Ratten fokussiert waren (Li et al., 2008). Zu diesem Zeitpunkt ist der VEGF-B Rezeptor VEGF-R1 allerdings herabreguliert (Berisha et al., 2000b), wahrscheinlich aufgrund der EC

Regression. VEGF-B<sub>186</sub> kann daher seine Funktion lediglich auf die restlichen intakten EC und andere empfängliche Zellen, die den Rezeptor exprimieren, ausüben.

In den GC und TI von Follikeln unterschiedlicher Entwicklungsstadien konnte für VEGF-B<sub>167</sub> keine Auswertung der qPCR erfolgen, es liegen daher keine Ergebnisse für diesen Faktor in GC und TI vor. Die löslichere Isoform VEGF-B<sub>186</sub> steigt in den GC, so wie die Splicingvarianten von VEGF-A, mit dem Wachstum der Follikel an. Ab einer Durchschnittsgröße von 12-14 mm liegen die Expressionsspiegel signifikant höher als bei den unreifen Follikeln mit < 5 mm. Dies steht wieder im Einklang mit den Messungen von gesamt VEGF, die Berisha et al. (2000a) durchgeführt hat. VEGF-B<sub>186</sub> zeigt in der TI ein konstant hochreguliertes Verhalten von den Follikeln unter 5 mm Größe, bis hin zu denen mit 12-14 mm Durchmesser. Sobald der Durchmesser jedoch über 14 mm steigt (und damit die Endreifung des Follikels erfolgt), fallen die mRNA Werte von VEGF-B<sub>186</sub> signifikant zu dem vorher gemessenen Niveau ab. Dieses Expressionsverhalten in der TI (und teilweise auch in den GC) zeigen mehrere der untersuchten Faktoren (s. Übersicht am Ende des Kapitels).

### 5.2.2 Neuropillin-1 und Neuropilin-2 (Nrp.)

Aufgrund ihres nur kurzen intrazellulären Schwanzes können die Neuropiline (Nrp.) nicht für sich alleine wirken, sondern sind abhängig von der Bindung an die VEGF-Rezeptoren (Soker et al., 1998). Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Rolle der Nrp. unterschiedlich und hängt in hohem Maße von ihren jeweiligen Bindungspartnern ab. Vergleicht man die Expressionsdaten von VEGF-Rezeptoren und Nrp. kann man die Liste möglicherweise einschränken und die Hauptfunktion des jeweiligen Nrp. in CL und Follikel vorhersagen.

Das Expressionsverhalten von Nrp.-1 deckt sich im CL während des Zyklus mit dem von VEGF-R2, welches wiederum den hier erlangten Ergebnissen von VEGF-A höchstähnlich ist (Berisha et al., 2000) und wieder auf die Beteiligung von Nrp.-1 bei der Angiogenese hinweist. Dies steht wiederum in Einklang mit einer Veröffentlichung von Shimizu et al. (2008), die Nrp.-1 ebenfalls mit der Angiogenese im Follikel in Verbindung gebracht hat. So wie die VEGF-A Isoformen und der VEGF-R2 könnte auch Nrp.-1 durch Sauerstoffmangel in den Zellen reguliert werden. Zur spätlutealen Phase hin erlischt die Angiogenese und die Nrp.-1 Herunterregulierung begleitet die von VEGF-R2 und VEGF-A, wenngleich mit einer leichten zeitlichen Verzögerung. Dies bekräftigt die Aussage von Soker et al. (2002) und anderen Autoren, die postulierten, dass Nrp.-1 sehr wichtig für die Regulation von VEGF-A<sub>165</sub> ist, denn beide werden zur gleichen Zeit in ähnlicher Art und Weise exprimiert. Zu Beginn der Trächtigkeit sind in den hier vorliegenden Ergebnissen die Expressionswerte von Nrp.-1 höher als sie sich während des restlichen Verlaufs der Gravidität zeigen. Nrp.-1 vermittelt zusammen mit VEGF eine EC-erhaltende Wirkung (Soker et al., 2002; Mäkinen et al., 1999)

und unterstützt somit das CL – gerade in der Anfangszeit der Gravidität – und später konstant auf hohem Niveau. Zwischen dem Expressionsverhalten von Nrp.-2 im CL während des Zyklus und dem von VEGF-R3 lässt sich im Verlauf der lutealen Phase eine Ähnlichkeit erkennen. Beide steigen im Verlauf des Zyklus an, allerdings steigt Nrp.-2 hier während der Regression noch weiter an, während der VEGF-R3 zu diesem Zeitpunkt signifikant abfällt. Es wäre möglich, dass der Nrp.-2/VEGF-R3-Komplex während der lutealen Phase besteht, um die VEGF-C vermittelte Lymphangiogenese zu fördern (Yuan et al., 2002). Dies steht in Einklang mit dem Abfall von VEGF-R3 zur Regression, da sowohl Angiogenese, als auch Lymphangiogenese in der spätlutealen Phase bereits abgeschlossen sind. Aus den vorliegenden Daten lässt sich daher schließen, dass die Regulation dieser Prozesse in höherem Maße durch die Regulation der VEGF-Faktoren beeinflusst wird und die mRNA-Menge von Nrp.-2 nur eine sekundäre und unterstützende Rolle für die Mechanismen im CL spielt. Während der Trächtigkeit war keine Veränderung der Regulation zu erkennen. Wahrscheinlich hat Nrp.-2 auch hier keinen maßgeblich wichtigen Einfluss auf das gravide CL.

Der Faktor Nrp.-1 zeigte während der induzierten Luteolyse wieder ein ähnliches Expressionsprofil wie die VEGF-Rezeptoren. Er wird hauptsächlich in Arterien und ihren Kapillaren gefunden (Herzog et al., 2001) und so kann der Abfall des mRNA-Spiegels in der Involution dieser mikrovaskulären Strukturen begründet sein - gerade, weil das Absinken erst in der strukturellen Luteolyse auftritt, während der funktionalen Luteolyse aber noch konstant hoch exprimiert wird. Im Gegensatz zu Nrp.-1 bleibt Nrp -2 nahezu unreguliert (außer einem kurzen Anstieg 0,5 h nach Injektion des PGF2 $\alpha$ -Analogons treten keine Veränderungen während der Messzeit mehr auf). Wenn man davon ausgeht, dass Nrp.-2 vorwiegend in Venen und lymphatischen Strukturen lokalisiert ist (Herzog et al., 2001; Karkkainen et al., 2002), könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die genannten Gefäße zeitverzögert abgebaut werden.

In den GC nimmt die gemessene Menge an mRNA von Nrp-1 zu und verläuft damit wieder einmal parallel zu dem Trend der VEGF-A Faktoren und seinen Rezeptoren. Damit bestätigt sich wiederholt das Zusammenwirken des Co-Faktors mit den VEGF-R1 und R2 wie auch bei Karkkainen et al., 2002) – auch in der GC des bovinen Follikels.

Die Expressionsdaten von Nrp.-2 in den GC sind bis zu einer Follikelgröße von 8-13 mm hochreguliert, fallen jedoch mit der weiteren Größenzunahme signifikant ab. Den gleichen Verlauf der mRNA Werte zeigen sowohl Nrp.-1, als auch Nrp.-2 in GC und ebenfalls in der TI. Das Expressionsniveau fällt bei den ausgereiften Follikeln ab. Es wäre möglich, dass die Faktoren nur zu Beginn der Angiogenese gebraucht werden und bei den großen Follikeln, wo die Gefäße nur noch erhalten werden müssen, nicht mehr benötigt werden. Es wäre sicher sinnvoll dies auch auf Proteinebene noch genauer zu untersuchen.

### 5.2.3 Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-1 $\alpha$ )

HIF-1 $\alpha$  ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der ganz bedeutend auf die Regulation der Expression von angiogenen Faktoren, wie VEGF-A, einwirken kann. Die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression zeigte im CL des Zyklus eine klare Herunterregulierung von der früh- hin zu spätlutealen Phase und fiel während der CL-Regression noch weiter signifikant ab. Dies spiegelt das Expressionsprofil der VEGF-A Isoformen wieder und steht im Einklang mit zahlreichen Veröffentlichungen, die behaupten, dass die mRNA-Expression von VEGF-A in großem Umfang durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert wird (Dachs et al., 2000; Rhyan et al., 2000; Tsuzuki et al., 2000). Es ist allgemein anerkannt, dass HIF-1 $\beta$  konstitutiv exprimiert wird, während HIF-1 $\alpha$  kontinuierlich synthetisiert und durch Ubiquitin-Proteosome abgebaut wird (Huang et al., 1998). Der Abbau der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit wird durch Sauerstoffmangel gehemmt, was die Stabilisierung und Lokalisierung des funktionsfähigen HIF-1 Transkriptionsfaktors im Kern ermöglicht. Die hier erlangten Ergebnisse zeigen, dass die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durchaus auch auf transkriptioneller Ebene reguliert werden und nicht nur auf Proteinebene, wie von einigen Autoren postuliert wurde (Wenger et al., 1997; Page et al., 2002). Die genauen Mechanismen dieser Regulation müssen jedoch noch weiter beleuchtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Transkription von HIF-1 $\alpha$  selbst durch Sauerstoffmangel oder Stressbedingungen im noch relativ gefäßarmen, sich entwickelnden CL ausgelöst wird. Seine mRNA-Spiegel sinken nämlich konsequenterweise in der Phase des Zyklus wieder ab, wenn keine Angiogenese mehr nötig ist und keine Stressbedingungen durch Sauerstoffmangel mehr vorliegen. Während der Trächtigkeit ließ sich keine Regulation feststellen. Im gut vaskularisierten graviden CL herrschen schließlich normoxische Bedingungen und so führt das Fehlen von Stresssignalen wohl dazu, dass die HIF-1 $\alpha$  Genexpression unreguliert, auf konstantem Niveau, bleibt.

Die mRNA für den für die Stimulierung von VEGF-A wichtigen Faktor wurde während der Luteolyse nicht herabreguliert. In einer Studie von Neuvians et al. im (2003) wurden die mRNA-Spiegel von IGF-1 während der Luteolyse untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass dieser Faktor nicht reguliert wird, was mit den hier vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt, da es bewiesen ist, dass IGF-1 die HIF-1 $\alpha$  Expression beeinflusst. Es muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass viele Autoren der Meinung sind, dass HIF-1 $\alpha$  sehr stark auf Proteinlevel reguliert wird (Wenger et al., 1997; Page et al., 2002). Während der Luteolyse wurde festgestellt, dass der Blutfluss durch die Aktivität von PGF $2\alpha$  zurückgeht. Auf der anderen Seite heißt es, dass hier auch NO freigesetzt wird und Vasodilatation verursacht (Vonnahme et al., 2003). Insgesamt wird jedoch angenommen, dass während der Luteolyse eine normale Sauerstofflage vorliegt, was bedeuten würde, dass das HIF-1 $\alpha$

Protein schnell abgebaut und so das rasche Absinken von VEGF-A erklärt werden könnte. Weitere Studien auf Proteinlevel könnten hier eine noch bessere Einsicht gewährleisten.

In den GC steigt mit dem Durchmesser der Follikel auch die gemessene Menge an mRNA von HIF-1 $\alpha$  an und zwar signifikant bei der Entwicklung der Follikel von 6-8 mm auf 8-13 mm Größe und dann noch einmal beim Erreichen von 12-14 mm. Damit zeigt der Faktor auch in den GC den typischen Expressionstrend eines angiogenen Faktors. Der Anstieg der mRNA ähnelt dem von VEGF-A. Auch in der TI wird die HIF-1 $\alpha$  mRNA signifikant aufreguliert, wenn die Follikel einen Durchmesser von 12-14 mm erlangt haben und verhalten sich damit so wie in den GC - und so wie man es nach den Messungen von Berisha et al. (2000a), auch für VEGF-A erwartet hätte. Seine Isoformen stiegen, wie erwähnt, zwar gering an, nicht aber so stark wie beispielsweise in den GC oder wie die gesamte RNA von VEGF in der TI bei Berisha et al. (2000a). Warum die Werte bei den > 14 mm großen Follikel wieder abnehmen ist nicht ganz klar, könnte aber damit erklärt werden, dass der reife Follikel mittlerweile so viele Gefäße zu seiner Versorgung entwickelt hat, dass keine Sauerstoffmangelsituation bei ihm mehr auftritt.

Auch auf Proteinebene gelang hier der eindeutige Nachweis von HIF-1 $\alpha$ . Seine Lokalisation konnte durch die immunhistochemische Untersuchung mit einem spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Antikörper im CL bestimmt werden. Die interessantesten neuen Erkenntnisse wurden bei der Analyse der ganz jungen, 1-2 Tage alten CL erlangt. Hier fiel bereits in der 10x Vergrößerung die starke positive Braunfärbung von Zellen entlang der Falten auf, die sich dadurch bilden, dass nach Austritt der FF während der Ovulation, die ehemalige Follikelblase durch Faltenbildung einstülpt. Bei noch weiterer Vergrößerung sind dann die DAB angefärbten (Visualisierung der Peroxidase, vgl. 3.19.1), HIF-1 $\alpha$  positiven, Zellen eindeutig von den umliegenden negativen Zellen zu differenzieren. Es ist seit langer Zeit bekannt, dass gerade in der periovulatorischen Phase eine massive Einwanderung von Immunzellen aus den Gefäßen der TI in das junge CL stattfindet. Bereits vor über 40 Jahren beschrieben Cupps et al. (1959) deren Anwesenheit in präovulatorischen Follikeln. Am Anfang der CL-Bildung steigt der Prozentsatz der Eosinophilen, an den gesamten CD18 positiven Zellen, sehr schnell auf ca. 90 und mehr an (Integrine des  $\beta_2$ -Typs werden bekanntermaßen nur von mono- und segmentkernigen Granulozyten exprimiert (Bosmann, 1993). Diese Integrine enthalten eine CD18 Kette, die mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen werden kann). Nach Rohm et al. (2002) sind die Eosinophilen in frisch rupturierten Follikeln hauptsächlich um die Mikrogefäße in der äußeren Schicht der TI lokalisiert. Es wurde vermutet, dass diese die GC durchqueren und sich an den Falten bzw. den Faltenzwischenräumen ansammeln. Im weiteren Verlauf des Zyklus sinkt die Anzahl der Eosinophilen dann auf 30% während der mittlutealen Phase und auf 10% während der Regression ab. Zu diesen Zeitpunkten herrschen dann eher Makrophagen bzw. Mastzellen vor (Reibinger und Spänzel-Borowski,

2000). Die auffällige Lage der DAB-positiven Färbung in der Umgebung der Falten ließ einen Zusammenhang mit den eingewanderten Eosinophilen vermuten. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt eine Färbung vorgenommen, mit der Eosinophile spezifisch nachgewiesen werden können.

Durch die Hämalaun-Eosin-Färbung konnte gezeigt werden, dass es sich hochwahrscheinlich tatsächlich um Eosinophile handelt, die um die Falten in den jungen CL in großer Anzahl zu liegen kommen. Schon in der 20x Vergrößerung ließ sich ein Muster wie bei der HIF-1 $\alpha$  Anfärbung erkennen, nämlich eindeutig angefärbte Zellen im Vergleich zu umliegenden nicht angefärbten. Bei der 100x Vergrößerung lassen sich dann die rot gefärbten Granula der eosinophilen Granulozyten erkennen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die intensive Produktion von HIF-1 $\alpha$  in den 1-2 Tage alten CL von den eosinophilen Granulozyten durchgeführt wird. Die immunhistochemische Untersuchung und Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  in CL späterer Zeitpunkte des Zyklus, lieferte keine so eindeutigen Aussagen mehr. Die Verteilung der DAB positiven Bereiche und Zellen war diffuser und so können die vorliegenden Ergebnisse als erste Anhaltspunkte gewertet werden, denen ausführlichere Untersuchungen – auch in Paraffinschnitten – folgen sollten.

### **5.3 Anti-angiogene Faktoren**

Die mRNA aller untersuchten anti-angiogenen Faktoren konnte mit der qPCR in den verschiedenen Funktionsgebilden des bovinen Ovars nachgewiesen werden.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben postulieren viele Wissenschaftler, dass das Ereignis Angiogenese aus dem Zusammenspiel zwischen pro-angiogenen und anti-angiogenen Faktoren resultiert. Es sind also immer beide Parteien anwesend und je nachdem welche Fraktion überwiegt, findet Gefäßneubildung statt – oder eben nicht (Morelli et al., 1998). Anti-angiogene Faktoren können so gezielt die Angiogenese hemmen oder bei schwacher Expression auch indirekt die Angiogenese verstärken, da angiogene Faktoren wie VEGF-A oder FGF-2 besser wirken können. Die hier erlangten Ergebnisse in den CL und Zellen der Follikel bestätigen diese Annahme auch für die Regulation der Angiogenese während der verschiedenen Entwicklungsstadien im bovinen Ovar.

### 5.3.1 Vasohibin-1 und Vasohibin -2

Die beiden anti-angiogen wirkenden Faktoren werden durch VEGF aufreguliert, das bedeutet sie fungieren unter anderem als negative Feedback Regulatoren, um überschießende Angiogenese zu verhindern (Watanabe et al., 2004; Kerbel, 2004). Beide Splicingvarianten von Vasohibin werden im CL des Zyklus ähnlich exprimiert. Vasohibin-1 und Vasohibin-2 werden über den gesamten Verlauf des Zyklus hinweg konstant exprimiert. Der für die angiogenen Faktoren typische Abfall der Werte während der Regression tritt hier nicht auf. Nachdem die Gefäßneubildung an den Tagen 5-7 bereits abgeschlossen ist, ist die Expression der angiogenen Faktoren an den Tagen 13-16 auch für deren Erhalt nicht mehr nötig und beginnt abzufallen. Noch deutlicher ist dieser Abfall dann während der Regression des CL; hier überwiegen dann die immer noch hochregulierten anti-angiogenen Faktoren, da zu diesem Zeitpunkt nur noch wenig VEGF-A vorhanden ist. Dies ist erstaunlich, da VEGF, wie erwähnt, die Expression der Vasohibine stimuliert (Watanabe et al., 2004; Shen et al., 2006). Es scheint also noch andere Mechanismen zu geben, die für die hohen mRNA Mengen während der Regression verantwortlich sind. Das Resultat der starken anti-angiogenen und zurückgegangenen angiogenen Expression ist die Involution des CL – und die seiner Gefäße. Während der Trächtigkeit treten keine Schwankungen der Faktoren auf. Sie sind stabil und üben wohl weiterhin ihre Funktion als Gegenspieler zu immer noch weiterer Angiogenese aus (Kerbel, 2004). Das CL während der Gravidität muss schließlich nur erhalten bleiben und nicht noch mehr Gefäße ausbilden.

Auch über den gesamten Verlauf der Luteolyse hinweg zeigen Vasohibin-1 und Vasohibin-2 einen sehr ähnlichen Expressionsverlauf. Bei beiden Faktoren sind keine signifikanten Schwankungen zu beobachten. Die Expressionslevel bleiben konstant. Während der induzierten Luteolyse ist der allmähliche Abbau aller Strukturen des CL der vorwiegende Prozess. Die beiden anti-angiogenen Faktoren bleiben hochreguliert – auch wenn beispielsweise 48 h oder 64 h nach Injektion von PGF<sub>2</sub> $\alpha$  bereits die strukturelle Luteolyse eingesetzt - und der massive Abbau begonnen hat (Schams et al., 2003). Die Isoform Vasohibin-2 scheint anhand der mRNA-Menge, wie sie aufgrund der cp-Werte beurteilt werden kann, während der Luteolyse zu überwiegen. Die anti-angiogene Wirkung wird während der Luteolyse verstärkt, da VEGF-A Protein und mRNA deutlich abfallen.

Die Expression von Vasohin-1 und Vasohibin-2 ist generell in den kleinen Follikeln größer als in den reiferen. Vasohibin-1 ist in den Follikeln unter 5 mm Größe signifikant höher reguliert als in denen, die einen Durchmesser über 8 mm haben. Vasohibin-2 bleibt noch ein wenig länger aufreguliert, fällt dann aber bei den Follikeln ab 12 mm Größe ebenfalls signifikant ab. Erklären ließe sich diese Beobachtung dadurch, dass durch den unterdrückenden Einfluss des dominanten Follikels, in den meisten kleinen Follikel das Gleichgewicht der pro- und

anti-angiogenen Faktoren auf Seiten der anti-angiogenen liegt. Sie sind hochreguliert, die pro-angiogenen dagegen niedrig – es findet keine Gefäßneubildung statt – und damit auch keine weitere Reifung des kleinen Follikels. Nur die selektierten Follikel, über 12 mm, haben es dagegen (trotzdem) geschafft vermehrt Gefäße zu bilden und sich weiter zu entwickeln. Bei ihnen werden die anti-angiogenen Faktoren herunterreguliert, damit die weitere Ausbildung der Gefäße und die endgültige Reifung bis hin zur Ovulation ungestört ablaufen kann. Gleiches könnte auch für die Zellen der TI gelten. Auch hier sind die anti-angiogenen Faktoren in den Follikeln unter 5 mm am stärksten exprimiert. Mit dem Erreichen von 12-14 mm sinken die Werte dann, wie in der GC, ab – und es kann vermehrte Angiogenese in diesen selektierten, herangewachsenen Follikeln stattfinden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die Greenaway et al. (2005) für den ebenfalls anti-angiogenen Faktor TSP-1 und seinen Oberflächen-Zell-Rezeptor CD36 gemacht haben. Diese waren auch deutlich höher in den kleinen, sich entwickelnden, Follikeln der Kuh zu finden. Die mRNA-Konzentration von TSP in GC-Lysaten und in der FF nahm ab, wenn die Follikel sich weiter entwickelten.

### 5.3.2 Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 (TSP)

Die anti-angiogenen Eigenschaften dieser Faktoren lassen sich darauf zurückführen, dass sie die Zellmigration und Proliferation verhindern (Daniel et al., 2007; Thomas et al., 2008), sowie gezielt zur Apoptose von EC führen (Tamanini und De Ambrogie, 2004). Für TSP-1 und TSP-2 lässt sich im CL des Zyklus das Gleiche sagen wie zu den Vasohibinen. Auch sie bleiben während der Zyklustage 13-16 und vor allem während der Regression hochreguliert. Die anti-angiogenen Effekte überwiegen also zu diesem Zeitpunkt des Zyklus im CL und es findet kein Gefäßaufbau, sondern -abbau statt. Auch Tamanini und De Ambrogie (2002) beschrieben, dass anti-angiogene Faktoren wie die TSP während der lutealen Phase ansteigen um eine allzu exzessive Gefäßentwicklung zu verhindern und dadurch, dass sie die Apoptose von EC stimulieren und somit die Angioregression auslösen, wenn keine Trächtigkeit vorliegt. Für die Regulation der Faktoren während der Trächtigkeit gilt wohl das Gleiche wie für die Vasohibine. Auch sie bleiben zu einem gewissen Grad konstant exprimiert.

Im CL nach der induzierten Luteolyse zeigt TSP-1 ein etwas anderes Expressionsprofil als die konstant regulierten Vasohibine. TSP-1 steigt nämlich ab der Induktion durch PGF $2\alpha$  über den Verlauf der funktionalen Luteolyse an und fällt dann während der strukturellen, 24 h später, signifikant ab. Auch 48 h nach Auslösung der Luteolyse sind die Werte für TSP-1 noch niedrig, aber dann steigen sie langsam wieder an. Es könnte also sein, dass der Faktor nicht der bedeutendste anti-angiogene im CL ist, da er mit dem Beginn des Abbaus während

der strukturellen Luteolyse sehr schnell verschwindet und so den weiteren Degenerationsprozess nicht mehr unterstützen kann - bzw. nicht dafür gebraucht wird.

Dies sieht für seinen Verwandten TSP-2 etwas anders aus, denn dieser steigt, während die Luteolyse einsetzt, immer weiter an – auch über den Beginn des strukturellen Abbaus des CL hinweg. 24 h nach Auslösung der Luteolyse ist er immer noch hoch exprimiert und beginnt erst nach 48 h abzufallen.

In den GC der unterschiedlich entwickelten Follikel kann das Expressionsprofil der beiden TSP mit denen der Vasohibin verglichen werden. Die mRNA-Werte sind, in den kleinen Follikeln noch sehr hoch und fallen spätestens mit dem Erreichen von 12-14 mm endgültig ab (bei TSP-2 ist ein kleiner Anstieg bereits an den Tagen 8-13 zu erkennen). Zu diesen Ergebnissen gelangten auch Greenaway et al. (2005), die das Protein von TSP-1 und seinem Rezeptor CD36 vermehrt in den GC der kleinen Follikel fanden und weniger in den weiter entwickelten. In diesen Follikeln findet keine Hemmung der Angiogenese mehr statt, sie können Gefäße ausbilden und weiter reifen, während die anderen Follikel ihrer Kohorte der Atresie unterliegen. Dass TSP-1 während der Follikelatresie ansteigt fanden auch Thomas et al. (2008) heraus. In den Zellen der TI der unterschiedlich entwickelten Follikel zeigt TSP-2 eine stärkere und eindeutige Regulierung, die sich mit der der Vasohibine deckt. TSP-1 ist dagegen nicht statistisch relevant reguliert, wobei auch hier ein Abfall der Expressionswerte bei den am weitesten entwickelten Follikeln zu beobachten ist, welche auch das beste Gefäßsystem besitzen, dessen Ausbildung nicht gehemmt wurde und wird. Petrik et al. (2002) konnten die TSP-1 und CD36-Proteine bei Ratten während der frühen antralen Phase nachweisen und zeigten ebenfalls, dass diese hauptsächlich in den GC lokalisiert sind. Zudem fanden auch sie, dass die Expression der TSP in den Follikeln während der Reifung abfällt, während im Gegenzug die der VEGF-Faktoren anstieg.

### 5.3.3 Oberflächenantigene CD36 und CD47

Diese beiden Oberflächenantigene binden TSP und dienen ihnen als Rezeptoren (Isenberg et al., 2006; Greenaway et al., 2005). Ihre mRNA konnte hier in den Geweben des bovinen Ovars nachgewiesen werden. Die Rezeptoren für die TSP zeigen während der lutealen Phase unterschiedliches Expressionsverhalten. Während CD47 das bereits bekannte gleichmäßige Profil der anti-angiogenen Faktoren zeigt, wie es für die Vasohibine und TSP während des Zyklus zu beobachten war, verläuft CD36 anders. Nach seinen niedrigsten Werten an den Tagen 3-4 steigt es an den Tagen 5-7 und 8-12 jeweils signifikant an und erhöht sich während der Regression nochmals stark. Die Expression steigert sich also im Verlauf des Zyklus und ist dann am Höchsten, wenn seine anti-angiogenen Liganden TSP-1 und TSP-2 am stärksten wirken sollen, zum Zeitpunkt der Regression des CL. Nach

Greenaway et al. (2005) entscheidet die Balance von angiogenen und anti-angiogenen Faktoren über den Gefäßauf- oder abbau, was durch die hohe Expression der anti-angiogenen Rezeptoren CD36 und CD47 während der CL-Regression auch in dieser Arbeit wieder bestätigt werden kann.

Während der induzierten Luteolyse zeigt CD36 eine sehr interessante Regulation. Es steigt 0,5 h nach der Injektion von PGF2 $\alpha$  zwar signifikant im Vergleich zum Zeitpunkt 0 an, im Vergleich zu dem äußerst massiven Anstieg, der während der strukturellen Luteolyse zu erkennen ist, wirkt diese erste Aufregulierung jedoch verhältnismäßig schwach. Da diese auffällig starke Erhöhung 24 h nach der Auslösung der Luteolyse stattfindet (die Wirkung verstärkt sich noch durch den Abfall der VEGF-A mRNA), kann davon ausgegangen werden, dass sie in jedem Fall durch aktive Aufregulierung der Expression vonstatten geht. Zu diesem Zeitpunkt hat die Involution des CL bereits begonnen.

Die messbare mRNA-Menge des Rezeptors CD47 steigt 0,5 h nach Auslösung der Luteolyse signifikant an und fällt gleich danach wieder auf den Level vom Zeitpunkt 0 zurück. Auf diesem Niveau bleibt die Expression bis zum Ende der Messung ohne sich nochmals relevant zu verändern. Der Rezeptor steht seinen anti-angiogenen Liganden also permanent zur Verfügung.

Die Expression von CD36 fällt, ebenso wie die zuvor betrachteten anti-angiogenen Faktoren, mit dem Wachstum der Follikel, in den GC ab. Diese Entwicklung deckt sich mit der gemessenen Proteinmenge von CD36 in den GC boviner Follikel von Greenaway et al. (2005). In den reifen, selektierten Follikeln soll keine Hemmung der Angiogenese erfolgen, im Gegenteil, hier muss massive Gefäßneubildung erfolgen, um die Versorgung des großen Follikels über 14 mm zu gewährleisten. Der Rezeptor CD47 ist während des Follikelwachstums in den GC nicht reguliert. Möglicherweise spielt er hier nur eine untergeordnete Rolle. In der TI hingegen sind beide Faktoren, CD36 und CD47, wieder in gleicher Weise exprimiert und zwar vergleichbar mit den Vasohibinen und TSP-2 mit dem Wachstum der Follikel immer weniger.

## **5.4 Lymphangiogene Faktoren**

### 5.4.1 VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3

Es ist bekannt, dass VEGF-C und VEGF-D sowohl für die Lymphangiogenese, also auch für den Erhalt von Lymphgefäßen verantwortlich ist. Sie agieren hauptsächlich über den VEGF-R3 (Aachen et al., 1998; Stacker et al., 2001). Die mRNA-Expression des als lymphangiogen bekannten Faktors VEGF-C zeigt im CL während des Zyklus den prototypischen Verlauf eines hämangiogenen Faktors. VEGF-C verläuft nahezu parallel mit VEGF-A<sub>121</sub>. Beide

starten hoch in die frühe luteale Phase und sinken während der Regression drastisch ab. Es ist bewiesen, dass mit dem Wachstum und der Ausreifung des CL massive Blutgefäßneubildung und Aufrechterhaltung stattfinden muss, um das immer größer werdende CL auch ausreichend mit Sauerstoff und sämtlichen anderen wichtigen Botenstoffen versorgen zu können (Kaczmarek et al., 2005). Blutgefäße alleine reichen allerdings nicht aus, um die Homöostase im Gewebe aufrecht zu erhalten. Es werden Lymphgefäße benötigt, um die Flüssigkeit aus dem interzellulären Raum zu sammeln und später in den zugehörigen Lymphknoten zu filtern (Tammela et al., 2005b; Karpanen und Mäkinen, 2005). Deshalb scheint der wichtige lymphangiogene Faktor VEGF-C von Anfang an die Expression der hämangiogenen Faktoren, wie VEGF-A<sub>121</sub> zu begleiten, damit neben neuen Blutgefäßen auch sofort die begleitenden Lymphgefäße entstehen.

Die mRNA von VEGF-D und seinen Rezeptor VEGF-R3 zeigt einen etwas anderen Verlauf. Die Expression ist im sich entwickelnden CL zunächst niedrig und steigt erst im Verlauf des Zyklus an. Die höchsten Werte erreichen die Faktoren an den Tagen 8-12, danach fallen die Werte erst leicht und während der Regression noch weiter ab. Der Expressionsverlauf der Faktoren könnte darauf schließen lassen, dass VEGF-D im CL des Zyklus in seiner Bedeutung der von VEGF-C nachsteht und möglicherweise für die Endreifung der Lymphkapillaren zuständig ist. Die zu Beginn der lutealen Phase noch niedrigen Werte für den Rezeptor VEGF-R3 lassen sich nur durch eine extrem hohe Affinität und Wirkung des Rezeptorkomplexes VEGF-C/VEGF-R3 erklären, wenn man beachtet, dass VEGF-C im frühen CL schon sehr hoch exprimiert ist und somit der Ligand (hohe Konzentration) seinen Rezeptor herabreguliert. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass in der frühen lutealen Phase nicht VEGF-R3 der wichtigste Rezeptor für VEGF-C ist, sondern VEGF-R2. Dieser ist nämlich laut Berisha et al. (2000b) bereits zu Beginn der lutealen Phase hoch exprimiert.

Die mRNA von VEGF-C bleibt bis 4 h nach Induktion der Luteolyse noch hochreguliert, fällt aber bereits ab 12 h signifikant ab (Abschluss der funktionalen Luteolyse) um dann mit dem Fortschreiten der strukturellen Luteolyse weiter zu fallen. Die Expression von VEGF-D reagiert noch schneller auf das Signal zur Luteolyse, beginnt bereits 2 h nach PGF2 $\alpha$  zu fallen und ist dann 4 h und 12 h später noch zweimal signifikant zurückgegangen, was in dieser Phase der Luteolyse als eindeutig transkriptional reguliert betrachtet werden kann. Erstaunlicherweise steigen die Expressionsdaten von VEGF-D 24 h nach der PGF2 $\alpha$ -Injektion wieder signifikant und bleiben auch bis zum Ende der Messzeitpunkte, 64 h nach der Induktion, auf diesem relativ hohen Niveau. Zu dieser Zeit ist die strukturelle Luteolyse in vollem Gange und massiver Gewebeabbau findet statt. Die hohe Regulierung des Faktors dient möglicherweise dem Schutz der großen lymphatischen Gewebe vor Degeneration, um den Abtransport der entstehenden Abfallstoffe zu sichern. Die mRNA Regulation von VEGF-

R3 ist 0,5 und 2 h nach der Auslösung der Luteolyse noch hoch, fällt 4 h nach ihr signifikant ab und zeigt dann bis zum Ende der Messung leichte, aber keine starken Schwankungen mehr. Für VEGF-R3 gilt wohl ähnliches wie für seine beiden Liganden. Bereits während der funktionalen Luteolyse wird die Expression des Faktors aktiv herunterreguliert. Wie bei VEGF-D bleibt ein bestimmter Wert jedoch über den strukturellen Abbau des CL hinweg erhalten, wahrscheinlich um die wichtigen Lymphgefäße vor zu schneller Zerstörung zu bewahren.

Wie bereits im heranwachsenden CL scheint auch während des Follikelreifungsprozesses VEGF-C der wichtigere der beiden lymphangiogenen Faktoren zu sein. Seine Werte steigen nämlich mit dem Wachstum der Follikel bis zu einem Durchmesser von 12-14 mm kontinuierlich an. Dieser Trend ähnelt dem der angiogenen Faktoren von VEGF-A und scheint wieder ein Hinweis dafür zu sein, dass das Lymphgefäßwachstum das der Blutgefäße zeitnah begleitet. VEGF-C in den GC dürfte auch hier eine Chemokinfunktion auf Lymphendothelzellen haben. Vielleicht ist die Entwicklung der Lymphgefäße mit dem Erreichen von 14 mm Größe bereits zur Genüge abgeschlossen, so dass ein Rückgang der Expression, wie er bei den noch größeren Follikeln zu beobachten ist, nicht mehr ins Gewicht fällt. Die VEGF-D Expression ist möglicherweise auch hier nur unterstützend, da sie von den Follikeln, die kleiner als 5 mm sind, über eine Zwischenstufe bis zu denen mit 8-13 mm signifikant abfällt, also gerade anders herum als bei VEGF-C. Danach steigen die Werte wieder leicht an.

Mit den vorherigen Ergebnissen zusammen lässt sich mutmaßen, dass VEGF-C eher für die Neuausbildung (vgl. CL- und Follikelwachstum) von Lymphgefäßen in der TI von Bedeutung ist – und VEGF-D möglicherweise eher für den Erhalt (vgl. Luteolyse und hohe Werte während der Gravidität) dieser sorgt. Wie aus dem Ergebnisteil ersichtlich war es leider nicht möglich den VEGF-R3 zufrieden stellend in den GC zu beurteilen. Weitere Untersuchungen hierzu sollten angeschlossen werden.

Die Ergebnisse der TI zeigen keine signifikanten Regulierungen der mRNA von VEGF-C. Dies muss jedoch nicht mit „Unwichtigkeit“ gleichgesetzt werden. Dies unterstreicht aber die Bedeutung von VEGF-C aus den GC als Chemokin. VEGF-D zeigt wieder den bereits beobachteten Abfall der Werte von den kleinen Follikeln hin zu den großen. Der Rezeptor VEGF-R3 war mit der qPCR in den Follikel unter 14 mm nicht nachweisbar, zeigte aber bei den selektierten, ausgereiften Follikeln schöne und eindeutige Ergebnisse. Eine Auswertung über den Verlauf des Follikelwachstums war daher nicht möglich. Die Expression der Liganden in der TI wäre also in den Follikeln unter 14 mm sinnlos, da in ihnen noch keine VEGF-R3 exprimiert wird – es sei denn auch hier dient VEGF-R2 als Rezeptor während des Heranwachsens. Dies zu überprüfen wäre sehr interessant.

Auf Proteinebene sieht das ganze ein wenig anders aus. Bei der Betrachtung der ELISA Ergebnisse fällt bei den Faktoren VEGF-C und VEGF-D als erstes auf, dass der Abfall der Werte von den Tagen 13-16 hin zur Regression, wie er bei den mRNA-Daten zu sehen ist, nicht auftritt. Die Menge an messbarem Protein bleibt konstant. Für das Protein VEGF-C lässt sich sogar sagen, dass es nach anfänglichen leichten Schwankungen, im Verlauf des Zyklus immer mehr ansteigt ohne, wie gesagt, noch einmal abzufallen. Das VEGF-D Protein liegt bis zu den Tagen 5-7 auf gleichmäßig niedrigem Niveau und steigt dann während der Tage 8-12 stark an. Danach sind die Werte wieder ähnlich denen zu Beginn der lutealen Phase und bleiben auch so – bis zum Ende der Messzeitpunkte – auch während der Regression. Das Protein VEGF-R3 liegt bis zu den Zyklustagen 5-7 unter der Nachweisgrenze von 1,56 ng/g Gewebe des verwendeten ELISA-Kits. Danach ist es jedoch detektierbar und zeigt von den Tagen 8-12 auf die Tage 13-16 einen nochmaligen leichten Anstieg. Während der Regression fällt es ab. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus der mRNA-Messung dahingehend, dass während der frühen lutealen Phase VEGF-R2 der biologisch relevante Rezeptor für VEGF-C (und VEGF-D) sein könnte. Während des Expressionshöhepunktes von VEGF-R3 an den Tagen 8-12 und den zweithöchsten Daten an den Tagen 13-16, ist auch das Protein nachweisbar. In der übrigen Zeit hat es möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle oder die Translation von mRNA in Protein ist zeitverzögert.

Sowohl bei den Untersuchungen der mRNA-Expression, als auch bei denen auf Proteinebene fällt außerdem sofort ins Auge, dass die Daten aller drei Faktoren während der Gravidität sehr hoch liegen. Sie scheinen während der Trächtigkeit eine wichtige Rolle für das CL und für weitere Lymphangiogenese und Funktionsaufrechterhaltung der Lymphkapillaren zu haben. Diese Zusammenhänge weiter zu untersuchen wäre sicherlich sehr interessant.

Bei dem Versuch die Lokalisation des VEGF-R3 Proteins mittels Immunohistochemie (IHC) darzustellen, traten Probleme auf, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen sind, dass kein speziell für IHC geeigneter Antikörper verwendet wurde, sondern einer, der für ELISA konzipiert wurde. Es handelt sich bei dieser Untersuchung demnach um einen ersten Versuch, der mit einem geeigneteren Antikörper und zudem in Paraffin-fixierten Schnitten noch einmal angegangen werden sollte (entsprechende Versuche sind schon eingeleitet). Nichts desto trotz konnten Unterschiede zwischen DAB positiven Zellen und ungefärbten Bereichen, sowie zur Negativkontrolle, erkannt werden. Eine leichte Hintergrundfärbung blieb jedoch bestehen, die noch weiter minimiert werden sollte.

### 5.4.3. Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktoren (PDGF-Familie)

PDGFs stimulieren endotheliale, hematopoetische und Stromazellen zur Produktion von VEGF-Faktoren. Sie ergänzen sich gegenseitig in ihrer Wirkung bei der Bildung von Gefäßen (Cebe-Suarez et al., 2006; De Marchis et al., 2002; Shibuya et al., 2006). Die Lymphangiogenese fördern die PDGFs direkt (Ji, 2006; Karpanen und Mäkinen, 2005). Ihre Rezeptoren sind in neu gebildeten Gefäßen und in aktivierten EC hochreguliert (Karpanen und Mäkinen, 2005).

Im ganz jungen CL sind die mRNA Mengen von PDGF-A am höchsten. Von den Zyklustagen 3-4 bis zur Regression bleiben die Werte dann auf etwa gleichem Niveau. Ein massiver Abfall während des Abbaus des CL ist nicht zu verzeichnen. Die gilt auch für seine beiden Rezeptoren PDGF-R $\alpha$  und PDGF-R $\beta$ . Für PDGF-R $\alpha$  sind die mRNA-Werte, wie bei seinem untersuchten Liganden in den frühen CL vergleichsweise hoch exprimiert, fallen dann bis zu den Zyklustagen 13-16 kontinuierlich ab, um dann während der Regression sogar wieder signifikant anzusteigen. Bei PDGF-R $\beta$  erfolgt ein stetiger Anstieg über den Verlauf der lutealen Phase, der seinen Gipfel ebenfalls während der Regression zeigt. Während der Trächtigkeit sind die Expressionsspiegel von PDGF-A und PDGF-R $\alpha$  etwa auf dem Niveau wie zu den Zeitpunkten der mittlutealen Phase des Zyklus, wo die mRNA-Menge eher niedrig ist. Bei PDGF-R $\beta$  hingegen sind die Werte während der Gravidität sogar höher als während der Zyklustage bis zum Tag 16. Die beobachteten Profile weisen darauf hin, dass die PDGFs einen wichtigen Beitrag zum Erhalt und Schutz der Gefäße beitragen könnten. Die hohen Expressionsdaten während der Regression und Trächtigkeit deuten sehr darauf hin, dass der Erhalt der Gefäßstrukturen und die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktionen hier im Vordergrund der Wirkung stehen.

Zu der Vermutung, dass die PDGFs eine wichtige Schutzfunktion für die Gefäße haben und die Aufrechterhaltung der Strukturen unterstützen, passen auch die Expressionsdaten während der induzierten Luteolyse. Bei keinem der Faktoren ist über den gesamten Messzeitraum eine Herunterregulierung bzw. ein Abfall der Expression zu beobachten. PDGF-A zeigt seinen Expressionshöhepunkt 2 h nach der Luteolyse-Induktion, bleibt aber dann bis 64 h danach auf gleichmäßig hohem Niveau. Die beiden Rezeptoren steigen im Verlauf der Luteolyse sogar noch an. Obwohl ab ca. 12 h nach der Injektion von PGF2 $\alpha$  die strukturelle Luteolyse und damit der Abbau aller Strukturen des CL einsetzt, bleiben die mRNA Daten für PDGF-R $\alpha$  und PDGF-R $\beta$  sehr hoch (bzw. werden sie sogar noch erhöht). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die noch verbleibenden Zellen die Faktoren ganz massiv exprimieren, um sich selbst zu schützen, bzw. ihren Abbau hinauszuzögern.

Nur PDGF-R $\alpha$  zeigt in den GC eine statistisch signifikante Regulierung. Bei den beiden anderen Faktoren ließen sich keine besonderen Schwankungen oder Tendenzen während

des Follikelwachstums beobachten. In der TI ist es nur PDGF-R $\beta$ , der signifikante Veränderungen erkennen lässt. In beiden Fällen ist die Expression der Faktoren in den kleinsten Follikeln am höchsten. Mit der Reifung und der Zunahme des Durchmessers fallen die mRNA Werte dann immer weiter ab.

Dieses Verhalten konnte schon bei VEGF-D in der TI beobachtet werden. Auch die Expression von Podoplanin in der GC und Prox-1 in der TI ging mit dem Wachstum der Follikel immer weiter zurück. Warum dies der Fall ist bleibt noch zu klären.

### 5.5.2 Podoplanin

Podoplanin wird als bedeutender Marker für Lymphgefäße in Forschung und Diagnostik verwendet (Breiteneder-Geleff et al., 1999). Dieser Faktor konnte im Rahmen dieser Untersuchungen erstmals in den Funktionsgebilden des Ovars bei der Kuh nachgewiesen werden. Wie bei den angiogenen Faktoren VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und Nrp.-1 und bei den lymphangiogenen Faktoren VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3 fällt auch Podoplanin während der Regression des CL massiv ab. Vorher ist der Faktor relativ konstant exprimiert und zeigt auch ein ähnliches Niveau während der Trächtigkeit. Wie zuvor bemerkt, fallen die lymphangiogenen Faktoren VEGF-C und VEGF-D am Ende der lutealen Phase massiv ab, wodurch die Lymphangiogenese zum Erliegen kommt. Die LEC werden abgebaut und somit fällt auch die Expression ihres Markers Podoplanin ab.

Im Verlauf der gesamten Luteolyse ist kein massiver Abfall von Podoplanin im CL zu erkennen. Die mRNA Menge fällt auch nach Einsetzen der strukturellen Luteolyse nicht ab. Zu diesem Zeitpunkt wird bereits das CL-Gewebe massiv abgebaut. Die genauen Funktionen von Podoplanin sind noch nicht geklärt, es wurde jedoch gezeigt, dass sein Fehlen zu defekten Lymphgefäßen und Lymphödemen führt (Ramirez et al., 2003; Schacht et al., 2006) und es möglicherweise eine Rolle bei der Geweberegeneration spielt (Gandarillas et al., 1997). Es wäre also denkbar, dass die noch überlebenden LEC während der Luteolyse vermehrt Podoplanin exprimieren, um dem Abbau und der Zerstörung des Gewebes dort entgegen zu wirken. Der Unterschied in der Expression im CL des Zyklus und dem CL der Luteolyse könnte im Material begründet sein, da die Zyklus-CL der Regression im Durchschnitt sehr „spät“ gewählt wurden (bis Tag 21 - daraus kann eine Schwankung von bis zu 4 Tagen entstehen).

Podoplanin ist in den GC von kleinen Follikeln bis zu einer Größe von ca. 8 mm am höchsten exprimiert (auch hier kann eine Wirkung als Chemokin vermutet werden) und fällt mit dem weiteren Wachstum immer weiter ab. Auch VEGF-D und PDGF-R $\alpha$  zeigten eine ähnliche Tendenz. Diese lässt sich auch bei allen anti-angiogenen untersuchten Faktoren wieder erkennen. Bei ihnen ist der beobachtete Verlauf schlüssig, da bei den großen und reifen

Follikeln die anti-angiogenen Einflüsse in den Hintergrund treten müssen, um die massive Gefäßneubildung zur besseren Versorgung der selektierten Follikel zu ermöglichen (Kaczmarek et al., 2005). Warum auch VEGF-D, PDGF-R $\alpha$  und Podoplanin dieses Expressionsprofil zeigen ist noch unklar und müsste weiter untersucht werden. In der TI der Follikel ist Podoplanin nicht statistisch signifikant reguliert, konnte aber eindeutig nachgewiesen werden. Welche Rolle es hier spielt, bzw. wie die Lymphgefäße sich im Follikel entwickeln, bleibt eine sehr interessante Frage, der noch weiter nachgegangen werden sollte.

### 5.5.3 Homeobox-containing transcription Factor Prox1 (Prox-1)

Der Transkriptionsfaktor Prox-1 wird benötigt um die Aussprossung aus der Hauptvene und damit die Lymphangiogenese im Embryo zu initiieren (Wigle und Oliver, 1999). Bei Mäusen ohne Prox-1 (-/-) entstehen durch die deshalb fehlende Aussprossung am Entwicklungstag 11,5 so Embryonen ohne lymphatisches System (Wigle et al., 2002). Außerdem wird es als diagnostischer Marker für LEC eingesetzt (Wilting et al., 1992). Hier konnte er auch im bovinen Ovar nachgewiesen werden. Im CL während des Zyklus fällt wie auch bei den Mitgliedern PDGF-Familie, bei Prox-1 auf, dass keine Herabregulierung während der Regression des CL stattfindet. Mit dem Wachstum des CL steigt auch die mRNA Menge des Faktors an. Auch wenn an den Tagen > 18 des Zyklus nach und nach alle Strukturen abgebaut werden, bleibt Prox-1 hoch. Möglicherweise soll es, wie auch die PDGFs die Lymphgefäße noch möglichst lange stabilisieren, um den notwendigen Abtransport der Abbauprodukte aus dem CL zu gewährleisten (vgl. PDGF-A).

Während der induzierten Luteolyse zeigt die Expression von Prox-1 keine signifikanten Regulierungen, was aber auch bedeutet, dass kein starker Abfall während der strukturellen Luteolyse zu beobachten ist. Dies deckt sich mit der oben gemachten Vermutung, dass Prox-1 von den noch verbliebenen LEC besonders stark exprimiert wird, um das weitere Überleben der Lymphgefäße zu sichern.

In den GC ist Prox-1 nicht reguliert, in der TI fallen die Expressionswerte mit dem Follikelwachstum immer weiter ab. Wigle et al. (2002) haben bewiesen, dass Prox-1 unerlässlich ist, damit während der Embryonalentwicklung bestimmte EC aus Venen aussprossen und auf das Prox-1 Signal hin, keine hämangiogenen Marker (wie CD34) mehr ausbilden, sondern lymphangiogene Marker (wie SLV oder LYVE-1 und später VEGF-R3). Der Faktor wird also zur Ausbildung eines LEC-Phänotyps während der Embryonalentwicklung unbedingt gebraucht, ob dies im adulten Gewebe auch noch der Fall ist, ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse noch genauer zu prüfen.

## 5.5 Schematische Darstellung der Expressionsprofile der untersuchten Faktoren

### Schematische Darstellung der Expressionsprofile im CL während des Zyklus

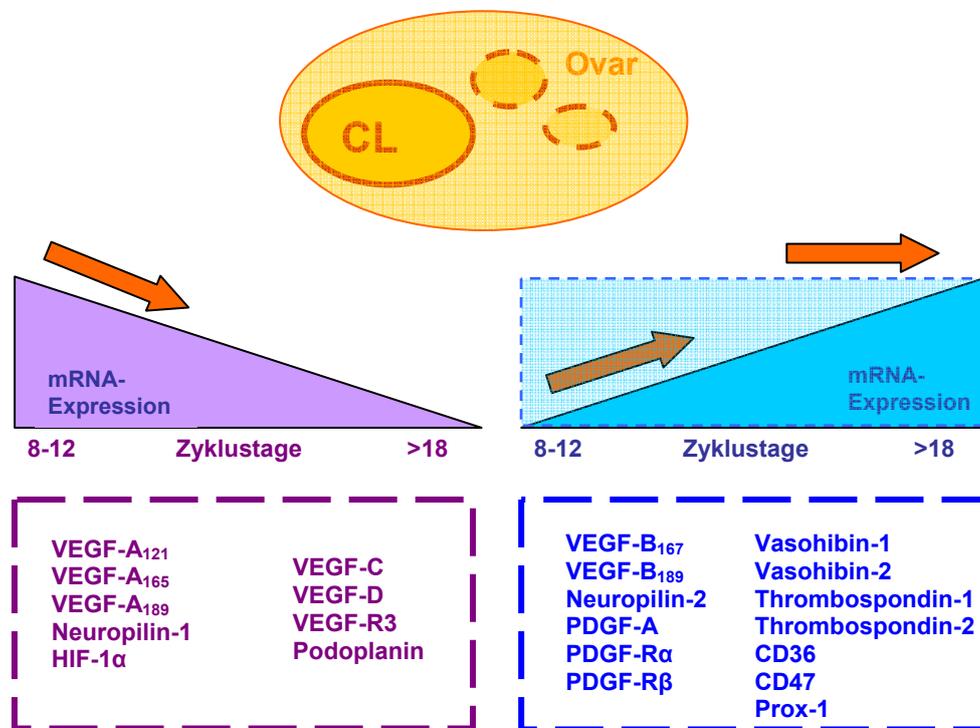


Abb.78: Schematische Darstellung der mRNA-Expression im CL des Zyklus. Dargestellt ist die Entwicklung der Expression für die untersuchten Faktoren ab den Zyklustagen 8-12 bis zu den Zyklustagen >18, während der Regression. Die Faktoren in Lila auf der linken Seite, zeigen einen Abfall der Expression, während die Expression der blauen Faktoren, auf der rechten Seite, ab den Zyklustagen 8-12 entweder auf gleichem Niveau bleibt, oder ansteigt.

Die Expression der gefäßfördernden VEGF-A Isoformen, Nrp.-1, HIF-1α, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3 und Podoplanin beginnt an den Zyklustagen 8-12 langsam abzufallen und sinkt während der Regression des CL noch weiter. Zu diesem Zeitpunkt des Zyklus muss keine Gefäßneubildung mehr stattfinden. Die Ergebnisse bekräftigten, dass die Regression der Kapillaren einer der Hauptregulatoren der Luteolyse ist. Die VEGF-B Isoformen, Nrp.-2, PDGF-A, PDGF-Rα, PDGF-Rβ, Prox-1 und alle anti-angiogen wirkenden Faktoren zeigten diesen Abfall der Expression während der Regression des CL nicht. Die Expression der anti-angiogenen Faktoren überwiegt zu diesem Zeitpunkt also die Expression der angiogenen Faktoren und beschleunigt somit die Angiolyse. Die VEGF-B Isoformen, Nrp.-2 und die untersuchten PDGFs bleiben - möglicherweise als Reaktion darauf - auch weiter hochreguliert, um allzu massive Abbauprozesse durch ihre zum Teil anti-apoptische oder zumindest stabilisierende Wirkung, einzudämmen.

Schematische Darstellung der Expressionsprofile im CL während der induzierten Luteolyse

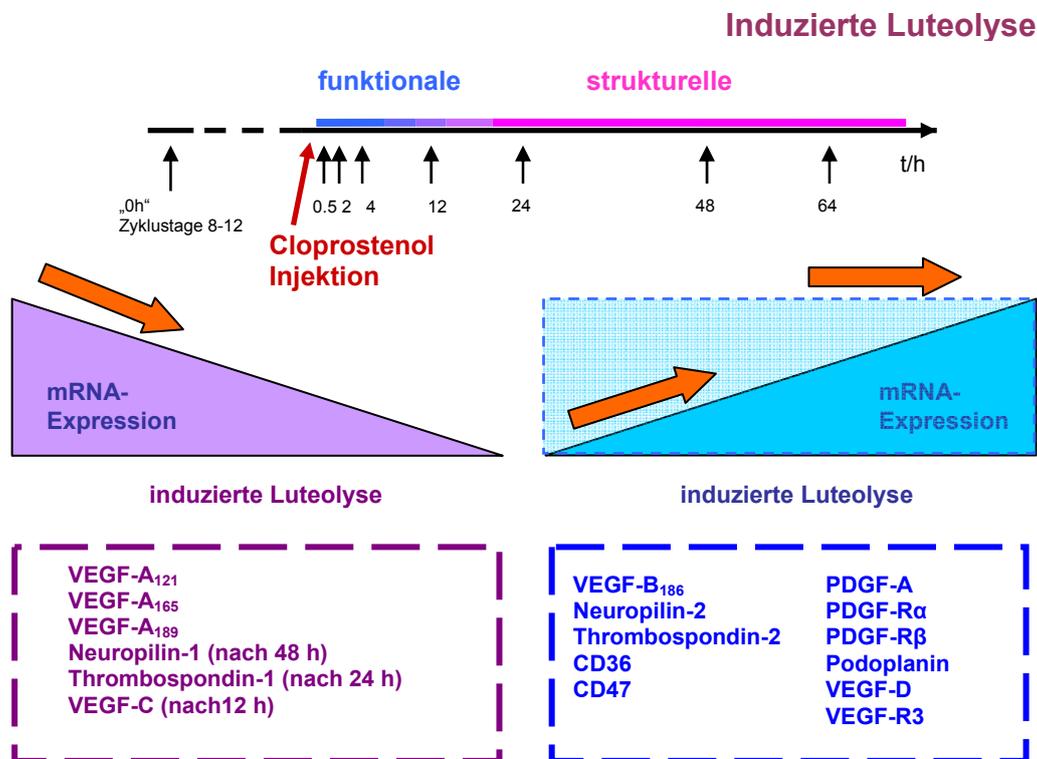


Abb.79: Schematische Darstellung der mRNA-Expression im CL während der induzierten Luteolyse. Dargestellt ist die Entwicklung der Expression für die untersuchten Faktoren ab dem Zeitpunkt der Cloprostenol-Injektion. Die Faktoren auf der linken Seite, zeigen einen Abfall der Expression, während die Expression der Faktoren auf der rechten Seite, während der Luteolyse entweder auf gleichem Niveau bleibt, oder ansteigt VEGA-B<sub>167</sub>, HIF-1 $\alpha$ , Vasohibin-1, Vasohibin-2 und Prox-1 waren im CL während der induzierten Luteolyse nicht statistisch reguliert.

Im CL während der induzierten Luteolyse beginnt die Expression der VEGF-A Isoformen, VEGF-C, TSP-1 und Nrp.-1 bereits kurze Zeit nach der Injektion von PGF<sub>2</sub> $\alpha$  abzufallen. Im Gegensatz dazu bleiben VEGF-B<sub>186</sub>, Nrp.-2, VEGF-D, VEGF-R3, PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , Podoplanin, TSP-2 sowie CD36 und CD47 noch über viele Stunden hochreguliert, auch wenn die strukturelle Luteolyse und damit der Abbau des CL-Gewebes bereits begonnen hat. Diese Entwicklung steht wieder im Einklang mit ihrer entweder anti-angiogenen Wirkung (TSP-2, CD36, CD47) oder, für die anderen Faktoren, mit ihrer anti-apoptischen bzw. schützenden Funktion für die Gefäße (vgl. Regression).

Schematische Darstellung der Expressionsprofile in den GC und der TI

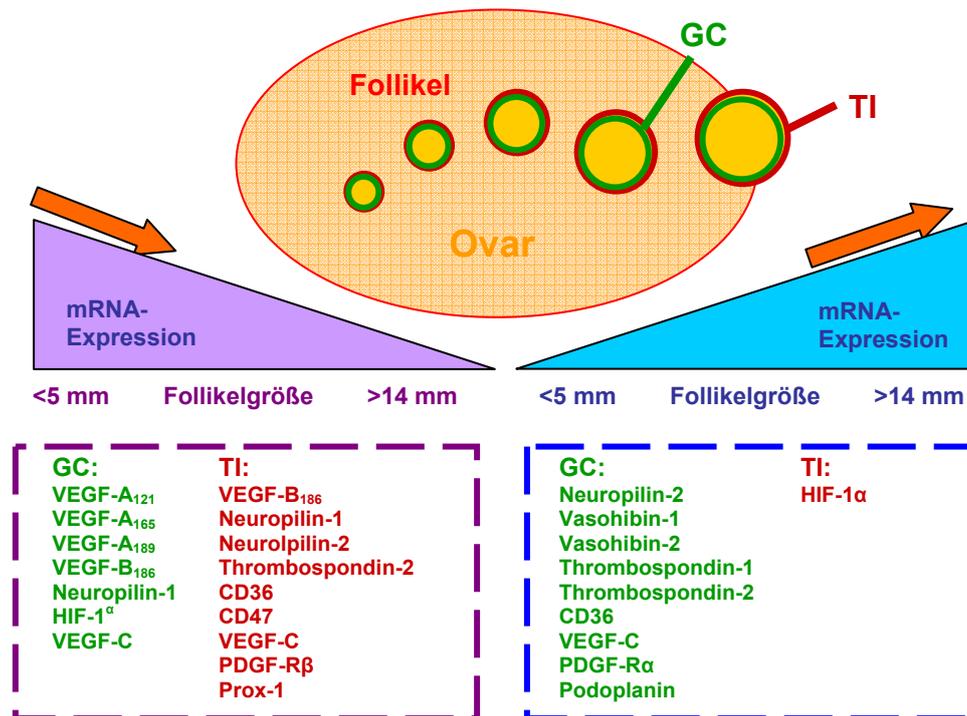


Abb.80: Schematische Darstellung der mRNA-Expression in den Follikeln während des Follikelendwachstums. Dargestellt ist die Entwicklung der Expression für die untersuchten Faktoren von kleinen Follikeln mit < 5 mm Größe, bis zu reifen Follikeln > 14 mm Größe. Die Faktoren auf der linken Seite zeigen einen Abfall der Expression, während die Expression der Faktoren, auf der rechten Seite, mit dem Wachstum der Follikel ansteigt. CD47, PDGF-A, PDGF-R $\beta$  und Prox-1 waren in den GC nicht statistisch reguliert VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-C, PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ , Podoplanin und Thrombospondin-1 waren in der TI nicht statistisch reguliert.

In den GC der Follikel steigt mit ihrem Wachstum auch die Expression der VEGF-A Isoformen, Nrp.-1 und HIF-1 $\alpha$ . Dies bestätigt sowohl ihren angiogenen Einfluss, als auch die Chemokin-Wirkung auf die TI und die Gefäßausbildung der reifenden Follikel. Die Expression von VEGF-C verläuft ebenso, was seine mögliche Bedeutung für die parallel zum Blutgefäßsystem mitwachsenden Lymphgefäße im Follikel weiter unterstreicht. Bis auf den nicht regulierten CD47 fällt die Expression aller anti-angiogenen Faktoren in den GC mit dem Größenwachstum der Follikel ab. Die Expression von gefäßhemmenden Faktoren ist in den kleinen Follikeln hochreguliert. In den reiferen jedoch sinkt sie ab und so kann in ihnen, im Gegensatz zu den anderen, vermehrt die notwendige Angiogenese stattfinden. Auch Nrp.-2, VEGF-D, PDGF-R $\alpha$  und Podoplanin zeigten diesen Expressionstrend. Die Wirkung dieser in den GC produzierten Faktoren erfolgt wahrscheinlich ebenfalls als Chemokin, mit Passage durch die Basalmembran, in die TI. Außer HIF-1 $\alpha$ , der mit dem Follikelwachstum immer weiter ansteigt, sind alle anderen untersuchten Faktoren in der TI entweder nicht statistisch reguliert oder sinken mit dem Reifungsprozesses der Follikel ab. Möglicherweise ist die TI eher Ziel- als Expressionsort der in den GC produzierten Faktoren.

### 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es weitere Regulationen und Mechanismen von angiogenen Faktoren im Ovar des Rindes während der verschiedenen Stadien der Ovarfunktion zu klären. Außerdem wurden anti-angiogene Faktoren und ihr Einfluss auf die Follikelreifung, die Corpora lutea (CL) -Entwicklung, -Funktion und -Regression, sowie ihre Rolle bei der Luteolyse und während der Trächtigkeit untersucht. Weiterhin sollte die Lymphangiogenese während dieser Phasen näher untersucht werden, da darüber im Ovar von Haustieren noch kaum Befunde vorliegen. Die Untersuchungen erfolgten zum größten Teil durch mRNA-Expressionsmessungen, aber auch die Proteinkonzentration und -lokalisierung einiger Faktoren wurde bestimmt. Die CL zur Bestimmung der Faktoren während des Brunstzyklus und der Gravidität, sowie die Follikel wurden am Schlachthof gewonnen. Die CL während der induzierten Luteolyse wurden in einem Tierexperiment durch transvaginale Ovariectomie gewonnen. Die Einteilung der Zyklus-CL erfolgte in sechs Gruppen (Tage 1-2, 3-4, 5-7, 8-12, 13-16, >18), die der CL während der Trächtigkeit in vier Gruppen (Monate 1-2, 3-5, 6-7, >8). Während der induzierten Luteolyse wurden die CL in eine Kontrollgruppe (Tage 8-12) und sieben Gruppen nach Induktion durch PGF<sub>2</sub>α eingeteilt (0,5 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h und 64 h). Bei den Follikeln wurden die Granulosazellen (GC) und die Theka interna (TI) voneinander getrennt und gesondert untersucht. Alle Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA- oder Protein-Extraktion bei -80°C gelagert. Nach der Untersuchung der Follikelflüssigkeit (FF) auf Östradiol-17β (E2) und Progesteron (P4) erfolgte die Einteilung der Follikelproben anhand der Follikelgröße und des E2-Gehaltes (ELISA) in ihrer FF in fünf Gruppen (<5 mm = <0,5 ng/ml; 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml).

Es wurden folgende Faktoren untersucht: **(A)** angiogene Faktoren: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-B<sub>186</sub>, Neuropilin-1 (Nrp.), Nrp.-2 und der Hypoxie-induzierbare-Faktor-1α (HIF-1α), **(B)** anti-angiogene Faktoren: Vasohibin-1, Vasohibin-2, Thrombospondin (TSP)-1, TSP-2, CD36 und CD47 und **(C)** für die Lymphangiogenese relevante Faktoren: VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3, Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF)-A, PDGF-Rα, PDGF-Rβ, Podoplanin und der Homeobox-containing transcription Factor Prox1 (Prox-1).

Die gefäßfördernde Expression der VEGF-A Isoformen, Nrp.-1, HIF-1α, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3 und Podoplanin bestätigte sich im CL des Brunstzyklus durch hohe Expressionswerte dieser Faktoren während der CL-Bildung (Tag 5-7, Angiogenese) und CL-Funktion (Tag 8-16, Kapillarschutzfunktion), wo massive Angiogenese und Lymphangiogenese stattfindet, um das schnelle Wachstum und die Versorgung des CL zu gewährleisten. Die Expression von allen diesen Faktoren ging zum Ende der lutealen Phase

und besonders während der CL-Regression zurück. Diese Beobachtung erscheint stimmig, schließlich muss zu diesem Zeitpunkt keine Gefäßneubildung mehr stattfinden. Die Ergebnisse bekräftigten außerdem, dass die Angiolyse einer der Hauptregulatoren der Luteolyse ist. Die VEGF-B Isoformen, Nrp.-2, PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , Prox-1 und alle anti-angiogen wirkenden Faktoren zeigten diesen Abfall der Expression während der Regression des CL nicht. Dies ist für die anti-angiogenen Faktoren schlüssig, deren Expression so die der angiogenen Faktoren überwiegt und somit die Angiolyse beschleunigt. Die anderen Faktoren werden möglicherweise als Reaktion darauf auch weiter hochreguliert und zwar als Versuch, allzu massive Abbauprozesse durch ihre zum Teil anti-apoptische oder zumindest stabilisierende Wirkung, einzudämmen. Die Messungen der Proteinkonzentrationen standen im Einklang mit denen auf mRNA-Ebene, allerdings fiel der Abfall von VEGF-C und VEGF-D während der Regression auf Proteinebene schwächer aus, als es bei der Expressionsmessung zu beobachten war. Beide Faktoren und auch VEGF-R3 ließen im ELISA vergleichsweise hohe Proteinkonzentrationen während der Trächtigkeit erkennen. Warum dies so ist wäre Gegenstand weiterer interessanter Untersuchungen, weil angenommen werden kann, dass die hohe Expression der lymphangiogenen Faktoren eine wichtige Rolle für die CL-Funktion während der Trächtigkeit spielt.

Im CL während der induzierten Luteolyse fällt die Expression der VEGF-A Isoformen am schnellsten ab, gefolgt von VEGF-C, TSP-1 und Nrp.-1. Im Gegensatz dazu bleiben VEGF-B<sub>186</sub>, Nrp.-2, VEGF-D, VEGF-R3, PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , Podoplanin, TSP-2 sowie CD36 und CD47 noch über viele Stunden hochreguliert, auch wenn der strukturelle Abbau des CL-Gewebes bereits begonnen hat. Diese Entwicklung steht wieder im Einklang mit ihrer entweder anti-angiogenen Wirkung, oder für die anderen Faktoren, mit ihrer anti-apoptischen bzw. schützenden Funktion für die Gefäße (vgl. Regression).

In den GC der wachsenden Follikel bestätigte sich wieder die starke Expression der angiogenen VEGF-A Isoformen, sowie die von Nrp.-1 und HIF-1 $\alpha$  und damit die Chemokin-Wirkung auf die TI und die Gefäßausbildung der reifenden Follikel. Ihre Expression nahm mit dem Größenwachstum der Follikel immer weiter zu. Diesen Expressionstrend zeigte auch VEGF-C, was seine mögliche Bedeutung für die parallel zum Blutgefäßsystem mitwachsenden Lymphgefäße im Follikel weiter unterstreicht. Bis auf den nicht regulierten CD47 fällt die Expression aller anti-angiogenen Faktoren in den GC mit der Zunahme des Follikeldurchmessers ab. Diese Beobachtung ist sehr interessant, da sie darauf schließen lässt, dass diese Faktoren an dem Selektionsprozess der Follikel teilhaben. Durch einen noch unbekanntem Einfluss ist die Expression von gefäßhemmenden Faktoren in den kleinen Follikeln hochreguliert, in den reiferen jedoch sinkt sie ab und so kann in ihnen, im Gegensatz zu den anderen, vermehrt die notwendige Angiogenese stattfinden. Auch Nrp.-2, VEGF-D, PDGF-R $\alpha$  und Podoplanin zeigten diesen Expressionstrend. Die Wirkung dieser

Faktoren, produziert in den GC, dürfte als wieder Chemokin erfolgen, mit Passage durch die Basalmembran, in die TI. Dies gilt auch für die gemessenen mRNA-Mengen in der TI. Außer HIF-1 $\alpha$ , der mit dem Follikelwachstum immer weiter ansteigt, sind alle anderen untersuchten Faktoren in der TI entweder nicht statistisch reguliert oder zeigen einen Abfall ihrer Expression im Verlauf des Reifungsprozesses der Follikel. Möglicherweise ist die TI eher Ziel- als Expressionsort der in den GC produzierten Faktoren.

Die immunhistochemischen Untersuchungen von VEGF-R3 und HIF-1 $\alpha$  an Gefrierschnitten lieferten erste Erkenntnisse. Beide konnten in den Zellen des CL nachgewiesen werden. Für die Lokalisation von VEGF-R3 im Cytoplasma der Lutealzellen lässt sich vermuten, dass sie sich im Verlauf der lutealen Phase verändert, was jedoch noch weiter untersucht und bestätigt werden sollte. Sehr interessant sind die Ergebnisse der Proteinlokalisierung von HIF-1 $\alpha$ . In jungen CL der Zyklustage 1-2 konnte es in eingewanderten eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Dass Leukozyten die Produktion von HIF-1 $\alpha$  übernehmen ist eine neue Erkenntnis, der noch weiter nachgegangen werden sollte.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass lokal produzierte angiogene, anti-angiogene und lymphangiogene Faktoren wichtige regulierende Funktionen im Ovar des Rindes während des Follikelendwachstums und der -entwicklung, sowie während der CL-Bildung, -Funktion und -Regression übernehmen.

## 7. Summary

The aim of this study was to characterise further regulations and mechanisms of angiogenic factors in bovine ovary during different stages of ovary function. Besides some anti-angiogenic factors were investigated for the first time to examine their regulation on follicle maturation, growth and regression of corpora lutea (CL) and their possible role during luteolysis and pregnancy. Furthermore the role of factors controlling lymphangiogenesis was enlightened during these processes. Our knowledge about control of lymphangiogenesis in ovary of farm animals is very limited. Investigations in the present study were mainly done by measuring mRNA expression levels, but also by determination of protein concentration and immunohistological localization of some factors. For analyzing factors CL and follicles were collected at a local slaughterhouse. CL during induced luteolysis were collected by transvaginal ovariectomy from cows out of an time defined experiment. CL during oestrous cycle were divided in six groups (days 1-2, 3-4, 5-7, 8-13, 13-16, >18), CL during gravidity were assigned to four groups (month 1-2, 3-5, 6-7, >8). The CL during induced luteolysis were divided in a control group (days 8-12) and seven groups after PGF<sub>2</sub>α injection (0,5 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 64 h). Follicles were divided into granulosa cells (GC) and theca interna (TI) and were investigated separately. All tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA or protein extraction. After measurement of oestradiol-17β (E2) and progesterone (P4) in follicular fluid (FF) classification of follicles occurred by follicle size and E2 concentration in the FF into five groups (<5 mm = <0,5 ng/ml, 6-8 mm = 0,5-5 ng/ml; 8-13 mm = 5-40 ng/ml; 12-14 mm = 40-180 ng/ml; >14 mm = >180 ng/ml). The concentrations of the hormones in FF were measured by ELISA.

Factors of interest were: **(A)** angiogenic factors: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-B<sub>186</sub>, Neuropilin-1 (Nrp.), Nrp.-2, hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α); **(B)** anti-angiogenic factors: Vasohibin-1, Vasohibin-2, Thrombospondin (TSP)-1, TSP-2, CD36, CD47 and **(C)** factors that are relevant for lymphangiogenesis: VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3, platelet derived growth factors (PDGF)-A, PDGF-Rα, PDGF-Rβ, Podoplanin and the homeobox-containing transcription Factor Prox1 (Prox-1).

The regulated expression of the VEGF-A isoforms, Nrp-1, HIF-1α, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3 and Podoplanin was shown in CL of the oestrus cycle, were high expression levels could be seen during CL formation (day 1-7, angiogenesis) and CL function (day 8-16, maintenance of capillaries). It is known that during these processes massive angiogenesis and lymphangiogenesis take place to ensure the fast growth of the CL and its supply. The expression of all these factors declined at the end of the luteal phase and dropped steeply during CL regression. The results showed that capillary regression is one of the main regulators of luteolysis. The VEGF-B isoforms, Nrp.-2, PDGF-A, PDGF-Rα, PDGF-Rβ, Prox-

1 and all anti-angiogenic factors did not show this decrease of expression during regression of the CL. This can be explained by their anti-apoptotic and vessel maintaining function as a consequence of the high expression of the anti-angiogenic factors and degeneration that occurs in this phase. Due to their higher expression levels which prevail those of the angiogenic ones, no new vessel formation but breakdown is stimulated. Measurement of protein concentration fitted with those of mRNA, though the decline of VEGF-C and VEGF-D during regression was not that strong on protein level as seen on expression level. For both factors and also for VEGF-R3 comparatively high protein concentrations during pregnancy were obtained. We assume that the high expression of lymphangiogenic factors indicates an important role for luteal function during pregnancy.

In CL during induced luteolysis the expression of VEGF-A isoforms declined fastest followed by VEGF-C, TSP-1 und Nrp.-1. By contrast VEGF-B<sub>186</sub>, Nrp.-2, VEGF-D, VEGF-R3, PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , Podoplanin, TSP-2 as well as CD36 and CD47 remain up regulated for many hours, even when structural degradation has already begun. This is again due to the anti-angiogenic function (TSP-2, CD36, CD47) or the protecting function (VEGF-B<sub>186</sub>, Nrp.-2 PDGF-A, PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , Podoplanin) for the vessels as a consequence of the degeneration that takes place.

In GC of growing follicles the important expression of the VEGF-A isoforms for new vessel formation in maturing follicles by acting as chemokines in the TI, was confirmed again as well as for Nrp.-1 and HIF-1 $\alpha$ . Their expression increased according to their growing diameter. This kind of expression profile has also been observed for VEGF-C confirming its possible stimulating role for growing lymphatic vessels along with blood vessels in developing follicles. Except CD47 which was not regulated statistically, the expression of all tested anti-angiogenic factors declined according to the growth of the follicles. This is very interesting because it supports the assumption that these factors could be involved in the selection process of the follicles. Due to a still unknown impact their expression is up regulated in the small follicles but decreases in more developed ones. Therefore in matured follicles the needed angiogenesis can occur while in the small ones it is suppressed. For Nrp.-2, VEGF-D, PDGF-R $\alpha$  and Podoplanin a comparable profile could be obtained, too. They are supposed to act as chemokines, produced in the GC, forming a gradient and diffusing through the basal membrane into the TI. The same applies to the measured mRNA in the TI. All examined factors, except HIF-1 $\alpha$  that increased according to follicle growth, were either not statistically regulated or declined along with the development of the follicles. Maybe the TI is more likely not the place to synthesize but the effector of factors produced in GC.

The immunohistological investigation of VEGF-R3 and HIF-1 $\alpha$  on cryo-sections supplied first results. Both proteins were detectible in bovine CL. One can assume that the localisation of

VEGF-R3 in cytoplasm of luteal cells changes during the luteal phase of the oestrus cycle. This should be further investigated and proven. Very interesting findings could be made for the localisation of the HIF-1 $\alpha$  protein in young CL of 1-2 days age. It was detectible in migrated eosinophils. The production of HIF-1 $\alpha$  by leucocytes is a very new idea that should be further investigated.

In conclusion, the results obtained led to the assumption that local produced angiogenic, anti-angiogenic and lymphangiogenic factors have important modulating role in the bovine ovary during follicle maturation and growth and during CL formation, function and regression.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U, 1999: Localization of VEGF-B in the Mouse Embryo Suggests a Paracrine Role of the Growth Factor in the Developing Vasculature. *Developmental Dynamics* **215**: 12-25
- Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn ML. (2003) Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*. 2003 Jan 10 ; **299**:247-51
- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci (USA)* **95**: 548-553
- Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A (2002) Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after PGF<sub>2</sub> $\alpha$  injection in the cow. *Biol Reprod*, **66**:651-658
- Alan T, Hemo I, Itin A, Peer J, Stone J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* **1**:1024–1028
- Armstrong LC, Björkblom B., Hankenson K.D., Siadak A.W., Stiles C.E., Bornstein P. (2002) Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 1893-1905
- Bagri A, Tessier-Lavigne M (2002) Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv.Exp.Med.Biol.* **515**, 13-31
- Banerji S, Ni J, Wang S, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG (1999) LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan *J Cell Biol.* **144(4)**:789-801
- Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Samoza C, Williams AF (1993) The Leukocyte Antigen Facts Book. Academic Press, London
- Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM (2002) Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J.Anat.* **200**, 581-597
- Beckmann MP, Betsholtz C, Heldin CH, Westermark B, Di Marco E, Di Fiore PP, Robbins KC, Aaronson SA. (1988) Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science* 241: 1346-1349
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J.Clin.Invest* **103**, 159-165
- Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U (2001) PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol.*; **3(5)**:512-6
- Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R (2000a) Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J.Endocrinol.* **167**, 371-382

- Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R, (2000b) Expression and Tissue Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor, Its Receptors, and Localization in the Bovine Corpus Luteum During Estrous Cycle and Pregnancy. *Biology of Reproduction* **63**, 1106-1114
- Berisha B, Sinowatz F, Schams D (2004) Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles *Mol. Reprod. Dev.* **67**:162-171
- Berisha B und Schams D (2005) Ovarien function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* **29**:305-317
- Berisha B, Steffl M, Amselgruber W, Schams D (2006a) Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptor in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction* **131**: 319,329
- Berisha B; Welter H; Shimizu T; Miyamoto A; Meyer HH; Schams D (2006b) Expression of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) and FGF7 in Mature Follicles during the Periovulatory Period after GnRH in the Cow. *J Reprod.Dev.* **52**: 307-313
- Berisha B, Steffl M, Welter H, Kliem H, Meyer HH, Schams D, Amselgruber W (2008) Effect of luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles *Reproduction, Fertility and Development* **20**:258-268
- Boonyaparakob U, Gadsby J E, Hedgpeth V, Routh P A, Almond G W, 2005: Expression and localization of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  mRNA in the porcine ovary. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, **69**:215-222
- Bosmann FT (1993) Integrins: cell adhesives and modulators of cell function *Histochemical Journal* **5**: 469-477
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D (1999) Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* **154**: 385–394
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol.Endocrinol.* **25**, 169-193
- Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**: 601-615
- Christenson LK, Stouffer RL. (1996) Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Endocrinology*; **137**(1):367-74
- Connolly DT (1991) Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry* **47**:219–223
- Corbin CJ, Moran FM, Vidal JD, Ford JJ, Wise T, Mapes SM, Njar VC, Brodie AM, Conley AJ (2003) Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biol.Reprod.* **69**, 390-397
- Cupps PT, Laben RC, Mead SW (1959) Histology of pituitary, adrenal and reproductive organs in normal cattle and cattle with lower reproductive efficiency *Hilgardia* **29**: 383-410

- Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, Kruse FE, Wiegand DJ, Dana R, Streilein JW (2004) Inhibition of Hemangiogenesis and Lymphangiogenesis after Normal-Risk Corneal Transplantation by Neutralizing VEGF Promotes Graft Survival *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **45**:2666-2673
- Dachs GU und Tozer GM (2000) Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* **36**:1649–1660
- Dameron KM, Volpert, OV, Tainsky, MA, Bouck, N. (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. **265**:1582-1584
- Daniel C, Amann K, Hohenstein B, Bornstein P, Hugo C (2007) Thrombospondin 2 Functions as an Endogenous Regulator of Angiogenesis and Inflammation in Experimental Glomerulonephritis in Mice *J Am Soc Nephrol*, **18**: 788-798
- De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck KA, Ferrara N, Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**: 989-991
- De Marchis F., Ribatti D., Giampietri C., Lentini A., Faraone D., Scoccianti M., Capogrossi M. C, Facchiano, A. (2002) Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its alpha receptor. *Blood* **99**, 2045-2053
- Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen M, Wernstedt C, Alitalo K, et al. (2003) Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* **278**:40973–40979
- Döcke F (1994) Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. vollst. überarb. u. erw. Aufl. Gustav Fischer Verlag: Jena, Stuttgart, ISBN: 3432283830
- Dor Y, Porat R, Keshet E (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **280**:1367-C1374.
- Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G (2005) Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol* **18**: 97–104
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**:97–132
- Elice F, Jacoub J, Rickles FR, Falanga A, Rodeghiero F. (2008) Hemostatic complications of angiogenesis inhibitors in cancer patients. *Am J Hematol*. in print
- Eming SA und Krieg T (2006) Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Investig Dermatol Symp Proc*. **11(1)**: 79-86
- Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K (1997) Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**: 2475-2483
- Espey LL (1980) Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol.Reprod.* **22**, 73-106

- Evans AC und Fortune JE (1997) Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* **138**, 2963-2971
- Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J (1999) Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochemical Biophysical Research Communications* **257**(3): 891-894
- Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault J, Neufeld G, Savi P, Herbert J, Bono F (2006): Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood*, **108** (4)
- Ferrara N, und Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* **18**, 4-25
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* **9**, 669-676
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**:391-400
- Findlay JK (1986) Angiogenesis in reproductive tissues. *J.Endocrinol.* **111**, 357-366
- Flowers B, Cantley TC, Martin MJ, Day BN (1991) Episodic secretion of gonadotrophins and ovarian steroids in jugular and utero-ovarian vein plasma during the follicular phase of the oestrous cycle in gilts. *J.Reprod.Fertil.* **91**, 101-112
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70
- Fürbass R, Kalbe C, Vanselow J. (1997) Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. *Endocrinology.* **138**(7):2813-9.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung Y D, Ellis L M, Semenza G L, 2002: Insulin-like Growth Factor 1 Induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Which is Dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Colon Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(41): 38205-38211
- Gale NW und Yancopoulos GD (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* **13**: 1055–1066
- Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M (1997) Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog* **20**: 10–18
- Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sanchez-Criado JE (1999) A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. *Biol.Reprod.* **60**, 914-919
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V & Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* **273**:30336–30343

- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**, 1149-1159
- Girsh E, Greber Y, Meidan R (1995) Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. *Biol.Reprod.* **52**, 954-962
- Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shibuya M, Neufeld G (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem.* **276(22)**:18688-94
- Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ (2005) Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. *Biol Reprod* **72**:1071-1078
- Gröger M, Loewe R, Holnthoner W, Embacher R, Pillinger M, Herron GS, Wolff K, Petzelbauer P. (2004) IL-3 induces expression of lymphatic markers Prox-1 and podoplanin in human endothelial cells. *J. Immunol.* **173**:7161–7169
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989) Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol.Reprod.* **41**, 247-254
- Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J (1993) Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest.*; **69(5)**:508-17
- Guo P, Xu L, Pan S, Brekken R A, Yang S, Whitaker G B, Nagane M, Thorpe P E, Rosenbaum J S, Huang H S, Cavenee W K, Cheng S (2001) Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms Display Distinct Activities in Promoting Tumor Angiogenesis at Different Anatomic Sites. *Cancer Research* **61**, 8569-8577
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT (1998) A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes adhesion and chemotaxis of naïve T lymphocytes. *Proc.Natl Acad. Sci USA*, **95**: 258-263
- Harlow CR und Hillier SG (2002) Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. *Mol Cell Endocrinol* **187**:23-27
- Hees H und Sinowatz F (1992), Kap.7 Kreislaufsystem in Histologie, Deutscher Ärzteverlag, Köln, Deutschland, 165-176, ISBN 3-7691-0257-6
- Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G (2001) Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mechanisms of Development*, **109(1)**: 115-119
- Heldin CH, Ostman A, Eriksson A, Siegbahn A, Claesson-Welsh L, Westermark B (1992) Platelet-derived growth factor: Isoform-specific signaling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. *Kidney International* **41**: 571-574
- Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G (2001): Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mechanisms of Development*, **109(1)**:115-119
- Hesch RD (1989) Endokrinologie Teil A., Urban & Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore

- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Oosterom AT & De Bruijn EA (2004) Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis *Pharmacol Rev* **56**:549–58
- Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ (1998) VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am.J.Physiol* **274**, H1054-H1058
- Horejsi W und Bazil V (1989) Surface proteins and glycoproteins of human leukocytes. *Biochemical Journal* **253**: 1-26
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J.Biol.Chem.* **267**, 26031-26037
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible-factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:7987–7992
- Huynh-Do U (2006) Angiogenese und Antiangiogenese: die zwei Gesichter der Gefäßneubildung *Schweiz Med Forum* 6: 763-76
- Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD. (2006) CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1 *J Biol Chem.*;281(36):26069-80
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, et al. (1998) Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **12**:149–162
- Ji, R-C (2006). Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Review*, 25: 677-694
- Jia XC und Hsueh AJ (1984) Homologous regulation of hormone receptors: luteinizing hormone increases its own receptors in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **115**,2433-2439
- Jia XC, Kessel B, Welsh TH, Jr., Hsueh AJ (1985) Androgen inhibition of folliclestimulating hormone-stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **117**, 13-22
- Jones A, Fujiyama C, Blanche C, Moore JW, Fuggle S, Cranston D, Bicknell R & Harris AL (2001) Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines. *Clin Cancer Res* **7**:1263–1272
- Jüttner S, Wissmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretschel S, Schlag PM, Kemmner W, Höcker M. (2006) Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol.*, **24(2)**: 228-240
- Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ (2005) Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod.Biol.* **5**, 111-136
- Kaneko M, Kato Y, Kitano T, Osawa M (2006) Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/Podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene* **378**: 52–57

- Karge WH, Schaefer EJ, Ordovas JM (1998) Quantification of mRNA by polymerase chain reaction(PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. *Methods Mol.Biol.* 110,43-61
- Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biology* 4, E2 - E5
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 5(1):74-80
- Karpanen, T und Mäkinen, T (2005). Regulation of lymphangiogenesis-From cell fate determination to vessel remodelling. *Experimental Cell Research*, 312 :575-583
- Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M (2005) Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 26: 195–200
- Kazuno M, Tokunaga T, Oshika Y, Tanaka Y, Tsugane R, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Nakamura M (1999) Thrombospondin-2 (TSP2) expression is inversely correlated with vascularity in glioma. *Eur J Cancer.* 35(3):502-6.
- Kendall RL und Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 10705-10709
- Kerbel RS und Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 2:727-739
- Kerbel RS (2004) Vasohibin: the feedback on a new inhibitor of angiogenesis *J Clin Invest.* 2004 October 1; 114(7): 884–886
- Kessel B, Liu YX, Jia XC, Hsueh AJ (1985) Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Biol.Reprod.* 32, 1038-1050
- Khachigian LM und Chesterman CN (1992) Platelet-derived growth factor and alternative splicing: a review. *Pathology* 24: 280-290
- Kim HR, Upadhyay S, Li G, Palmer KC, Deuel TF (1995) Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21): 9500–9504
- Kimura N und Kimura I (2005) Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 55: 83–86
- Kikuno R, Nagase T, Ishikawa K, Hirose M., Miyajima N., Tanaka A, Kotani H., Nomura N, Ohara O (1999) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Research* 6, 197-205
- Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, Washimine H, Ichiki Y, Kawamoto M (1994) Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), *FEBS Lett* 348 :35–37

- Klagsbrun M und D'Amore PA (1991) Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* **53**:217-239
- Klagsbrun M und Moses MA (1999) Molecular angiogenesis. *Chem Biol.* **6(8)**:R217-24
- Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R (2002) The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol.* **515**:33-48
- Kleinsmith LJ (2005) Principles of Cancer Biology, Copyright Pearson Benjamin Cummings ISBN: 0321432843
- Kliem H, Welter H, Kraetzl WD, Steffl M, Meyer HHD, Schams D, Berisha B (2007) Expression and localisation of extracellular matrix degrading proteases and their inhibitors during the oestrous cycle and after induced luteolysis in the bovine corpus luteum *Reproduction* 134 535–547
- Klinik für Tumorbologie Freiburg, Das Biotech/Life Sciences Portal Baden Württemberg: Lymphsystem spielt wichtige Rolle bei der Bildung von Metastasen, 2008 (<http://www.bio-pro.de/de/region/freiburg/magazin/01188/index.html>)
- König und Liebig (2004) Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis in einem Band, 3., überarb. u.erw. A., Kap. 11: Weibliche Geschlechtsorgane, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, ISBN: 3794523909
- Koh J-L (2008) Expression of angiogenic factors, receptors and localisation of VEGFR-3 in bovine corpus luteum during the oestrus cycle and pregnancy, Bachelor-Arbeit, Lehrstuhl für Physiologie der Technischen Universität München
- Kroll J und Waltenberger J (1998) VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **252**, 743-746
- Krusche CA, Vloet TD, Herrler A, Black S, Beier HM (2002) Functional and structural regression of the rabbit corpus luteum ist associated with altered luteal immune cell phenotypes and cytokine expression patterns. *Histochem Cell Biol*; **118(6)**:479-489
- LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N (2001) Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**:877-884
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162
- Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M (1996) VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am.J.Physiol* **270**:H1803-H1811
- Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U (2000) PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* **5**:302-9
- Li X und Eriksson U (2003) Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Adv Drug Deliv Rev. Cytokine Growth Factor Rev.* **14(2)**:91-8

- Li Y, Zhang F, Nagai N, Tang Z, Zhang S, Scotney P, Lennartsson J, Zhu C, Qu Y, Fang C, Hua J, Matsuo O, Fong G, Ding H, Cao Y, Becker K G, Nash A, Heldin C, Li X, (2008) VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *The Journal of Clinical Investigation*, **118(3)**:913-23
- Lindner, DJ (2002) Interferons as antiangiogenic agents. *Curr. Oncol. Rep.* **4**:510-514
- Mäkinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U & Alitalo K (1999) Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem* **274**:21217–21222
- Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa SI, Ylä-Herttua S, Alitalo K (2001) Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nature Med.*, **7**., 199–205
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, Mc Lain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davies D, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**: 55-60
- Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS (2001) Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.*, **20**., 672–682
- Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M (2005) Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **113**: 899–910
- Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR (1991) A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 9026-9030
- McNatty KP, Gibb M, Dobson C, Thurley DC (1981) Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *J.Endocrinol.* **90**, 375-389
- Meyer HH, Eisele K, Osaso J (1989) A biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 alpha. *Prostaglandins* **38**, 375-383
- Meyer HH, Sauerwein H, Mutayoba BM (1990) Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 beta. *J Steroid Biochem.* **35**, 263-269
- Morelli D, Lazzerini D, Cazzaniga S, Squicciarini P, Bignami P, Maier JA, Sfondrini L, Ménard S, Colnaghi MI, Balsari A. (1998) Evaluation of the balance between angiogenic and antiangiogenic circulating factors in patients with breast and gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res.*,**4(5)**:1221-5
- Nakano H und Gunn MD (2001) Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J Immunol.* **166(1)**:361-9.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, and Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13**:9–22
- Neufeld G, Kessler O, Herzog Y (2002) The interaction of neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* **515**:81-90
- Neuvians TP, Pfaffl MW, Berisha B, Schams D, (2003): The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology* **25**: 359-372
- Neuvians TP, Berisha B, Schams D (2004): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Fibroblast Growth Factor (FGF) Expression During Induced Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. *Molecular Reproduction and Development* **67**:389-395
- Nguyen V, Chen SC, Trin J, Kim H, Coomber BL, Dumont DJ (2007) Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2 *BMC Cell Biology* **8**:10
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1996) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band III, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane; 3., überarbeitete Auflage, Parey Bucherverlag Berlin ISBN 3-8263-3053-6
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1999) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II, Eingeweide; 8., vollständig überarbeitete Auflage, Parey Bucherverlag Berlin ISBN 3-8263-3179-6
- Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC (2003) Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia, *FASEB J* **17**:1499–1501
- Nör JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ (2000) Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res.* **37(3)**:209-18
- Nose K, Saito H, Kuroki T (1990) Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* **1**: 511-518
- Olofsson B, Korpelainen E, Pepper M S, Mandriota S J, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch M M, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U (1998) Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *PNAS* **95**: 11709-11714
- Ordenez NG (2006) Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol* **13**: 83-88
- Oshika Y, Masuda K, Tokunaga T, Hatanaka H, Kamiya T, Abe Y, Ozeki Y, Kijima H, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y, Nakamura M (1998) Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* **4(7)**: 1785-1788
- Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE (2002) Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms *J Biol Chem* **277**:48403-48409
- Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K (1992) FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.*; **52(20)**:5738-43.

- Petrik JJ, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J (2002) Expression and localization of thrombospondin-1 and -2 and their cell-surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum. *Biol Reprod* **67**:1522-1531
- Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaschki D, Mortimer P, Ylä-Herttua S, Miura N, Alitalo K (2004) Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med.* **10(9)**:974-81
- Picton HM, Miller AT, Hunter MG (1999) Effect of FSH infusion on follicle development in GnRH agonist-treated gilts. *J.Reprod.Fertil.* **117**, 249-257
- Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJ (1991) Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **128**, 2449-2456
- Plendl J (2000) Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat.Histol.Embryol.* **29**, 257-266
- Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. (2002) Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(25)**:16069-74
- Popesko P (1979) Atlas der topographischen Anatomie der Haustiere, Bd. 3 Becken und Gliedmassen; Enke Verlag, Stuttgart, ISBN: 3-432-90241-7
- Prakash BS, Meyer HH, Schallenberger E, van de Wiel DF (1987) Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J Steroid Biochem.* **28**, 623-627
- Ramirez MI, Millien G, Hinds A, Cao YX, Seldin DC, Williams MC (2003) T1 $\alpha$ , a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolous formation at birth. *Dev Biol* **256**: 61–72
- Redmer DA und Reynolds LP (1996) Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod.* **1(3)**:182-92.
- Reibiger I und Spanel-Borowski K (2000) Differenece in localisation of eosinophils ans mast cells in the bovine ovary *Journal of Reproduction and Fertily* **118**: 243-249
- Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer D.A.(1994) Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog Growth Factor Res* **5**: 159-175
- Reynolds LP und Redmer DA (1998) Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J.Anim Sci.* **76**, 1671-1681
- Ribatti D, Nico B, Spinazzi R, Vacca A, Nussdorfer GG (2005) The role of adrenomedullin in angiogenesis. *Peptides.* **26**:1670-1675
- Richards JS (1979) Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog.Horm.Res.* **35**, 343-373
- Richter T (2007) Expression of lymphangiogenic factors in the bovine ovary in distinct treatments, Praktikumsarbeit am Institut für Physiologie der Technischen Universität München
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674

- Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K (1998) Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *Journal of Biological Chemistry* **273(14)**: 8413-8418
- Robinson CJ und Stringer S (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Commentary. Journal of Cell Science* **114**, 853-865
- Roche JF (1996) Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev.Reprod.* **1**, 19-27
- Robinson CJ, Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J.Cell Sci.* **114**, 853-865
- Rohm F, Spanel-Borowski K, Eichler W, Aust G (2002) Correlation between expression of selectins and migration of eosinophils into the bovine ovary during the periovulatory period *Cell Tissue Res* **309**: 313-322
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L (1974) A Platelet-Dependent, Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **71(4)**:1207-10
- Rüsse I und Sinowatz F (1998), Kap. 9.4 Lymphgefäße in Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, 2. unveränderte Auflage, Parey-Verlag, Berlin, Deutschland, 234-236, ISBN: 3-8263-3268-7
- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM & Johnson RS (2000) Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* **60**:4010-401
- Sabin FR (1902) On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.*, **1**:36-389
- Sabin, FR (1909) The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. *Am. J. Anat.* **9**:43-91
- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D (1993) Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod.Fertil.* **97**, 197-203
- Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* **22**: 3546-3556
- Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* **166**: 913-921
- Schams D, Schallenberger E, Hoffman B, Karg H (1977) The estrous cycle of the cow: hormonal parameters and time relationships concerning estrus, ovulation and electrical resistance of the vaginal mucus. *Acta Endocrinol.* **86**:180
- Schams D, Amselgruber WM, Einspanier R, Sinowatz F, Gospodarowicz D (1994) Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. *Endocrine* **2**, 907-912

- Schams D, Kosmann M, Berisha B, Amselgruber WM, Miyamoto A (2001) Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* **109**, 155-162
- Schams D und Berisha B (2002) Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest.Anim Endocrinol.* **23**, 53-65
- Schams D und Berisha B (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) family members in corpus luteum of farm animals. *Advances in Reproduction* **67(2)**:162-171
- Schams D und Berisha B, Neuvians T, Amselgruber W & Kraetzel WD (2003) Real-time changes of the local vasoactive peptide systems (angiotensin, endothelin) in the bovine corpus luteum after induced luteal regression. *Molecular Reproduction and Development* **65**: 57-66
- Schams D und Berisha B (2004) Regulation of corpus luteum in cattle - an overview. *Reprod Dom Anim*, **39**:241-251
- Scholl FG, Gamallo C, Vilar S, Quintanilla M (1999) Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci* **112**: 4601-4613
- Scrofani SD, Fabri LJ, Xu P, Maccarone P, and Nash AD (2000) Purification and refolding of vascular endothelial growth factor-B. *Protein Sci* **9**:2018-2025
- Semenza G (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem.Pharmacol.* **64**, 993-998
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat Rev Cancer* **3** :721-732
- Senger PL (2003) Pathways to Pregnancy and Parturition, Second Edition; Kap. 2 Female Anatomy; Current Conceptions Inc., Pullman, Washington, ISBN: 0-9657648-1-8
- Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF (1998) Homologous upregulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J.Biol.Chem.* **273**, 29979-29985
- Shen J, Yang X, Xiao W, Hackett SF, Sato Y, Campochiaro PA (2006) Vasohibin is up-regulated by VEGF in the retina and suppresses VEGF receptor 2 and retinal neovascularization. *FASEB Journal* **20(6)**, 723-725
- Shibahara J, Kashima T, Kikuchi Y, Kunita A, Fukayama M (2006) Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system. *Virchows Arch* **448**: 493-499
- Shibuya T, Watanabe K.; Yamashita H.; Shimizu K.; Miyashita H.; Abe M.; Moriya T; Ohta H; Sonoda H; Shimosegawa T; Tabayashi K; Sato Y (2006) Isolation and characterization of Vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor Vasohibin. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **26(5)**: 1051-1057
- Shimizu K, Watanabe K., Yamashita H., Abe M., Yoshimatsu H., Ohta H., Sonoda H. Sato Y. (2005) Gene regulation of a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* **327(3)**: 700-706

- Shimizu T, Jayawardana BC, Nishimoto H, Kaneko E, Tetsuka M und Miyamoto A. (2008) Hormonal regulation and differential expression of neuropilin (NRP)-1 and NRP-2 genes in bovine granulosa cells. *Reproduction* **131**:555-559
- Shimoda H, Bernas MJ, Witte MH, Gale NW, Yancopoulos GD, Kato S. (2007) Abnormal recruitment of periendothelial cells to lymphatic capillaries in digestive organs of angiopoietin-2-deficient mice. *Cell Tissue Res.* **328(2)**:329-37
- Shin JW, Jurisic G, Detmar M. (2008) Lymphatic-specific expression of dipeptidyl peptidase IV and its dual role in lymphatic endothelial function. *Exp Cell Res.* **314(16)**:3048-56
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Med.*, **7**: 192-198
- Slomiany MG und Rosenzweig SA, 2006: Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) dependent and independent regulation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) stimulated vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, **318(2)**:666-675
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Med.*, **7**:, 186-191
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**:735-745
- Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M (2002) VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* **85**:357-368
- Srinivasan R.A., Dillard M.E., Lagutin O.V., Lin F., Tsai S., Tsai M., Samokhvalov I. M., Oliver G. (2007) Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature *GENES & DEVELOPMENT*; **21**:2422-2432
- Stacker S, Caesar C, Baldwin M.E., Thornton G.E., Williams R.A., Prevo R., Jackson D.G., Nishikawa S., Kubo H., Achen M.G. (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Medicine* **7**: 186-191 (2001)
- Stock AE, Fortune JE (1993) Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* **132**, 1108-1114
- Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM (2001) Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch.Med.Res.* **32**, 567-575
- Streit M, Riccardi L., Velasco P., Brown L.F., Hawighorst. T, Bornstein P, Detmar M. (1999) Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **96**: 14888-14893
- Strickland S, Beers WH (1976) Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J.Biol.Chem.* **251**, 5694-5702

- Sun J, Blaskovich M. A., Jain R.K., Delarue F., Paris D, Brem S., Wotoczek-Obadia M., Lin Q., Coppola D, Choi K, Mullan Mm, Hamilton A. D., Sebti S. M. (2004) Blocking Angiogenesis and Tumorigenesis with GFA-116, a Synthetic Molecule that Inhibits Binding of Vascular Endothelial Growth Factor to its Receptor *Cancer Research* **64**, 3586-3592
- Takahashi H, Shibuya M (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/ VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Review. Clinical Science* **109**: 227-241
- Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M, Hori M (2002) Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:3657-3662
- Tamanini C und De Ambrogi M. (2004) Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim.* **39(4)**:206-16
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K (2005a) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc.Res.* **65**, 550-563
- Tammela T. und Petrova T.V., Alitalo K. (2005b) Molecular lymphangiogenesis:new players *Trends Cell Biol.***15(8)**:434-41
- Terman BI, Vermazen MD, Carrion ME, Dimitrov D, Armeöino DC, Gosodarowicz D und Bohlen P. (1992) Identification of the tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **34**: 1578-1586
- Thelen A, Scholz A, Benckert C, von Marschall Z, Schröder M, Wiedenmann B, Neuhaus P, Rosewicz S, Jonas S. (2008) VEGF-D promotes tumor growth and lymphatic spread in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* **122(11)**:2471-81
- Thomas FH, Wilson H, Silvestri A, Fraser HM. (2008) Thrombospondin-1 expression is increased during follicular atresia in the primate ovary *Endocrinology.* **149(1)**:185-92
- Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y (1999) Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *British Journal of Cancer* **79(2)**: 354-359
- Tonetta SA und diZerega GS (1989) Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr.Rev.* **10**, 205-229
- Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P & Jain RK (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha hypoxia response element VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* **60**:6248–6252
- Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J.Clin.Invest* **95**, 1798-1807
- Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, Bilski JJ, Luther JS, Johnson ML, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT (2006) Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced regression in sheep. *Reproduction* **131**, 1115-1126

- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, and Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **269**:26988–26995
- Walters DL, Schams D, Schallenberger E (1984) Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrus cycle in the cow *Journal of Reproduction and Fertility* **71**: 479-491
- Wandji SA, Gadsby JE, Barber JA, Hammond JM (2000) Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. *Endocrinology*, **141**:2648-2657
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M (2000) Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* **2**,143-147
- Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, Ohta H, Imagawa K, Hojo K, Maki H, Sonoda H, Sato Y (2004) Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J.Clin.Invest* **114**: 898-907
- Wenger RH, Kvietiko I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH (1997) Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is regulated at the post-mRNA level. *Kidney International*, **51**: 560-563
- Weimann E, Kiess W (1991) Wachstumsfaktoren - Grundlagen, Biochemie und klinische Bedeutung Schattauer Verlag Stuttgart
- Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GFJM, Schlingemann RO (2001) VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol* **195**:490-497
- Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial–mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* **9**: 261-272
- Wicki A und Christofori G (2007) The potential role of podoplanin in tumour invasion *British Journal of Cancer* (2007) **96**, 15
- Wigle JT und Oliver G (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, **98**: 769-778
- Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson G, Oliver G (2002) An essential role for *Prox1* in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype *EMBO J.*; **21**(7): 1505–1513
- Wiltbank MC, Dysko RC, Gallagher KP, Keyes PL (1988) Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *J Reprod Fertil* **84**:513-520
- Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaidis KH, von Kaisenberg CS, Borges J, Stark GB, Alitalo K, Tomarev SI, Niemeyer C, Rössler J.(2002) The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J.*; **16**(10):1271-3
- Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem* **276**:25520-25531

Yamashita H, Abe M, Watanabe K, Shimizu K, Moriya T, Sato A, Satomi S, Ohta H, Sonoda H, Sato Y (2006) Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochemical Biophysical Research Communications* **345**(3): 919-925

Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Bréant C, Karkkainen ML, Alitalo K, Eichmann A (2002) Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice *Development*. **129**(20):4797-806

Zaleski MB (1991) Cell-surface molecules in the regulation of immune responses. *Immunology Investigations* **20**: 103-131

Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE Jr. (1981) Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selectivity distribution of human Chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* **109**:356-362

Zeleznik AJ und Kubik C (1986) Ovarian responders in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone: increased sensitivity to the maturing follicle to FSH. *Endocrinology* **119**:2025-2032

Zhang X, Fitzsimmons RL; Cleland L.G.; EY P.L.; Zannettino A.W.; Farmer E.-A.; Sincock P.; Mayerhofer G. (2003) CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. *Laboratory Investigation* **83**(3): 317-332

### Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. H.H.D. Meyer möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut und sein jederzeit offenes Ohr für die Doktoranden des Instituts, danken.

Herrn PD Dr. B. Berisha danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine fachliche Unterstützung und Beratung.

Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz für seine Bereitschaft, die Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zu vertreten.

Bei Herrn Prof. Dr. Schams möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft bedanken und dafür, dass er mich an seiner jahrzehntelangen Erfahrung teilhaben lassen.

Vielmals danken möchte ich auch Frau I. Celler, Frau G. Schwentker und Frau M. Partsch für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Sehr dankbar bin ich auch über die Hilfe von Anna Gröbner bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und der Immunhistochemie zu HIF-1 $\alpha$ .

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Heike Kliem für die nette Einarbeitung und Unterstützung wann immer Fragen aufkamen und meinen Mit-Doktoranden, allen voran Anna, Sabine und Rainer, für die gemeinsame Lösung so manchen Rätsels rund um meinen PC und dessen Anwendung. Vielen Dank für die lustigen Stunden und das nette und kollegiale Arbeitsklima!

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die vielen schönen gemeinsamen Feiern zu allen möglichen Anlässen.

Danken möchte ich auch den Tierärzten und Fleischbeschauern des Schlachthofes Landshut für die immer freundlich gewährte Unterstützung bei der Probenbeschaffung.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken.

Ganz herzlich danke ich auch allen lieben Menschen in meinem Leben, die auf viele unterschiedliche Arten für mich da waren – ihr wisst schon bescheid...! 😊

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Stefanie Schilffarth  
geb. 24. August 1979 in Nürnberg  
ledig

### Schulbildung

1986-1990                      Grundschule Wunsiedel  
1990-1999                      Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel

### Berufsbildung

2001-2007                      Veterinärmedizinische Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
  
05.2007                         Approbation als Tierärztin

### Promotion

Seit 04.2007                      Doktorandin am Lehrstuhl für Physiologie,  
Technische Universität München,  
Weihenstephan