
**Synergistische Effekte von NO und Progesteron auf die
Differenzierung des Endometriums zum Zeitpunkt der
Implantation**

Inaugural Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr.rer.nat.
Des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften
an der
Universität-Gesamthochschule–Essen

vorgelegt von
Thomas Thienel

aus Dortmund

Im Juni 2000

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen und in der Abteilung für Fertilisationskontrolle und Hormontherapie (FK/HT) bei der Schering AG, Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. Burda

Vorsitzender: PD. Dr. Lumbsch

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 10. 2000

Für Kaja und Stephanie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DIE EMBRYO-IMPLANTATION BEI DER RATTE.....	1
1.2	BEDEUTUNG VON PROGESTERON FÜR DEN IMPLANTATIONSVORGANG.....	7
1.3	SIGNALÜBERTRAGUNG ÜBER STEROIDREZEPTOREN	9
1.4	PROGESTERONANTAGONISTEN	11
1.5	DAS STICKSTOFFMONOXID(NO)SYSTEM	12
1.5.1	<i>Signalübertragung durch die induzierte NO Synthase</i>	<i>14</i>
1.5.2	<i>Bedeutung von NO für die Reproduktion.....</i>	<i>15</i>
1.5.3	<i>Inhibitoren der NO Biosynthese</i>	<i>17</i>
1.6	EINGESETZTE MARKER FÜR DIE ZELLBIOLOGISCHE WIRKUNG VON PROGESTERON UND STICKSTOFFMONOXID (NO) WÄHREND DER EMBRYO- IMPLANTATION	18
1.6.1	<i>PCNA („Proliferating cell nuclear antigen“)</i>	<i>18</i>
1.6.2	<i>Desmin</i>	<i>18</i>
1.6.3	<i>COX II (Cyclooxygenase II)</i>	<i>19</i>
1.6.4	<i>CD 90 (Thy-1)</i>	<i>19</i>
1.6.5	<i>NFkappaB (p65 Untereinheit)</i>	<i>20</i>
1.6.6	<i>Aktiviertes Diphosphoryliertes ERK1&2</i>	<i>21</i>
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
3	MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1	TIEREXPERIMENTE UND AUSWERTUNGEN	23

3.2	VERSUCHSTIERE.....	23
3.3	APPLIZIERTE SUBSTANZEN.....	24
3.4	ANTIKÖRPER.....	24
3.4.1	<i>Primär-und Sekundärantikörper.....</i>	<i>24</i>
3.5	IN VIVO EXPERIMENTE ZUM SYNERGISMUS VON AMINOGUANIDIN (iNOS INHIBITOR) UND ONAPRISTON („ULTRA LOW DOSE“) IN DER FRÜHGRAVIDITÄT ZU VERSCHIEDENEN IMPLANTATIONSPHASEN.....	26
3.5.1	<i>Experimente in der Präimplantationsphase.....</i>	<i>26</i>
3.5.2	<i>Experimente in der Peri- und in der Postimplantationsphase.....</i>	<i>28</i>
3.5.3	<i>Experimente zu den Austragungsversuchen in der Peri- und in der Postimplantationsphase.....</i>	<i>28</i>
3.5.4	<i>Experimente zur Zeitreihe in der Postimplantationsphase.....</i>	<i>29</i>
3.6	FIXIERUNG DES BIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGSMATERIALS.....	30
3.6.1	<i>Präimplantationsembryonen.....</i>	<i>30</i>
3.6.2	<i>Implantationsstellen.....</i>	<i>31</i>
3.7	HISTOLOGIE.....	31
3.7.1	<i>Färbetechniken.....</i>	<i>31</i>
3.8	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN (ICH).....	32
3.8.1	<i>LSAB (Labeled StreptAvidin-Biotin Staining).....</i>	<i>33</i>
3.8.2	<i>TUNEL Methode („Terminal desoxyribosyl Transferase-mediated UTP nick end labeling“).....</i>	<i>34</i>
3.8.3	<i>Einfach- und Doppelmarkierungen mit der Fluoreszenztechnik.....</i>	<i>34</i>
4	ERGEBNISSE.....	36
4.1	WIRKUNG VON AMINOGUANIDIN (iNOS INHIBITOR) UND ONAPRISTON („ULTRA LOW DOSE“) IN VERSCHIEDENEN PHASEN DER FRÜHGRAVIDITÄT.....	36

4.1.1	<i>Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston in der Präimplantationsphase</i>	36
4.1.2	<i>Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die frühe Implantation</i>	38
4.1.3	<i>Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die Präimplantationsembryonen</i>	39
4.1.4	<i>Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston in der Peri- und Postimplantationsphase</i>	41
4.1.5	<i>Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die Geburtenrate während der Applikation in der Peri- und Postimplantationsphase</i>	44
4.1.6	<i>Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die Geburtenrate bei kürzerer Behandlungsdauer während der Postimplantationsphase</i>	46
4.1.7	<i>Bestimmung des genauen Zeitpunktes der Resorptionen nach dreitägiger Behandlung von Aminoguanidin und Onapriston in der Postimplantations-phase</i>	47
4.2	ZELLBIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IN DER DEZIDUA AM TAG 9 P.C. NACH EINER 3 TÄGIGEN BEHANDLUNG MIT AMINO GUANIDIN IN KOMBINATION MIT ONAPRISTON	50
4.2.1	<i>I-NOS Expression in der Dezidua am Tag 8 p.c. und Tag 9 p.c.</i>	53
4.2.2	<i>Proliferation und Apoptose nach Applikation</i>	54
4.2.3	<i>Desmin-Expression nach Applikation</i>	55
4.2.4	<i>Sinusoidausbildung und COX II Expression nach Applikation</i>	56

4.2.5	<i>Expression des Angiogenesemarkers CD 90 auf der mesometralen Seite nach Applikation</i>	58
4.2.6	<i>Expression des Transkriptionsfaktors NfkappaB nach Applikation..</i>	59
4.2.7	<i>Expression der aktivierten MAPkinase ERK1&2 am Tag 8 p.c. und Tag 9 p.c. und am Tag 9 p.c. nach Applikation</i>	60
4.2.8	<i>Ko-lokalisierung von aktiviertem ERK 1&2 und iNOS im Endothel nach Applikation.....</i>	63
4.2.9	<i>Ko-lokalisierung von aktiviertem ERK 1&2 und iNOS im Ektoplazentarkonus nach Applikation</i>	65
5	DISKUSSION.....	67
5.1	BEDEUTUNG DER NOS EXPRESSION IN DER FRÜHGRAVIDITÄT	68
5.2	BEDEUTUNG VON PROGESTERONS FÜR DIE FRÜHGRAVIDITÄT	74
5.3	ZUM SYNERGISMUS VON NO UND PROGESTERON IN DER PRÄIMPLANTATIONSPHASE.....	76
5.4	ZUM SYNERGISMUS VON NO UND PROGESTERON IN DER PERI-UND IN DER POSTIMPLANTATIONSPHASE	78
6	ZUSAMMENFASSUNG	84
7	LITERATURVERZEICHNIS	87
8	ANHANG	I
8.1	CHEMIKALIEN	I
8.2	Tabellen	II

Abkürzungsverzeichnis

°C	=	Grad Celsius
µm	=	Mikrometer
A	=	Aminoguanidin
a.d.	=	ad libitum
Abb	=	Abbildung
AM	=	Antimesometral
AR	=	Androgenrezeptor
AS	=	Arachidonsäure
B	=	Blastocyste
bFGF	=	basic Fibroblast Growth Factor
BL	=	Blutgefäße
cAMP	=	cyclisches - Adenosinmonophosphat
cGMP	=	cyclisches - Guaninmonophosphat
COX	=	Cyclooxygenase
CSF	=	Colony Stimulating Factor
Cx	=	Connexin
d p.c.	=	Tag post coitum
D	=	Dezidua
DAB	=	3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DZ	=	Deziduazellen
E	=	Embryo
EK	=	Ektoplazentarkonus
EM	=	Embryoblast
eNOS	=	endothelial Nitric Oxide Synthase
ER	=	Östrogenrezeptor
ERK	=	extrazellulär regulierte Kinase
ET	=	Endothel
FITC	=	Fluoreszeinisothiocyanat
HB-EGF	=	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
HE	=	Hämatoxylin-Eosin

HRE	=	Hormone responsive elements
IL	=	Interleukin
iNOS	=	inducible Nitric Oxide Syntase
J	=	junctional zone
kDa	=	kilo Dalton
LBD	=	Liganden Bindungsdomäne
LIF	=	Leukemia inhibitory factor
LSAB	=	Labeled StreptAvidin-Biotin Staining
M	=	Mesometral
M	=	Molar
MAPK	=	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mg	=	Milligramm
MMP	=	Matrix-Metalloproteinasen
NFκB	=	nukleärer Faktor kappa B
nm	=	Nanogramm
nNOS	=	neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	=	Nitric oxide
O	=	Onapriston
o. g.	=	oben genannten
p.o.	=	per os
PA	=	Progesteronantagonisten
PCNA	=	Proliferating cell nuclear antigen
PGE	=	Prostaglandine
PGI	=	Prostazykline
PR	=	Progesteronrezeptor
S	=	Sinusoide
s.c.	=	subkutan
T	=	Trophoblast
TGF	=	Transforming Growth Factor
TNF	=	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	=	Terminal desoxyribosyl Transferase-mediated UTP nick end labeling

UE = Uterusepithel
UL = Uteruslumen
VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Die Embryo-Implantation bei der Ratte

Bei Mammalia ist neben der erfolgreichen Fertilisation die Implantation des Embryos in das Endometrium mit folgender Ausbildung eines feto-maternalen Austauschorgans der Plazenta von grundlegender Bedeutung für eine erfolgreiche Schwangerschaft. Klinische Untersuchungen an Menschen zeigten, dass mindestens 20 % der erfolglosen Schwangerschaften auf Störungen in der frühen Phase während der Implantation (Peri-Implantationsphase) zurückzuführen sind (Wilcox et al. 1988). Als allgemein gesichert gilt, dass die Steroidhormone Progesteron und Östrogen speziesabhängig den Implantationsprozeß steuern (Psychoyos 1973, Finn et al. 1974, Glasser et al. 1975, Psychoyos 1976). Nur wenig bekannt hingegen ist, welche zellbiologischen Mechanismen und Signalkaskaden für den Implantationsprozess notwendig sind.

Nach der Befruchtung der Oozyte kommt es in der Tuba uterina zu einer Anzahl von Furchungsteilungen. Über das 2-, 4-, 8-, 16-Zellstadium entwickelt sich schließlich die Blastocyste, die zunächst noch frei im Uteruslumen liegt. Die Blastocyste läßt eine Differenzierung in eine äußere und eine innere Zellschicht erkennen. Aus der äußeren Zellschicht, dem sogenannten Trophoblasten, entwickelt sich im späteren Verlauf der Schwangerschaft die Plazenta. Die Trophoblastzellen übernehmen außerdem bei der Implantation der Blastocyste in das Endometrium die Rolle der Kontaktaufnahme und Invasion. Die innere Zellmasse bezeichnet man als Embryoblast; aus ihr entwickelt sich der Embryo (Abb. 1).

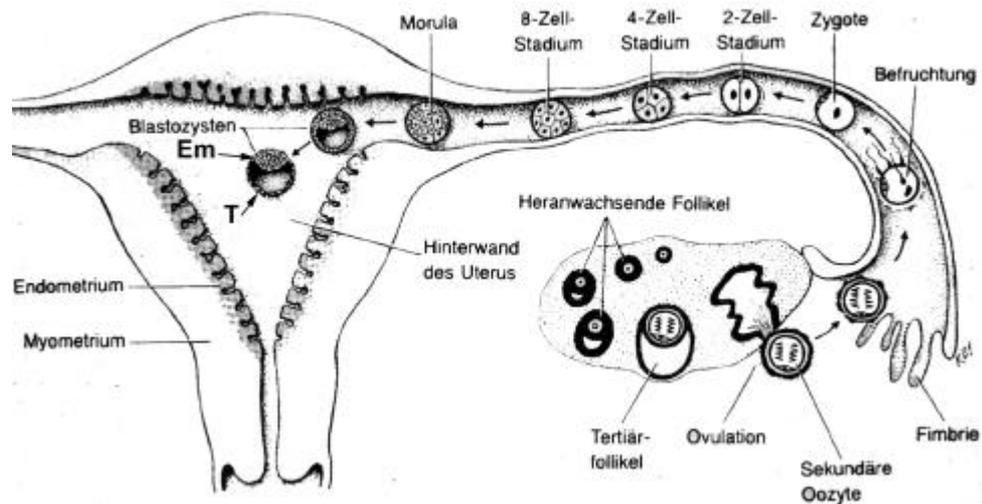


Abb. 1

Schematische Darstellung der Präimplantationsphase beim Menschen. T = Trophoblast, E = Embryoblast.

Zu Beginn des Implantationsvorganges schlüpft die Blastocyste aus der sie bis dahin umgebenden Zona pellucida. Danach ist sie in der Lage, über die Trophoblastzellen Kontakt mit dem Uterusepithel aufzunehmen. Die Annäherung der Blastocyste an das Uterusepithel wird als Apposition bezeichnet. Erst mit dem Prozeß der Adhäsion kommt es zu einem stabilen Kontakt zwischen den Trophoblastzellen und dem Uterusepithel. Diese Zell-Zell- Interaktion zwischen den Epithelzellen des Trophoblasten mit dem Uterusepithel wird auch als zellbiologisches Paradoxon beschrieben, da „normalerweise“ Epithelien nicht die Eigenschaft besitzen, mit ihrem apikalen Zellpol adhäsiv zu sein (Denker 1990, 1993). Die Voraussetzung für die Interaktion der Epithelien ist die hormonelle Überführung des Endometriums in die sogenannte rezep tive Phase. Nur in dieser rezep tiven Phase des Endometriums ist eine Implantation der Blastocyste („implantation window“) möglich (Psychoyos 1995).

Die Implantation der Blastocyste kann speziesabhängig in unterschiedlichen Arealen der Uteruswand stattfinden. Bei der Ratte liegt die Adhäsionsstelle zwischen der Blastocyste und dem Uterusepithel an dem Mesometrium

entgegengesetzten Pol. Man spricht daher von einer antimesometralen Implantation. Im Unterschied zum Meerschweinchen, Schimpansen und Menschen, bei der die Blastocyste direkt in das endometriale Stroma eindringt, entwickelt sich bei der Ratte die Blastocyste in einer taschenförmigen Einsenkung des Uteruslumens und ist vorerst vom Uterusepithel umgeben (Abb.2). Man spricht daher von einer exzentrischen antimesometralen Implantation; der Embryo liegt bei diesem Implantationstypus in einer interstitiellen Implantationskammer (Abb.2). Dieser Vorgang findet bei der Ratte ca. am Tag 5,5 post coitum (p.c.) statt (Starck 1975).

Durch die Anwesenheit der Blastocyste im Uteruslumen kommt es zu dramatischen morphologischen und biochemischen Veränderungen im endometrialen Stroma, die Dezidualisierungsreaktion. Ein morphologisches Charakteristikum der Dezidualreaktion ist die Transformation der Fibroblasten des Endometriums in große polygonale Deziduazellen (Abb.2). Die Transformation des Endometriums führt zu einer Etablierung eines schwangerschaftserhaltenden Gewebes, welches mit dem zyklischen Endometrium kaum zellbiologische Gemeinsamkeiten aufweist. Die Dezidualisierungsreaktion, die von der Reaktion auf den invadierenden Embryo erfolgt, steht unter Kontrolle der mütterlichen Steroidhormone Progesteron und Östrogen. Dabei nimmt der Uterus an Gewicht und Umfang deutlich zu. Dieses Wachstum ist nicht nur auf die Proliferation und Differenzierung des endometrialen Stromas, sondern auch auf die erhöhte Permeabilität und Neubildung von Blutgefäßen zurückzuführen, die mit der Dezidualisierung einhergeht (Abb.2) (Christofferson und Nilsson 1988).

Die lokal erhöhte Gefäßpermeabilität im Bereich der Implantationsstelle kann durch die Pontamin blue Färbung, 10 - 15 min nach der intravenösen Injektion, makroskopisch sichtbar gemacht werden und dient als Hinweis für den Bereich der Uteruswand, in den die Blastocyste invadiert (Psychoyos 1960, 1961). Es ist

allgemein akzeptiert, dass die erhöhte Gefäßpermeabilität und Angiogenese – Neubildung von Gefäßen - vom 7. bis 10. Tag der Schwangerschaft im endometrialen Stroma eine Voraussetzung sowohl für die Entwicklung der Placenta als auch für den Erhalt der Schwangerschaft darstellt (Christofferson und Nilsson 1988, Folkmann und Shing 1992).

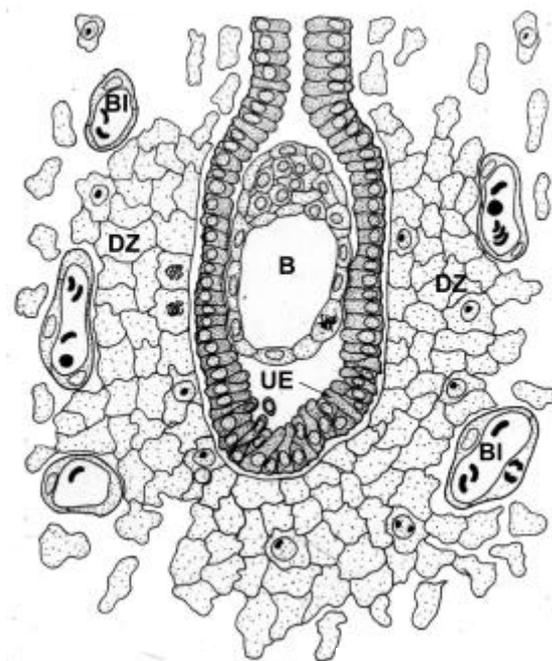


Abb. 2

Schematische Darstellung der Embryo-Implantation bei der Ratte (~Tag 5,5 p.c.), Blastocyste (B), Uterusepithel (UE), Dezidualzellen (DZ), Blutgefäße (Bl) (aus Enders und Schlafke, 1974).

Nach der Adhäsion folgt die Penetration der Trophoblastzellen durch das Uterusepithel. Dieser Vorgang zur Überwindung des Uterusepithels ist speziesabhängig und wird bei der Ratte und bei der Maus als „Displacement Penetration“ bezeichnet. Bei diesem Penetrationstypus wird der Kontakt zwischen den Uterusepithelzellen aufgebrochen und der Kontakt zwischen den Uterusepithelzellen und der Basalmembran gelockert. Die Trophoblastzellen können nun in die Spalträume eindringen und die Basalmembran überwinden (Enders 1972, Schlafke und Enders 1974). Nachdem die Trophoblastzellen das Uterusepithel überwunden haben, proliferieren diese sehr stark, wandern in das

Endometrium ein und arrodieren die Blutgefäße, um den Stoffaustausch zwischen der maternalen und embryonalen Seite zu ermöglichen. Die Trophoblastzellen haben dabei invasive Fähigkeiten und ähneln damit Tumorzellen. Allerdings stehen die Trophoblastzellen unter Kontrolle und ihr invasiver Charakter kommt mit der Ausbildung der Plazenta zum Stillstand (Strickland und Richards 1992). Das Uterusepithel, welches den Embryo bisher umgeben hat, wird letztendlich durch den Vorgang der Apoptose aufgelöst (Parr et al. 1987). Zusätzlich kommt es zu der sogenannten „closure reaction“ des Uterusepithels zum Lumen hin. Damit liegt der Embryo umgeben von Deziduazellen im endometrialem Stroma (Abb.3).

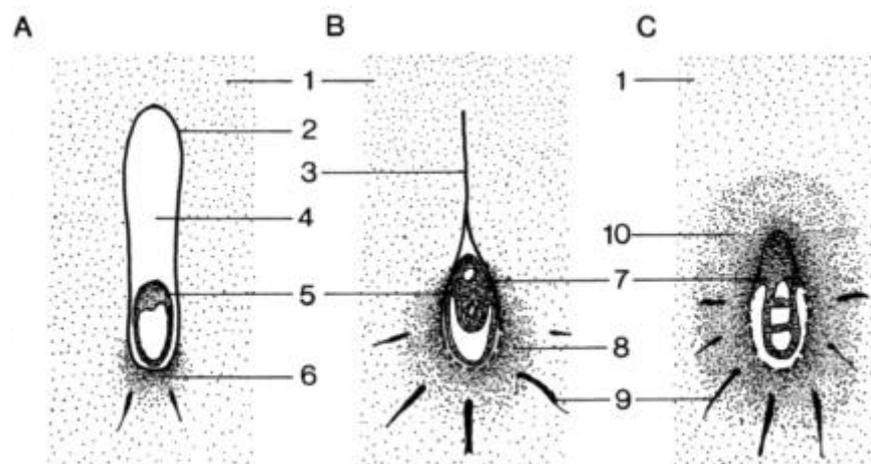


Abb. 3

Schematische Darstellung des Implantationsvorganges bei der Ratte mit der „closure reaction“. 1 = Stroma des Endometriums, 2 = Uterusepithel, 3 = Schließung des Uterusepithels zum Lumen hin („closure reaction“), 4 = Uteruslumen, 5 = Blastocyste, 6 = beginnende Dezidualreaktion, 7 = Uterusepithel, 8 = beginnende Deziduabildung, 9 = Blutgefäße, 10 = Dezidua, AM = Antimesometrale Seite, M = mesometrale Seite (verändert nach Blüm 1985).

Das Deziduagewebe entwickelt sich in einem zeitlichen und räumlichen Muster. Auf der antimesometralen Seite die primäre und die sekundäre Dezidualzone und die sich später entwickelnde Dezidua auf der mesometralen Seite.

Die primäre Dezidua auf der antimesometralen Seite beschränkt sich auf die Region, die den heranwachsenden Embryo direkt umgibt. Die Fibroblasten dieser

Region am Tag 6 p.c. sind die ersten, die sich in Deziduazellen transformieren und einige Besonderheiten aufweisen. So sind diese sehr dicht gepackt und weisen interzelluläre Kontakte wie gap junctions, Desmosomen und sogar vereinzelt tight junctions auf. Im Gegensatz zu der sekundären Dezidua und der Dezidua auf der mesometralen Seite ist die primäre Dezidua gefäßfrei (Enders und Schlafke 1967, Tachi et al. 1970). Es wird vermutet, dass die primäre Dezidua eine Barriere bildet, die den Embryo vor immunologischen Reaktionen der Mutter schützt und die Trophoblast Invasion begrenzt (Kirby 1965, Parr und Parr 1986).

Die sekundäre Dezidualzone umfasst den Hauptanteil der antimesometralen Dezidua. Diese Phase der Hypertrophie und Hyperplasie der Fibroblasten beginnt am Tag 6 p.c. Die Deziduazellen auf der antimesometralen Seite sind groß, polyploid und besitzen oft 2 - 5 Nucleoli. Während der Dezidualisierungsreaktion wird der Interzellularraum stark reduziert und es kommt unter anderem zu einem Abbau des dazwischen liegenden Kollagens und des Fibronectins der extrazellulären Matrix durch Matrix Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9) (Martello und Abrahamson 1986, Zorn et al. 1986, Matrisian 1990). Das Cytoplasma der Deziduazellen ist reich an Glykogen, Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum. Ein besonderes Charakteristikum der Deziduazellen ist die starke Expression von intermediären Filamenten. Neben Vimentin wird besonders Desmin in den Zellen stark exprimiert und akkumuliert und wird daher als Marker für die Differenzierung der Stromazellen in Deziduazellen verwendet (Glasser und Julien 1986, Glasser et al. 1987, Winterhager et al. 1991) konnten zeigen, dass Connexin43 (CX 43) zwischen Tag 7 - 9 p.c in der Dezidua in großen Mengen als Transmembranprotein exprimiert wird und als Marker für den Dezidualisierungsprozess geeignet ist.

Die Stromazellen auf der mesometralen Seite unterliegen ebenfalls der Dezidualisierung - allerdings zu einem späteren Zeitpunkt während der

Implantation -, haben im aber Vergleich mit der antimesometralen Dezidua morphologisch ein anderes Aussehen. Die Dezidua auf der mesometralen Seite scheint weniger kompakt und die Deziduazellen erscheinen kleiner, sind mehr oder weniger spindelförmig und scheinen weniger differenziert zu sein. Einen deutlichen Unterschied erkennt man zwischen dem 7. – 9. Tag p.c. in der Entwicklung der Gefäße zwischen der anti- und mesometralen Seite der Dezidua. Während auf der antimesometralen Seite die Kapillare scheinbar ihre Form und Anordnung beibehalten, erkennt man auf der mesometralen Seite eine Dilatation der Sinusoide, die einhergehen mit einer Proliferation des Endothels. Prostaglandine scheinen bei diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen (Kennedy et al. 1989, Parr und Parr 1989). Die Dilatation der Sinusoide und die Angiogenese auf der mesometralen Seite ist eine Voraussetzung für die Trophoblastinvasion und der Entwicklung einer chorioallantoiden Plazenta (Welsh und Enders 1991).

1.2 Bedeutung von Progesteron für den Implantationsvorgang

Bei allen Mammaliern wird der Uterus nach dem Östrus in eine sogenannte rezep tive Phase gebracht, die die beste Voraussetzung für die Implantation der Blastocyste bietet. Diese essentielle Differenzierung wird von den ovariellen Steroidhormonen Östrogen und Progesteron bewirkt. Progesteron wird außer im Corpus luteum hauptsächlich in der Plazenta gebildet und ist unerläßlich für den Implantationprozeß und für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft.

Beim Meerschweinchen, Kaninchen und bei Primaten ist Progesteron allein für die erfolgreiche Implantation verantwortlich. Bei Nagetieren (Maus, Ratte) ist, neben Progesteron, Östrogen essentiell für eine erfolgreiche Implantation der Blastocyste, wie sich aus Embryotransferversuchen mit ovariectomierten Ratten, die nur mit Progesteron supplimentiert wurden, herausstellte (Psychoyos 1986). Inwieweit Progesteron essentiell für den Adhäsionsprozess und für die

Implantation der Blastocyste ist, wurde anhand von Versuchen mit Antiprogestinen untersucht. Ersetzt man Progesteron zum Zeitpunkt der Implantation durch ein Antiprogestin (Onapriston), so kann man das „implantation window“ am Endometrium, welches für eine definierte Zeit der Blastocyste erlaubt zu implantieren, schließen. Dieses Schließen des „implantation windows“ konnte anhand von Embryotransferexperimenten in Kaninchen demonstriert werden (Hegele-Hartung et al. 1992; Beier et al. 1994). Die Embryotransferexperimente zeigten aber auch, dass die Rezeptivität am Endometrium und eine erfolgreiche Implantation zusätzlich vom Aktivitätszustand der Blastocyste abhängt (Paria et al. 1993). Die Blastocyste ist daher neben dem Endometrium ein möglicher Angriffspunkt von Antiprogestinen/Antihormonen (Chwalisz et al. 1997). Weitere Untersuchungen mit Antiprogestinen (RU 486, Onapriston) zeigten, dass für den Dezidualisierungsprozess - Proliferation und Transformation der Fibroblasten - Progesteron essentiell ist. Ohne Progesteron ist eine DNA-Replikation in den Deziduazellen und eine nachfolgende Differenzierung nicht möglich (Rider and Psychoyos 1994, Cullingford and Pollard 1988). Progesteron ist damit nicht nur mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des „implantation windows“, sondern ist auch essentiell für die Dezidualisierungsreaktion und damit für die Aufrechterhaltung der Gravidität.

In den letzten Jahren konnte jedoch für die Implantationsreaktion gezeigt werden, dass nicht nur Progesteron allein Proliferations-, Differenzierungs- und Signalvorgänge am Endometrium steuert, sondern dass Faktoren eine wichtige Rolle spielen, die vor allem bei Entzündungsreaktionen exprimiert werden (Salvemini et al. 1995, Chard 1995). Da die Implantation der Blastocyste in das Endometrium eine Entzündungsreaktion darstellt – aus zwei genetisch unterschiedlichen Geweben entsteht ein neuer Organismus - kommen den Prostaglandinen (PGE_2), Prostazyklinen (PGI_2), Cytokinen (Interleukin-1, Interleukin-8), Wachstumsfaktoren (u.a. TGF, $\text{TNF-}\alpha$) und neuerdings den

Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) eine wichtige Rolle in diesem proinflammatorischem Implantationsprozeß zu. (Kennedy 1983, 1985, Bhatt et al. 1991, Stewart et al. 1992, Novaro et al. 1997, Purcell et al. 1999).

Die übergeordnete Rolle von Progesteron spielt bei diesen Vorgängen jedoch eine entscheidende Rolle, obwohl die Abhängigkeit von anderen Faktoren (LIF, CSF-1) für eine erfolgreiche Implantation gezeigt wurde (Pollard et al. 1991, Stewart et al. 1992). Diese und andere Ergebnisse während des Implantationsprozesses zeigen, dass nicht alle Vorgänge am Endometrium allein auf das Progesteron zurückzuführen sind. Ein Synergismus von Progesteron und NO während der Implantation konnte bereits von unserer Gruppe gezeigt werden (Chwalisz et al. 1999).

Bis heute ist jedoch nur unzureichend geklärt, welche Gene direkt über Progesteron und den Progesteronrezeptor im Endometrium reguliert werden. Eine große Bedeutung zur Aufklärung der Regulation der unter Progesteroneinfluss stehenden Gene im Endometrium kommt dabei den unterschiedlichen Antiprogestinen zu (Chwalisz et al. 1994). So konnte mit Hilfe der Antiprogestine für einige Gene (HB-EGF, bFGF, Connexin (CX) 26, 43) gezeigt werden, dass diese im Endometrium direkt unter Progesteroneinfluss stehen (Grümmer et al. 1994, Zhang et al. 1994, Rider et al. 1997, Grümmer 1998).

1.3 Signalübertragung über Steroidrezeptoren

Die Steroidhormone werden über den Blutkreislauf im Organismus verteilt und gelangen durch Diffusion in die Zelle. Die Wirkung der Steroide beruht im wesentlichen auf der Bindung an spezifische Steroidrezeptoren, die im Cytoplasma im inaktiven Zustand, an Hitzeschockproteine gebunden, liegen. Für

den Progesteronrezeptor gibt es mindestens zwei Formen, nämlich den A- und den B-Rezeptor. Die Bindung des Progesterons führt zu einer Aktivierung des Rezeptors mit einer Dissoziation der Hitzeschockproteine, die zu einer Translokation des Rezeptors in den Kern führt. Die Steroidhormon-Rezeptoren enthalten sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine, deren zugehörige DNA-Elemente als Hormone-Responsive-Elements (HRE) bezeichnet werden. Die Rezeptoren binden dabei in Form als Dimere, sowohl als Homodimere (A/A bzw. B/B) als auch Heterodimer (A/B) an die HRE und führen zu Transkriptionsaktivierung. Neben der Bindungsaffinität zwischen dem Steroid und seinem Rezeptor spielen Phosphorylierungsvorgänge im N-terminalen Bereich des Rezeptors eine große Rolle. Als Folge der Phosphorylierung wird die hormonvermittelte Aktivierung des Rezeptors noch verstärkt. Die Bedeutung der Phosphorylierung der Steroidrezeptoren durch MAPKinasen wurde bereits beschrieben und gilt als Beispiel für einen „crosstalk“ zwischen dem Signalweg der Steroidrezeptoren und anderen Signalwegen (Kato et al. 1995, Lange et al. 2000).

Die Steroidhormon-Rezeptoren können nicht nur transkriptionsaktivierenden, sondern auch einen reprimierenden Einfluß auf die Transkription haben (Beato et al. 1995). Dieser noch wenig verstandene Mechanismus der Steroidrezeptoren wurde an Genen beobachtet, deren Kontrollregion neben den HREs noch Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren wie NFkappaB aufweisen. In NFkappaB kontrollierten Genen wurde beobachtet, daß die Steroidhormon-Rezeptoren einen inhibierenden Einfluß auf die transkriptionssteigernde Aktivität von NFkappaB ausüben. Die Eigenschaft der Steroidhormon-Rezeptoren, andere Transkriptionsfaktoren über Komplexbildung zu inaktivieren, zeigt, wie sich zwei Signalwege beeinflussen und modulieren können (Bart van der Burg et al. 1996, Mc Kay et al. 1998).

1.4 Progesteronantagonisten

Die Entdeckung und Synthese des ersten Progesteronantagonisten (RU 486) in den achtziger Jahren durch die Firma Roussel–Uclaf war ein Meilenstein in der Steroidforschung, da nun Stoffwechselfvorgänge, die durch Progesteron reguliert werden, systematisch untersucht werden konnten (Phillibert et al. 1981, 1985). Neben RU 486 wurde später von der Schering AG eine Anzahl von Progesteronantagonisten synthetisiert und charakterisiert wie z. B. Onapriston (ZK 98.299) (Neff et al. 1984). RU 486 und Onapriston sind hinsichtlich ihrer Wirkmechanismen die am besten untersuchten Antigestagene.

Alle Progesteronantagonisten zeichnen sich durch eine hohe Bindungsaffinität zum Progesteronrezeptor (PR) aus. Durch eine direkte Interaktion mit der Liganden- Bindungsdomäne (LBD) des PR wird die Bindung des Progesterons gehemmt. Man unterscheidet vom molekularen Mechanismus her zwei unterschiedliche Typen von Progesteronantagonisten:

Typ I: 13 α -Methyl-substituierte 19- Nor-Steroide vom Onapriston-Typ und

TypII: 13 β -Methyl-substituierte 19- Nor Steroide vom RU 486-Typ.

Progesteronantagonisten (PA) vom Typ I verhindern bzw. verschlechtern die Bindung des PA/PR-Komplexes an die DNA, wohingegen Progesteronantagonisten vom Typ II die Dimerisierung des Progesteronrezeptors fördern und an die DNA binden (Klein-Hitpass 1991). RU 486 bindet aber nicht nur mit hoher Affinität an den PR, sondern auch an den Glucocorticoidrezeptor und weist in vivo eine starke antiglucocorticoide Wirkung auf. Die antiglucocorticoide Wirkung von Onapriston hingegen ist wesentlich geringer. Ebenso binden beide PAs (RU 486 und Onapriston) an den Androgenrezeptor (AR) und zeigen aber erst bei sehr hohen Dosierungen (>30 mg/kg) antiandrogene Eigenschaften. Weder RU 486 noch Onapriston bindet an den

Östrogenrezeptor (ER). Dennoch werden verschiedene östrogene Wirkungen durch die Antigestagene indirekt stark moduliert (Chwalisz et al. 1997). PA wie RU 486 können unter bestimmten Umständen, wie z. B. unter einem erhöhten cAMP Spiegel im Primaten Endometrium auch agonistische Wirkungen zeigen (Koering et al. 1986). Onapriston hingegen zeigt ausschließlich antagonistische Wirkungen und wird daher als „reines“ Antigestagen angesehen.

1.5 Das Stickstoffmonoxid(NO)system

Die Entdeckung des „endothelium-derived relaxing factor“ und seine Identifikation als Stickstoffmonoxid (NO) war eine der bedeutendsten medizinischen Entdeckungen der achtziger Jahre (Palmer et al. 1987, Ignarro 1989). 1992 wurde NO im „Science Journal“ als Molekül des Jahres auserwählt. Seitdem ist NO als universeller interzellulärer Botenstoff, der in unterschiedlichen Signalwegen und in der Modulation der Genexpression involviert ist, etabliert.

NO gehört zu den kleinsten Botenstoffen im Organismus. Es ist ein wasserlösliches Radikal mit einer Halbwertszeit von ca. 4 sec und kann Membranen durch Diffusion weitgehend frei passieren. NO besitzt die Fähigkeit, sich an Proteine anlagern oder sogar mit ihnen eine chemische Reaktion einzugehen. Die dadurch herbeigeführte Modifikation durch NO kann Signalkaskaden auslösen und dadurch Proliferations und Differenzierungszustände beeinflussen (Moncada et al. 1991).

NO wird enzymatisch aus L-Arginin mit Hilfe der NO-Synthasen gebildet, wobei L-Citrullin entsteht. NO-Synthasen sind Hämoproteine, die diese Umwandlung von L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und NADPH katalysieren. Derzeit sind drei Arten von NOS-Isoenzymen bekannt. Das

endotheliale NOS (e-NOS, Typ III), das neuronale NOS (nc-NOS, Typ I) und das Zytokin induzierte NOS (iNOS, Typ II) (Nathan und Xie 1994). Die beiden konstitutiv exprimierten Isoformen, e-NOS und nc-NOS werden in ihrer Aktivität durch freie intrazelluläre Kalzium - Konzentrationen reguliert. Endotheliales NOS kontrolliert vor allem über NO die Vasodilatation und die Vasokonstriktion der Blutgefäße (Knowles and Moncada 1994). Neuronales NOS kommt in einer Reihe von neuronalen Zelltypen vor und wirkt im peripheren und zentralem Nervensystem als Neuromodulator oder retrograder Neurotransmitter (Huang 1993). Demgegenüber ist die induzierbare Isoform (iNOS) konstitutiv aktiv, da sie auch bei den niedrigen freien Kalziumkonzentrationen Calmodulin hochaffin bindet. Induziertes NOS, durch IL-1 oder TNF- α , kann über einen längeren Zeitraum NO in einer 1000fach höheren Konzentration freisetzen und hat dadurch einen anderen Wirkungseffekt als als eNOS oder nNOS. Man findet die induzierte Form vor allem in Entzündungszellen, Epithelien und in der glatten Muskulatur (Knowles and Moncada 1994).

Die Lokalisation der Gene für die drei humanen Isoformen ist bereits bekannt. Sie liegen für eNOS auf Chromosom 7, nNOS auf Chromosom 12 und iNOS auf Chromosom 17 (Geller et al. 1993). Alle Gene für die drei NOS Isoformen sind strukturell eng miteinander verwandt und evolutionär hoch konserviert. So weist die cDNA-Sequenz der drei NOS Isoformen von *Drosophila* eine 40%ige Homologie zu den Gensequenzen der Säugetiere auf (Regulski and Tully 1995). Eine hohe Übereinstimmung ergibt sich ebenfalls in der iNOS cDNA-Sequenz zwischen der Ratte und dem Menschen und beträgt ca. 80% (de Vera et al. 1996). Die Promoter Region des iNOS Gens der Ratte weist typische Elemente wie eine TATA Box und zahlreiche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie NFkappaB und NF-IL-6 auf (Niwa et al. 1997, Keinänen et al. 1999).

1.5.1 Signalübertragung durch die induzierte NO Synthase

Das durch die induzierte NO Synthase gebildete NO reagiert vor allem gerne an:

1. Nucleophilen Zentren (SH-Gruppen der Cysteinreste) von Peptiden und Proteinen
2. Metallionen

Durch die Nitrosylierung der SH-Gruppe durch NO, wie beim p21^{ras} Protein, kann eine Signalkaskade ins Zellinnere ausgelöst werden, die letztendlich zur Phosphorylierung und zur Aktivierung von regulatorischen Proteinen (Transkriptionsfaktoren) oder von Enzymen führt (Krauss 1997). Die intrazelluläre Signalübertragung durch NO über Ras Proteine wurde bereits für den MAPkinase (Mitogen aktivierte Protein Kinasen)-Weg beschrieben (Lander et al. 1995, Yun et al. 1998). Andererseits scheint NO in der Lage zu sein, Phosphorylierungsreaktionen über Modifikation an Cysteinresten von Phosphatasen zu regulieren. Dabei können Phosphatasen direkt aktiviert oder deaktiviert werden (Callsen et al. 1998, Kaur et al. 1998). Ebenso gibt es Hinweise dafür, dass durch die Nitrosylierung von Cystein-Resten im N-terminalen Bereich bei Transkriptionsfaktoren die DNA-Bindung, Dimerisierung und die nukleäre Translokation beeinflusst wird. Eine direkte Inhibierung der DNA-Bindung durch NO wurde in vitro für den Transkriptionsfaktor NFkappaB gezeigt (Matthews et al. 1996). Ebenso scheint der Transkriptionfaktor c-jun in vitro durch Nitrosylierungen direkt durch NO modifiziert zu werden (Tabucchi et al. 1994).

Eine physiologisch wichtige Reaktion ist die Reaktion des NO an Metallionen-Zentren von Enzymen. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden haben eine große Bedeutung für Proliferation und Differenzierungszustände. Man unterscheidet dabei zwischen Signalwegen, die cGMP abhängig und unabhängig ablaufen.

Bei cGMP abhängigen Signalwegen führt eine erhöhte NO Synthese zur Aktivierung der löslichen Guanylat-Cyclase, indem NO an dessen prosthetische Hämgruppe bindet (Gerzer et al. 1981). Die reversible Bindung von NO an die Guanylat-Cyclase bewirkt eine 200fache Steigerung der Aktivität und führt dazu, dass daraufhin der intrazelluläre Botenstoff cGMP gebildet wird, der pleiotrope Wirkungen entfaltet. So können verschiedene cGMP-abhängige Proteinkinasen, Phosphodiesterasen oder Ionenkanäle aktiviert oder inhibiert werden. Die durch NO aktivierten Guanylatcyclasen sind damit ein zentraler Bestandteil verschiedenste Signaltransduktionswege (Frey et al. 1998, Beck et al. 1999). NO kann aber auch physiologische Prozesse steuern, indem NO direkt an Enzyme bindet, die im aktiven Zentrum Metalle enthalten und diese dadurch direkt aktiviert oder deaktiviert werden. So kann NO an die induzierte Cyclooxygenase II binden, diese aktivieren und daraufhin die Prostaglandin (PGE₂)- und Prostacyclin (PGI₂)-Synthese in Geweben steuern (Salvemini et al. 1993, Wu 1995). Ebenso kann NO über die Bindung an Zn²⁺ die Aktivität unterschiedlichster Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9 u. a.) direkt steuern (Trachtmann et al. 1996).

1.5.2 Bedeutung von NO für die Reproduktion

NO ist bei allen wichtigen Prozessen der weiblichen Reproduktion wie dem Zyklus, der Menstruation, Ovulation, Implantation, der Erhaltung der Schwangerschaft sowie bei der Auslösung des Geburtsvorganges beteiligt. Neuere Untersuchungen bestätigen, daß NO ebenfalls bei der Entwicklung der Präimplantationsembryonen eine Rolle spielt (Barroso et al. 1998). So konnte neben eNOS auch iNOS in den Präimplantationsembryonen nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Präimplantationsembryonen konnte in vitro nach Gabe von NO-Inhibitoren ins Medium deutlich beeinträchtigt werden (Gouge et al. 1998). Während der Schwangerschaft ist NO außerdem für die uterine

Kontraktilität, Wehenauslösung und für den utero-fötalen-plazentaren Blutfluss mitverantwortlich (Izumi et al. 1993, Sladek et al. 1993, Buhimschi et al. 1996, Liao et al. 1997). Während der Implantations- und Postimplantationsphase im Uterus und in der Spätgravidität zur Zeit der Zervixreifung überwiegt eindeutig die induzierte Form der NO-Synthasen. Biochemische und Westernblot-Analysen an Mäusen und Ratten zeigten eindeutig, dass iNOS in der Dezidua während der Implantationsphase und in der Postimplantationsphase hochreguliert wird (Novaro et al. 1997, Purcell et al. 1999). E-NOS hingegen lässt sich in diesen frühen Phasen der Schwangerschaft in der Dezidua nur in geringem Maße und n-NOS überhaupt nicht nachweisen (Buhimschi et al. 1996). Neben der Dezidua sind die Plazenta und die Zervix bei der Ratte weitere Orte, an denen eine iNOS-Expression nachgewiesen werden konnte. Studien an Ratten und Meerschweinchen zeigten ein gegensätzliches Verhalten der iNOS Expression im Uterus und in der Zervix während der Schwangerschaft; eine Abnahme der iNOS Expression im Uterus und einen starken Anstieg der iNOS-Expression in der Zervix (Chwalisz et al. 1996, Ali et al. 1997).

Sexualsteroide greifen sowohl in die Expression der konstitutiven wie auch der induzierbaren NOS ein, wobei vor allem Progesteron als schwangerschaftserhaltendes Hormon die iNOS-Expression und dadurch die NO Freisetzung direkt oder indirekt steuert (Weiner et al. 1994, Buhimschi et al. 1996, Miller et al. 1996). Durch Antigestagenbehandlungen (Onapriston) bei graviden Ratten und Meerschweinchen konnte gezeigt werden, dass im Uterus und in der Zervix das NO-System durch Progesteron gesteuert wird (Izumi et al. 1993). Allerdings ist die Regulation der iNOS-Expression durch Progesteron gewebespezifisch. Inwieweit Progesteron für die Regulation der iNOS-Expression in den Präimplantationsembryonen verantwortlich ist, bleibt unklar. Für die Implantationphase, vor allem zwischen Tag 7 - 9 p.c., konnte eindeutig bei Mäusen gezeigt werden, dass die iNOS-Aktivität in der Dezidua mit steigendem Progesteronspiegel zunimmt und am Tag 9 p.c. einen Höhepunkt

erreicht (Purcell et al. 1998, 1999). Danach kommt es allerdings zu einem Abfall der iNOS-Aktivität in der Dezidua. Behandelt man Ratten in der Spätgravidität mit Onapriston, so kommt es im Uterus zu einem Abfall und in der Zervix zu einen Anstieg der iNOS-Expression. Die erhöhte iNOS-Expression (niedriger Progesteronspiegel) am Ende der Gravidität induziert schließlich die Zervixreifung und leitet die Geburt ein (Chwalisz et al. 1996).

1.5.3 Inhibitoren der NO Biosynthese

In den letzten Jahren wurden eine Anzahl von NO-Inhibitoren entwickelt, um die vielfältigen Funktionen des NO und insbesondere der drei Isoformen (eNOS, nNOS, iNOS) in vivo besser untersuchen zu können. Die ersten Inhibitoren waren relativ einfache Substratanaloga zu L-Arginin, wie das N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) und das L-Canavine (Hibbs et al. 1987, Sakuma et al. 1988, Mc Call et al. 1989). Die Blockierung der enzymatischen NOS-Aktivität erfolgt durch eine kompetitive Hemmung. Zwar blockierten die ersten L-Arginin Derivate die Aktivität aller NO Isoformen, hatten allerdings den Nachteil, nicht sehr selektiv die Aktivität der NO Synthasen zu beeinflussen. Auch das bekannte Substratanaloga N-Nitro-L-Arginin-Methylester (L NAME) wirkte zwar sehr potent auf die Aktivität der konstitutiven NOS Isoformen (eNOS, nNOS), aber nur sehr schwach auf die iNOS Aktivität (Furfine et al. 1993, Boughthon-Smith and Tinker 1998). Die ersten selektiveren iNOS Inhibitoren wurden durch das Einfügen einer Guanidin-Gruppierung synthetisiert. So waren die ersten selektiveren iNOS Inhibitoren das N-(2-Mercapto(ethyl)guanidin (MEG) und vor allem das Aminoguanidin (Pimagedine) (Southan et al. 1995). Aminoguanidin hat nur einen marginalen Effekt auf die konstitutiven Isoformen, wirkt aber in vivo sehr selektiv, obwohl schwach auf die induzierte NO Synthase (Corbett et al. 1995, Wolff et al. 1995). Ein weiterer sehr effektiver iNOS Inhibitor ist das Guanidin Derivat, N-(Iminoethyl)-L-lysin (L-NIL) (Moore et al. 1994).

1.6 Eingesetzte Marker für die zellbiologische Wirkung von Progesteron und Stickstoffmonoxid (NO) während der Embryo-Implantation

1.6.1 PCNA („Proliferating cell nuclear antigen“)

PCNA ist ein 36 kDa Molekül, welches während der Evolution (Vertebraten, Insekten, Pilzen) hoch konserviert wurde und wird als Prozessivitätsfaktor für die DNA-Polymerase δ und für die Replikation der DNA in der S-Phase benötigt (Lee and Hurwitz 1990; Waseem and Lane 1990). Zellen, die sich außerhalb des Zellzyklus befinden, zeigen nur eine geringe Expression des PCNA. Treten Zellen in den Zellzyklus ein, wird das PCNA sofort hochreguliert. Die PCNA Expression kann in vivo als auch in vitro durch Wachstumsfaktoren induziert werden (Hall et al. 1990).

1.6.2 Desmin

Desmin gehört zu einer der fünf Hauptgruppen von Intermediärfilamenten (10 nm \varnothing) und ist neben den Aktinfilamenten und Mikrotubuli Bestandteil des Cytoskeletts. Besonders gut ausgebildet sind die Intermediärfilamente im Cytoplasma von Zellen, die einer mechanischen Belastung ausgesetzt sind (glatte Muskulatur). Während der Implantationsreaktion bei der Ratte ist Desmin ein wichtiger Marker für die Differenzierung der zyklischen endometrialen Fibroblasten in Deziduazellen (Glasser et al. 1987).

1.6.3 COX II (Cyclooxygenase II)

COX II ist ein ca. 74 kDa Metalloprotein, welches bei inflammatorischen Prozessen in zahlreichen Zellen, inklusive Fibroblasten und Makrophagen, induziert wird. Die Induktion von COX II durch proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α) metabolisiert die Arachidonsäure (AS) zur Prostaglandin (PG)- oder zur Prostazyklinsynthese (PGI), die unter anderem für die vasoaktiven Funktionen im Uterus mitverantwortlich sind (Seibert and Maferrier 1994). Da COX II von denselben Zytokinen wie iNOS induziert wird, findet man diese beiden induzierten Formen oft in Geweben exprimiert, die einem Entzündungsprozess gleichen (Wu 1995). Es ist bekannt, dass COX II eine wichtige Rolle während der Implantations- und Dezidualreaktion übernimmt. COX II, aber nicht COX I-knockout-Mäuse zeigen eine Störung im Implantations und Dezidualisierungsprozess (Lim et al 1997).

1.6.4 CD 90 (Thy-1)

Thy-1 ist ein 25-kD Zelloberflächen-Glykoprotein und ist in Wachstums- und Differenzierungsprozesse von unterschiedlichen Zelltypen involviert. Die Expression von Thy-1 konnte auf Endothelzellen, die mit inflammatorischen Prozessen einhergehen, beobachtet werden. Seitdem dient Thy-1 bei der Ratte als Marker für unterschiedliche Angiogenese Modelle (Risau 1998). Besonders in der frühen Schwangerschaft bei adulten Ratten wurde auf uterinen Endothelzellen eine hohe Expression von Thy-1 beobachtet. Thy-1 hingegen wird nicht auf Endothelzellen exprimiert, die mit der embryonalen Angiogenese zusammenhängen und ist daher gut von der uterinen Angiogenese in der frühen Schwangerschaft abzugrenzen (Lee et al. 1998). Für die Regulation der Thy-1-Expression auf Endothelzellen bei inflammatorischen Prozessen scheinen insbesondere Interleukine (IL-1, IL-8) und der Tumornekrosefaktor α eine wichtige Rolle zu spielen (Ishizu et al. 1997).

1.6.5 NFkappaB (p65 Untereinheit)

Der Transkriptionsfaktor NFkappaB reguliert eine Vielzahl von Genen, die an der Immunantwort und an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Die aktive Form von NFkappaB ist ein Heterodimer, bestehend aus einer p50- und einer p65-Untereinheit. Im Cytosol liegt NFkappaB in Form eines inaktiven Komplexes mit dem gebundenen Inhibitorprotein IkappaB vor. IkappaB maskiert das nucleäre Translokationssignal des Heterodimers und verhindert so die Translokation in den Kern. Durch ein extrazelluläres Signal wird IkappaB phosphoryliert und NFkappaB in den Kern transportiert, um seine regulatorischen Aufgaben wahrzunehmen (Abb.4) (Krauss 1997).

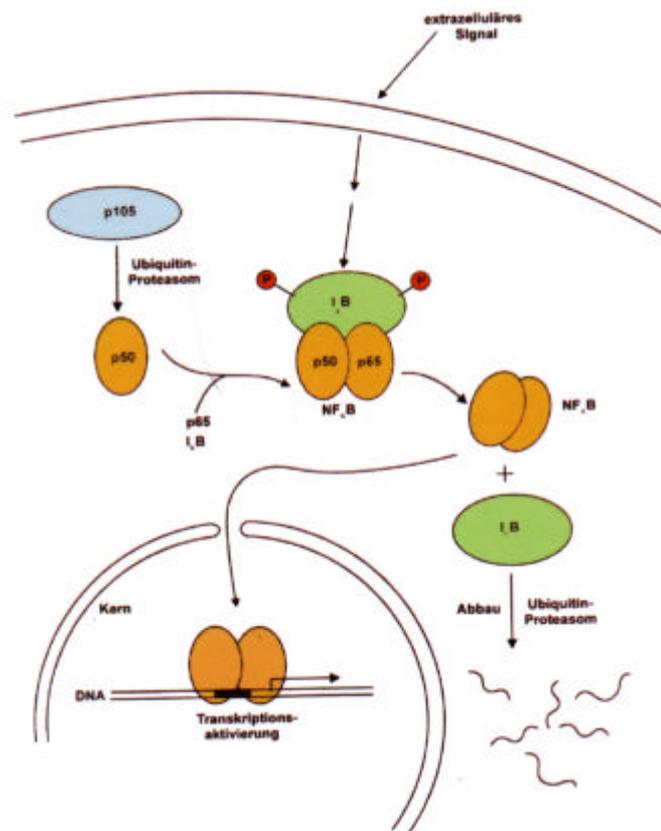


Abb. 4

Regulation und Proteolyse des Transkriptionsfaktors NFkappaB (verändert nach Krauss 1997).

1.6.6 Aktiviertes Diphosphoryliertes ERK1&2

Die durch proinflammatorische Signale (NO, IL-1, TNF- α) aktivierte MAPkinase ERK1&2 steht am unteren Ende des MAPkinaseweges im Cytoplasma (Lander et al.1996). Durch vorgeschaltete Proteinkinasen wird ERK1&2 letztendlich durch Phosphorylierung an Threonin (183)- und Tyrosin (185)-Seitenketten aktiviert. Durch diese Aktivierung ist ERK1&2 in der Lage, sein Phosphorylierungspotential an unterschiedliche regulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktoren (NFkappaB, NF IL-6, c-jun, Elk-1) in den Kern, aber auch an Zytoskelettproteine im Cytoplasma weiterzugeben (Seeger and Krebs 1995, Su and Karin 1996) (Abb. 5). Der MAPkinase Weg stellt daher eine wichtige Signalkaskade für die Übermittlung von Proliferations und Differenzierungssignalen dar.

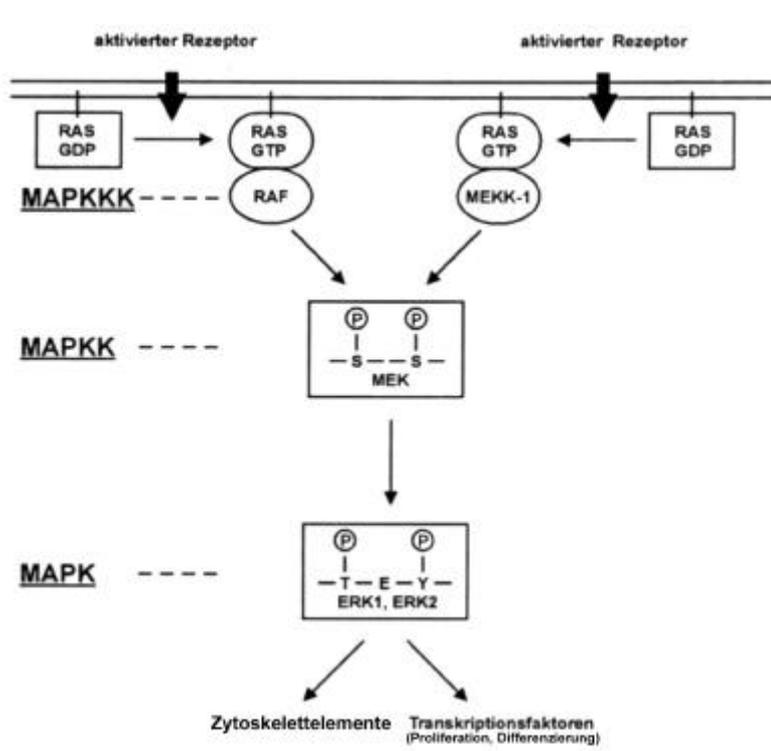


Abb.5

Komponenten des MAPkinase-Signalweges und Aktivierung von ERK1&2. (verändert nach Krauss 1997).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die erfolgreiche Implantation der Blastocyste am Tag 5,5 p.c. nach erfolgreicher Fertilisation bei der Ratte ist abhängig von der richtigen Differenzierung des Endometriums. Während der Prä-, Peri- und Postimplantationsphase kommt es zu einer Vielzahl von morphologischen und biochemischen Veränderungen im endometrialen Stroma in Abhängigkeit von ovariellen Steroidhormonen. Progesteron als das schwangerschaftserhaltende Hormon kontrolliert mit Östrogen diese zellbiologischen Veränderungen während dieser Phasen, aber auch embryonale Signale beeinflussen die Zellbiologie des Endometriums. Unter vielen anderen Faktoren induziert der erhöhte Progesteronspiegel während und nach der Embryo-Implantation eine erhöhte Expression von induzierter Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) im Endometrium und führt damit zu einer Erhöhung des Stickstoffmonoxid(NO)-Spiegels. Welche Bedeutung iNOS/NO in den unterschiedlichen frühen Graviditätsphasen zukommt, ist bis heute größtenteils ungeklärt.

Das wesentliche Ziel der Arbeit bestand darin, die Wirkung von Progesteron und NO auf die Implantationsrate und Geburtenrate zu evaluieren. Mögliche zellbiologische Veränderungen am Endometrium sollten anhand von Proliferations- und Differenzierungsmarkern untersucht werden. Darüberhinaus sollte die Frage beantwortet werden, welche gemeinsamen Signalwege von Progesteron und NO besprochen werden, die zu einem synergistischen Effekt für die Differenzierung der Dezidua während der Implantation führen.

Die morphologischen Daten und zellbiologischen Untersuchungen sollten letztendlich zu der Aussage führen, ob die Hemmung der NO-Synthese in Kombination mit einer geringen Dosis („ultra low dose“) eines potenten Antigestagens grundsätzlich geeignet sind, als alternatives Kontrazeptivum eingesetzt zu werden.

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimente und Auswertungen

Alle Tierexperimente wurden von mir in den Forschungslaboratorien der Abteilung Fertilitätskontrolle und Hormontherapie bei der Schering AG, Berlin durchgeführt und bei der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin vorschriftsmäßig angezeigt. Die zellbiologischen Auswertungen erfolgten am Institut für Anatomie in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Winterhager.

3.2 Versuchstiere

Für die in vivo Untersuchungen zum Synergismus von Progesteron und NO wurden zyklische gravide Wistar-Ratten (Schering Tierzucht und -haltung) mit einem Körpergewicht von 190 - 220 g eingesetzt. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen in kontrolliert belichteten Räumen (10 Stunden Dunkelheit, 14 Stunden Helligkeit) gehalten und mit einer Standarddiät (pelletiertes ACTROMIN-R[®]) ad libitum (a. d.) ernährt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 2-3 Zyklen lang anhand von Vaginalabstrichen beobachtet und nur Tiere mit regelmäßigen 4-Tage-Zyklen wurden in die Versuche aufgenommen. Die Zuordnung zu den Behandlungsgruppen erfolgte randomisiert. Bei regelmäßigem Zyklus wurden die Tiere im Proöstrus zur Anpaarung zum Bock gesetzt. Die Paarung erfolgt normalerweise um Mitternacht (ca. 24.00 Uhr) und wurde durch einen Spermiennachweis am nachfolgenden Tag um ca. 8.00 Uhr im Vaginalabstrich gesichert. Nur weibliche Tiere mit einem positiven Spermiennachweis wurden für die nachfolgenden Versuche eingesetzt. Ein positiver Spermiennachweis wurde als Tag 1 der Gravidität (Tag 1 p.c.) definiert. Die Tiere wurden vor allen Autopsien mit CO₂ getötet.

3.3 Applizierte Substanzen

Der spezifische Progesteronantagonist Onapriston (ZK 98 299; 11 β -[4-(Dimethylamino) phenyl]-17 α -hydroxy-17 β -(3-hydroxypropyl)-13 α -estra-4,9-dien-3-on) wurde in 0,2 ml Benzylbenzoat und Rizinusöl im Verhältnis 1+4 (vol/vol) gelöst und subkutan (s.c.) appliziert. Bei allen Versuchen wurde Onapriston in einer sehr niedrigen Dosierung („ultra low dose“) von 0,3 mg/Ratte/Tag verabreicht, die in Vorversuchen keine oder nur marginale Effekte auf die Implantationrate zeigte. Das Antigestagen Onapriston ist ein synthetisierter Wirkstoff der Schering AG, Berlin.

Der spezifische kompetitive iNOS Inhibitor Aminoguanidin (Firma Sigma Aldrich) wurde im Wasserbad (40 °C) unter Zugabe von 4N HCL gelöst, mit 1N NaOH auf ph 6 titriert und mit Leitungswasser aufgefüllt. Die Applikation von 120mg/Ratte/Tag erfolgt oral (p.o.). Die Dosierung wurde nach Vorversuchen bei der Schering AG als die maximale pharmakologische Höchstdosis festgelegt, bei der weibliche adulte Ratten auch bei einer täglichen Applikation über 4 Wochen keinen erhöhten diastolischen und systolischen Wert zeigen (Schering, nicht publizierte Daten).

3.4 Antikörper

3.4.1 Primär-und Sekundärantikörper

Alle nachfolgend aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper wurden käuflich erworben und für die nachfolgenden zellbiologischen Untersuchungen an Rattengewebe eingesetzt. Die Verdünnungen, falls vom Hersteller nicht ausdrücklich angegeben, wurden größtenteils selbst anhand von Verdünnungsreihen (Schachbrett-Titration) ausgetestet (Tabelle 1+2).

Tab. 1: Eingesetzte Primärantikörper

Primär-antikörper	Wirt	Antigenspezifität	Verdünnung	Firma
PCNA	monoklonal Maus (Klon PC 10)	Unspezifisch gegen alle Wirbeltierklassen	1:100	DAKO (Produkt Nr. M 0879)
Desmin	polyklonal Kaninchen	gegen Huhn, Maus, Ratte, Mensch, Rind	1:20	Sigma (Produkt Nr. D-8281)
CD 90 (Thy-1)	monoklonal Maus (Klon OX-7)	gegen Ratte	1:100	Pharmingen
COX II	polyklonal Ziege	gegen Maus, Ratte	1:200	Santa Cruz (Produkt Nr. sc-1747)
NFkappaB	polyklonal Kaninchen	gegen Maus, Ratte, Mensch	1:50	Santa Cruz (Produkt Nr. sc-372)
ERK1&2	monoklonal Maus	gegen Maus, Ratte Rind, Mensch	1:50	Sigma (Produkt Nr.M8159)
iNOS	polyklonal Kaninchen	gegen Maus, Ratte, Mensch	1:50	Santa Cruz (Produkt Nr.sc-651)

Tab. 2: Eingesetzte Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	konjugiert mit ...	Verdünnung	Firma
Schwein anti-Kaninchen IgG	Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)	1:40	DAKO (Produkt Nr. F205)
Schwein anti-Ziege IgG	Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)	1:40	DAKO (Produkt Nr. F205)
Esel anti-Maus IgG	Cy 3	1:200	Dianova (Produkt Nr. 715-165-151)
Brückenantikörper anti-maus/Kaninchen IgG	biotinyliert	nicht notwendig	DAKO (Produkt Nr. K 609)

3.5 In vivo Experimente zum Synergismus von Aminoguanidin (iNOS Inhibitor) und Onapriston („ultra low dose“) in der Frühgravidität zu verschiedenen Implantationsphasen

Um zu klären, ob ein Synergismus zwischen Progesteron und Stickstoffmonoxid (NO) während der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.), Implantationsphase (d5 - d8 p.c.) und Postimplantationsphase (d6 - d9 p.c.)/(d7 - d10 p.c.) existiert, wurden gravide Ratten sowohl mit Antigestagen Onapriston in der „ultra low dose“ (0,3mg/Ratte/Tag) und mit Aminoguanidin (120mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosis als auch in der Kombination beider Wirkstoffe behandelt. Als Kontrolle dienten gravide Ratten, die mit dem Vehikel für Onapriston (Benzylbenzoat/Rizinusöl) und mit dem Vehikel für Aminoguanidin (H₂O) behandelt wurden.

3.5.1 Experimente in der Präimplantationsphase

Experiment 1: Gravide Wistar Ratten (n = 6) wurden über 4 Tage (d1 - d4 p.c.) in der Einzeldosis mit Onapriston (0,3 mg/Tag/ Tier) und Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier), sowie in der Kombination mit Onapriston (0,3 mg/Tag/Tier) und Aminoguanidin (120 mg/Tag/Tier) um jeweils 8.00 Uhr behandelt. Um eine Aussage über die Anzahl der Implantationrate und/oder über Resorptionen zu erhalten, wurden die behandelten Ratten am Tag 9 p.c.um 10.00 Uhr autopsiert. Dazu wurde die Bauchhöhle der Tiere geöffnet und die Uteri herauspräpariert. Um die Anzahl der Implantationsrate/Resorptionsstellen beurteilen zu können, wurden die Uteri mit einer 10%igen Ammoniumsulfidlösung angefärbt, fotografiert und die Uterusgewichte notiert.

Experiment 2: Graviden Ratten (n = 8) wurden aufgrund der Ergebnisse aus dem Experiment 1 über 4 Tage (d1 - d4 p.c.) die Substanzen Onapriston (0,3 mg/Tag/ Tier) und Aminoguanidin (120 mg/Tag/Tier) in der Kombination

appliziert. Um eine Aussage über die Implantationsfähigkeit bzw. Implantationsrate nach Applikation der Substanzen in der Frögravidität zu erhalten, wurde den Tieren am Tag 6 p.c. um ca. 10.00 Uhr eine 1%ige Pontamin blue Lösung in die Schwanzvene injiziert. Nach einer Einwirkzeit von ca. 10 min. wurden die Ratten autopsiert. Nach Psychoyos (1961) ist die Pontamin blue-Färbung geeignet, eine erhöhte Gefäßpermeabilität der Kapillaren im Bereich der Implantationstelle anzuzeigen. Die Uteri wurden zur Beurteilung der Implantationsstellen fotografiert und nachfolgend die Uterusgewichte notiert.

Experiment 3: Um eine Aussage über einen möglichen Effekt der Wirksubstanzen auf die Embryonen zu tätigen, wurden gravide Wistar Ratten zu folgenden Tagen mit Onapriston (0,3 mg/Tag/Tier) in Kombination mit Aminoguanidin (120 mg/Tag/Tier) behandelt und am darauffolgenden Tag um 10.00 Uhr autopsiert:

Behandlung d1 p.c.	Autopsie d2 p.c. (n = 6)
Behandlung d1 + d2 p.c.	Autopsie d3 p.c. (n = 6)
Behandlung d1 + d2 + d3 p.c.	Autopsie d4 p.c. (n = 8)
Behandlung d1+ d2+ d3+ d4 p.c.	Autopsie d5 p.c. (n = 8)

Bei allen autopsierten graviden Ratten wurde eine mehrmalige Tuben-, und/oder Uterusspülung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) unter dem Binokular durchgeführt, um eine Aussage über die Anzahl und über das morphologische Erscheinungsbild der Embryonen treffen zu können. Dazu wurden die Embryonen in Petrischalen aufgefangen, danach fixiert und mit einem Axiophot Photomikroskop (Zeiss Oberkochen, Germany) ausgewertet und fotografiert.

3.5.2 Experimente in der Peri- und in der Postimplantationsphase

Experiment 4 (d5 - d8 p.c.): Gravide Wistar Ratten (n = 7) wurden über 4 Tage (d5 - d8 p.c.) in der Einzeldosis mit Onapriston (0,3mg/Tag/Tier) und Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier). als auch in der Kombination mit Onapriston (0,3mg/Tag/Tier) und Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier) um jeweils 8.00 Uhr behandelt. Um eine Aussage über die Anzahl der Implantationrate und/oder über Resorptionen zu erhalten, wurden die behandelten Ratten am **Tag 9 p.c.** autopsiert. Anschließend wurden die Uteri angefärbt, fixiert, fotografiert und die Anzahl der Implantationsstellen/rate und die Uterusgewichte notiert.

Experiment 5 (d7 - d10 p.c.): Gravide Wistar Ratten (n = 8) wurden über 4 Tage (d7 - d10 p.c.) entsprechend Experiment 4 behandelt. Um eine Aussage über die Anzahl der Implantationsrate und/oder über Resorptionen am zu erhalten, wurden die behandelten Ratten am **Tag 11 p.c.** autopsiert. Anschließend wurden die Uteri angefärbt, fixiert, fotorafiert und die Anzahl der Implantationsstellen/rate und die Uterusgewichte notiert.

3.5.3 Experimente zu den Austragungsversuchen in der Peri- und in der Postimplantationsphase

In den ersten Austragungsversuchen (**Experimente 6 - 8**) wurden die Auswirkungen von Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier) und Onapriston (0,3 mg/Tier/Tag) in der Kombination auf die Anzahl der Nachkommen (Föten) untersucht. Dazu wurden den graviden Ratten in der Implantationsphase (d5 - d8 p.c.) und zu verschiedenen Tagen in der Postimplantationsphase (d6 - d9 p.c. / d7 - d10 p.c.) die Wirksubstanzen appliziert und die Tiere am 19 Graviditätstag autopsiert. Nachfolgend wurden erneut Austragungsversuche (**Experimente 9 -**

13) mit unterschiedlichen Behandlungstagen in der frühen Postimplantationsphase zwischen d7 - d9 p.c. durchgeführt, um eine Aussage über die Anzahl der Nachkommen zu bekommen. Vorhandene Föten wurden herauspräpariert und die Anzahl protokolliert.

Experiment 6: Gravide Ratten (n = 6) wurden über 4 Tage (d5 – d8p.c.) behandelt.

Experiment 7: Gravide Ratten (n = 6) wurden über 4 Tage (d6 - d9p.c.) behandelt.

Experiment 8: Gravide Ratten (n = 6) wurden 4 Tage (d7 - d10 p.c.) behandelt.

Experiment 9: Gravide Ratten (n = 4) wurden für ein Tag (d8 p.c.) behandelt.

Experiment 10: Gravide Ratten (n = 4) wurden für ein Tag (d9 p.c.) behandelt.

Experiment 11: Gravide Ratten (n = 6) wurden 2 Tage (d7 + d8 p.c.) behandelt.

Experiment 12: Gravide Ratten (n = 6) wurden 2 Tage (d8 + d9 p.c.) behandelt.

Experiment 13: Gravide Ratten (n = 6) wurden 3 Tage (d7 - d9 p.c.) behandelt.

3.5.4 Experimente zur Zeitreihe in der Postimplantationsphase

Aufgrund der Ergebnisse der Austragungsraten (Experimente 6 - 13) war es notwendig, die Graviditätstage d7 - d9 p.c. nach der Behandlung mit Onapriston (0,3mg/Tag/Tier) in Kombination mit Aminoguanidin (120 mg/Tag/Tier) genauer zu untersuchen. Um die zellbiologischen Veränderungen, die durch die

Kombination beider Wirksubstanzen entstehen, untersuchen zu können, wurden folgende Experimente durchgeführt:

Experiment 14: Gravide Ratten (n = 4) wurden von d7 - d9 p.c. in der Kombination behandelt. Die letzte Behandlung erfolgte am Tag d9 p.c. um 8.00 Uhr. Die erste Autopsie wurde um 10.00 Uhr (2 Stunden nach der letzten Behandlung) durchgeführt. Die Uteri wurden fotografiert, gewogen und für spätere histologische und immunhistochemische Untersuchungen unterschiedlich fixiert.

Experiment 15: Gravide Ratten (n = 4) wurden von d7 - d9 p.c. in der Kombination behandelt. Die letzte Behandlung erfolgte ebenfalls am Tag d9 p.c. um 8.00 Uhr. Die zweite Autopsie wurde um 14.00 Uhr (6 Stunden nach der letzten Behandlung) durchgeführt.

Experiment 16: Gravide Ratten (n = 4) wurden von d7 - d9 p.c. in der Kombination behandelt. Die letzte Behandlung erfolgte am Tag d9 p.c. um 8.00 Uhr. Die dritte Autopsie wurde um 18.00 Uhr (10 Stunden nach der letzten Behandlung) durchgeführt.

3.6 Fixierung des biologischen Untersuchungsmaterials

3.6.1 Präimplantationsembryonen

Für die morphologischen Untersuchungen der unterschiedlichen Teilungsstadien und der Blastocysten während der Präimplantationsphase wurden diese unmittelbar nach der Autopsie und dem Spülen mit PBS eine Stunde in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na- Cacodylatpuffer, ph 7,4, fixiert, nachfolgend in PBS gewaschen und unter dem Axiophot Photomikroskop ausgewertet.

3.6.2 Implantationsstellen

Für alle nachfolgenden lichtmikroskopischen und zellbiologischen Untersuchungen wurden die herauspräparierten Implantationsstellen entweder über Nacht in 3,5% gepuffertem Formalin oder aber in Trockeneis bzw. flüssigem Stickstoff kryofixiert.

3.7 Histologie

Zunächst wurde das Gewebe in 3,5%igem Formalin fixiert und über eine aufsteigende Alkoholreihe 4 Tage lang entwässert. Danach erfolgte die Einbettung des Gewebes in Paraffin. Alle nachfolgenden Serienquerschnitte durch die Implantationskammer wurden am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 2-4 μm durchgeführt. Zuvor wurden die Paraffinblöckchen für ca. 10 – 15 min. in Eiswasser gelegt um eine optimale Schnittdicke zu gewährleisten. Alle Serienquerschnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern überführt und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

3.7.1 Färbetechniken

Um eine histologische Diagnose der Schnittpräparate zu ermöglichen, wurden diese unterschiedlich angefärbt und unter dem Axiophot ausgewertet. Dazu wurden zwei Färbetechniken angewandt:

1. Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung
2. Die Azanfärbung

Beides sind Routinefärbungen der Histologie und werden hier nur kurz erwähnt. Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Paraffinschnitte in HistoClear entparaffiniert, anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (96 - 40%)

hydriert und mit einer Hämatoxylin-Lösung nach Shandon gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 - 96%) dehydriert mit Histomount eingedeckt, getrocknet und unter dem Axiophot ausgewertet.

Bei der Azanfärbung nach Haidenhein handelt es sich um eine Trichromfärbung. Bei den dafür verantwortlichen Farblösungen handelt es sich um Azokarmin, Orange G und Anilinblau. Zunächst wurden die Paraffinschnitte, wie bei der Hämatoxylin-Eosin Färbung entparaffiniert und in Alkoholreihe überführt. Zur Vorbereitung auf die Azanfärbung wurden die Präparate in Anilinalkohol gelegt. Nach der erfolgreichen Anfärbung wurde mit Aqua dest. gespült und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe die Schnitte dehydriert, getrocknet, mit Histomount eingedeckt und unter dem Axiophot ausgewertet.

3.8 Immunhistochemische Untersuchungen (ICH)

Für die immunhistochemischen/zellbiologischen Untersuchungen an den histologischen Präparaten wurden in Abhängigkeit des/der nachzuweisenden Antigens(e) drei unterschiedliche Techniken angewandt:

- 1. Paraffinschnitte mit der LSAB Methode („Labeled StreptAvidin-Biotin Staining“)**
- 2. Paraffinschnitte mit der TUNEL Methode („TdT-mediated UTP nick end labeling“)**
- 3. Kryostatschnitte mit Einfach- und Doppelfluoreszenzmarkierungen**

3.8.1 LSAB (Labeled StreptAvidin-Biotin Staining)

Die LSAB-Methode beruht auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins StreptAvidin, das Vitamin Biotin physikalisch zu binden. Das Verfahren gehört zur indirekten 3-Schritt-Methode, bei der 3 Reagenzien gebraucht werden. Das erste ist ein Primärantikörper, spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Der Sekundärkörper (Brückenantikörper), der sich an den ersten Primärantikörper binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter StreptAvidin-Komplex. Die freien Bindungsstellen des StreptAvidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase – und damit das gesuchte Antigen – wird mit einem geeigneten Chromogen (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) sichtbar gemacht. DAB ruft eine braune Farbe hervor, die in Alkohol unlöslich ist. Die Schnitte können anschließend dehydriert und mit Eukitt eingedeckt werden. Die LSAB-Methode ist eine sehr sensitive Methode, die insbesondere für die Paraffintechnik entwickelt wurde. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist allerdings die Paraffingängigkeit des Primärantikörpers. Besonders interessant ist diese Methode für kernständige oder/und cytoplasmatische Antigene.

Zunächst wurden an einem Mikrotom (Reichert-Jung) Paraffin-Serienquerschnitte (2 – 4 μm) hergestellt und diese auf Superfrost-Objektträger oder auf Poly-l-Lysin behandelten Deckgläschen (\varnothing 15 mm) aufgezogen und getrocknet. Die Paraffinschnitte wurden für die Immunhistochemie entparaffiniert und hydriert. Eine Demaskierung der Antigene erfolgte mit ProteinaseK und/oder Mikrowellenbehandlung. Danach erfolgte eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit einer 3%igen H_2O_2 . Nach sorgfältigem Spülen wurde die Schnitte mit dem Primärantikörper, danach mit dem biotinylierten Brückenantikörper und zuletzt mit StreptAvidin konjugiert mit der Meerrettichperoxidase inkubiert. Die Antigene wurden durch DAB

(Diaminobenzidin) sichtbar gemacht, anschließend dehydriert mit Histomount eingedeckt über Nacht bei 37 °C getrocknet und am nächsten Tag am Axiophot ausgewertet.

3.8.2 TUNEL Methode („Terminal desoxyribosyl Transferase-mediated UTP nick end labeling“)

Die DNA-Fragmentierung wird als das biochemische Schlüsselereignis der Apoptose (Zelltod) angesehen. Zur histologischen Diagnose der Apoptose an Paraffinschnitten erfolgt eine enzymatische in situ Markierung der DNA-Strangbrüche. Dazu werden Paraffinschnitte wie bei der LSAB Methode entparaffiniert, hydriert mit Proteinase K und mit einer 3%igen H₂O₂ behandelt. Danach wurden die Terminale desoxyribosyl Transferase (TdT) mit einer Tris Pufferlösung im Verhältnis 1:5 verdünnt und die Fluorescein-markierten Nucleotidderivate zugegeben. Die Inkubation der Schnitte erfolgt für 60 min bei 37 °C. Danach erfolgt die Inkubation des anti-Fluorescein Antikörpers konjugiert mit der Meerrettich-peroxidase. Anschließend wurde zur Farbreaktion DAB hinzugefügt und die Schnitte mit PBS und H₂O gewaschen, dehydriert und mit Histomount eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit dem Axiophot entweder im Durchlichtverfahren oder mit der Auflichtfluoreszenzeinrichtung.

3.8.3 Einfach- und Doppelmarkierungen mit der Fluoreszenztechnik

Zur räumlichen und zeitlichen Lokalisation von Antigenen wurde neben der Immunperoxidase-methode (LSAB), die Fluoreszenztechnik angewandt. Für die Einzel- und/oder Doppelmarkierungen wurden folgende Primärantikörper verwendet: CD 90 (Thy-1), COX II, iNOS und aktiviertes ERK1&2. Bei der Fluoreszenztechnik handelt sich um eine indirekte Immunhistochemie, bei der die Gewebeproben zuvor in flüssigem Stickstoff oder in Trockeneis eingefroren wurden.

Von den Gewebeproben wurden an einem Gefriermikrotom 6 μm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Die Gefrierschnitte wurden kurz auf den Deckgläschen angetrocknet und danach für 5 min in eiskaltem 96%igem Ethanol fixiert. Für den iNOS Primärantikörper wurde für die Fixierung statt 96%igem Ethanol eine 3,5 % gepufferte Formalinlösung verwendet. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 0,5%igem Rinderserumalbumin in PBS abgesättigt und der Primärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/BSA wurde der FITC und/oder der Cy-3 konjugierte Sekundärantikörper aufgetragen und wieder bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Für die Doppelmarkierungen an einem Schnitt erfolgte nach der Inkubation mit dem FITC konjugierten Sekundärantikörper ein 10minütiger Waschvorgang, um dann am selben eine zweite Inkubation von 45 min mit dem Cy-3 konjugierten Sekundärantikörper durchzuführen. Die Gefrierschnitte wurden danach mit H_2O gewaschen und mit 0,1 %igem p-Phenyldiamin eingedeckt. Zur Auswertung von Einfach- und Doppelfluoreszenzmarkierungen wurde ein Axiophot mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung benutzt. Die FITC-Auswertung erfolgte mit blauer Anregung bei 450 - 490 nm, wohingegen die Cy-3-Auswertung bei 530 - 585 nm stattfand.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Aminoguanidin (iNOS Inhibitor) und Onapriston („ultra low dose“) in verschiedenen Phasen der Frühgravidität

4.1.1 Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston in der Präimplantationsphase

Allen Ratten, denen in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) der iNOS Inhibitor Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung appliziert wurde, zeigen keinen hemmenden Effekt auf die Implantationsrate am Tag 9 p.c. Onapriston in der „ultra low dose“ (0,3mg/Ratte/Tag) appliziert, erniedrigt im Vergleich zu der Gesamtanzahl der Implantationsstellen der Kontrolltiere, die Implantationsrate am Tag 9 p.c. um ca. 50 % (Abb.6, Tab.3). Bei keinem Tier wurde allerdings nach der Applikation von Onapriston eine vollständige Hemmung der Gravidität beobachtet (Abb.6, Abb.7, Tab.3). Die Applikation von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) in der Kombination mit Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) von d1 - d4 p.c. hingegen führt zu einer vollständigen Reduktion der Gravidität am Tag 9 p.c. Bei allen Ratten, die in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston behandelt wurden, sind die Uteri am Tag 9 p.c. ohne Implantationsstellen (Abb.6, Abb.7).

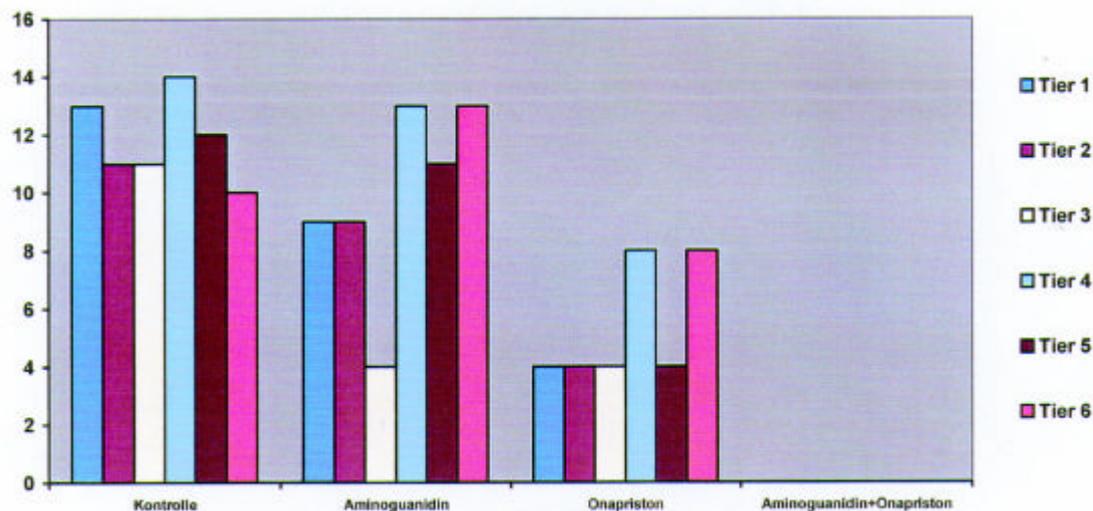


Abb. 6

Anzahl der Implantationsstellen am Tag 9 p.c. nach Applikation der Substanzen in der Einzeldosierung und in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.).

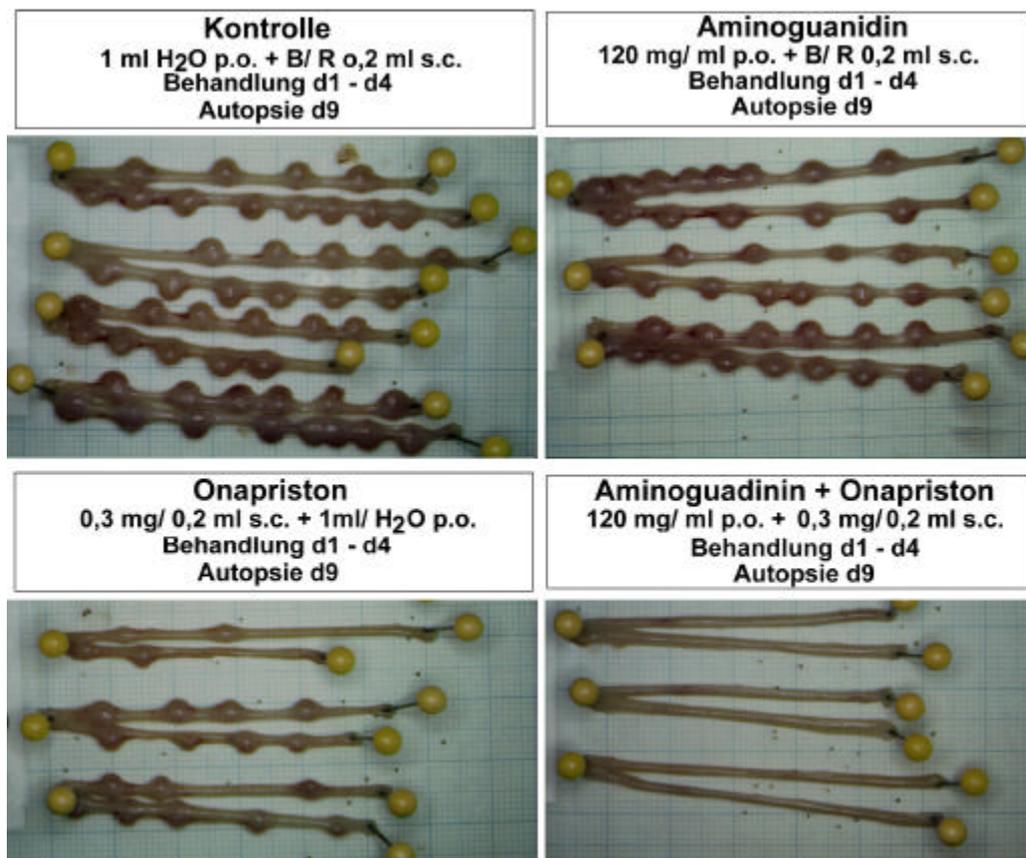


Abb. 7

Uteri mit Implantationsstellen nach Applikation von Aminoguanidin, Onapriston in der Einzeldosierung als auch in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) und Autopsie am Tag 9 p.c.

4.1.2 Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die frühe Implantation

Es stellte sich die Frage, ob überhaupt eine Implantation der Blastocysten stattgefunden hat. Deshalb wurden die Uteri auf frühe Implantationsstellen (erweiterte Gefäße) untersucht.

Die Kontrolltiere zeigen am Tag 6 p.c. eine bläuliche Anfärbung im Bereich der Implantationsstellen durch die „Pontamin blue“-Reaktion, die auf eine Gefäßerweiterung aufgrund der Implantation der Blastocyste hindeutet (Abb. 8a). Bei den graviden Ratten hingegen, die über 4 Tage in der Postimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) mit der Kombination Aminoguanidin und Onapriston behandelt wurden, zeigt die „Pontamin blue“-Färbung nur vereinzelt eine geringe Gefäßerweiterung im Bereich der Implantationsstellen (Abb. 8b). Die ebenfalls mit der „Pontamin blue“-Reaktion auftretenden knötchenartigen Verdickungen, die in der Frühgravidität aufgrund des beginnenden Dezidualisierungsprozesses zu sehen sind, wurden nicht ausgebildet (Abb. 8b).

Dieser Befund weist auf eine Störung der Implantation der Blastocyste am Tag 6 p.c. hin, die durch die Applikation von Aminoguanidin und Onapriston in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) verursacht wurde.

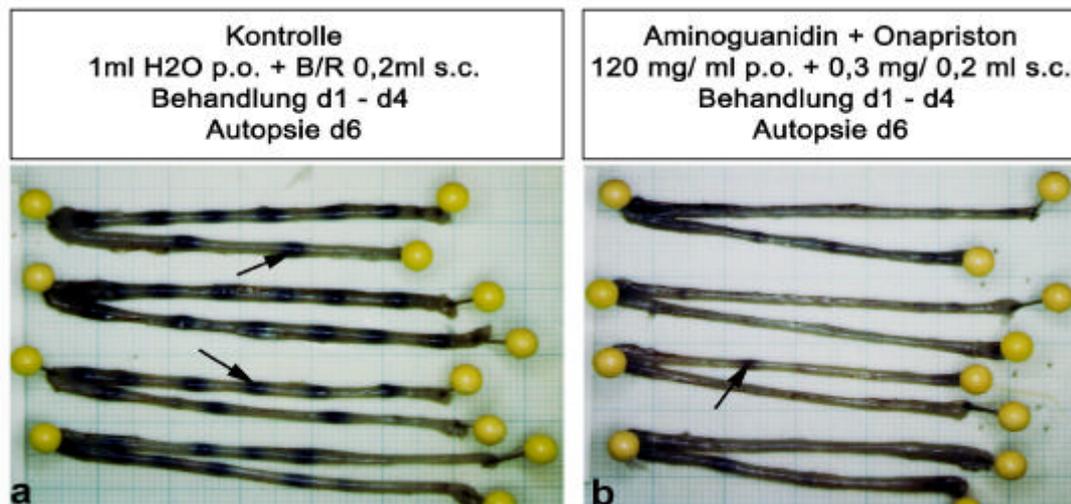


Abb. 8

Uteri mit Implantationsstellen (erhöhte Gefäßpermeabilität) nach Applikation von Aminoguanidin und Onapriston in der Kombination in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) mit nachfolgender Pontamin blue Färbung und Autopsie am Tag 6 p.c. a) Kontrolle, b) nach Behandlung.

4.1.3 Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die Präimplantationsembryonen

Da keine Implantation erfolgte, sollte geklärt werden, ob die Wirksubstanzen Aminoguanidin und Onapriston nach Applikation in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) einen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen haben. Um dieses zu beantworten, wurden nachfolgend Tuben- und/oder Uterusspülungen durchgeführt.

Die Applikation der Wirksubstanzen Aminoguanidin und Onapriston in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.), führt zu einer drastisch reduzierten Anzahl von Präimplantationsembryonen, dabei nimmt besonders ab einer 3tägigen Behandlungsdauer (d1 - d3 p.c.) die Anzahl der Embryonen im Morulastadium deutlich ab (Abb. 9, Tab. 5). Im morphologischen Erscheinungsbild zeigen die Embryonen im Morulastadium kleinere aussortierte Zellen (AZ) die auf eine Störung in der Entwicklung deuten (Abb. 10). Besonders effektiv ist die Wirkung

von Aminoguanidin und Onapriston nach einer 4tägigen Behandlungsdauer (d1 - d4 p.c.). Nach der Uterusspülung am Tag 5 p.c. sind entweder keine oder nur vereinzelt Blastocysten in der Spülflüssigkeit nachzuweisen (Abb. 9). Die vereinzelt gefundenen Blastocysten zeigen, ebenfalls wie im Morulastadium, im peripheren Bereich der Blastocyste größere aussortierte Zellen (AZ) auf die auf einen apoptotischen (Zelltod) Prozess deuten (Abb.10).

Die Applikation des iNOS-Inhibitors Aminoguanidin (120 mg/Tag/Tier) in Kombination mit Onapriston (0,3 mg/Tag/Tier) in der Präimplantationsphase (d1 - d4 p.c.) führt zu einer drastischen Fehlentwicklung der Präimplantationsembryonen.

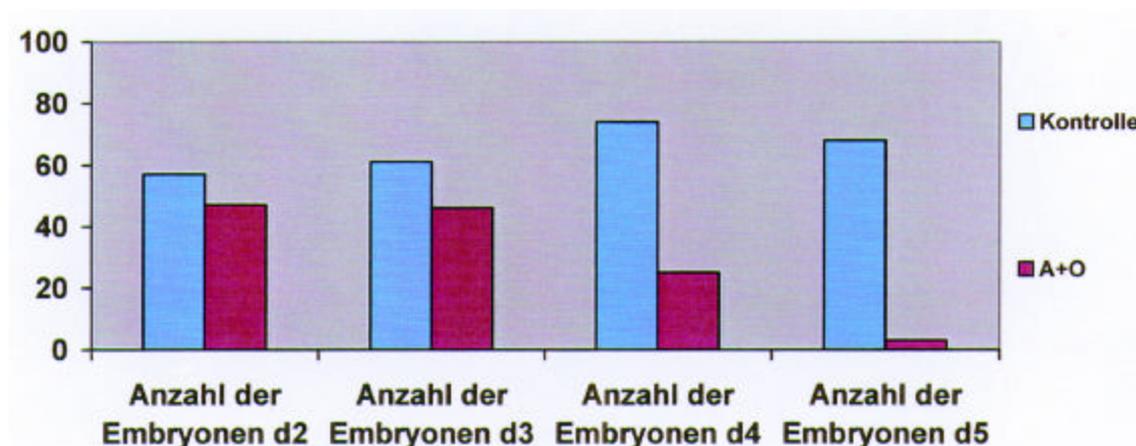


Abb. 9

Anzahl der Embryonen an unterschiedlichen Tagen in der Präimplantationsphase (d2, d3, d4, d5) nach Applikation von Aminoguanidin (A) und Onapriston (O) in der Kombination am Tag d1, d1 + d2, d1 - d3, d1 - d4.

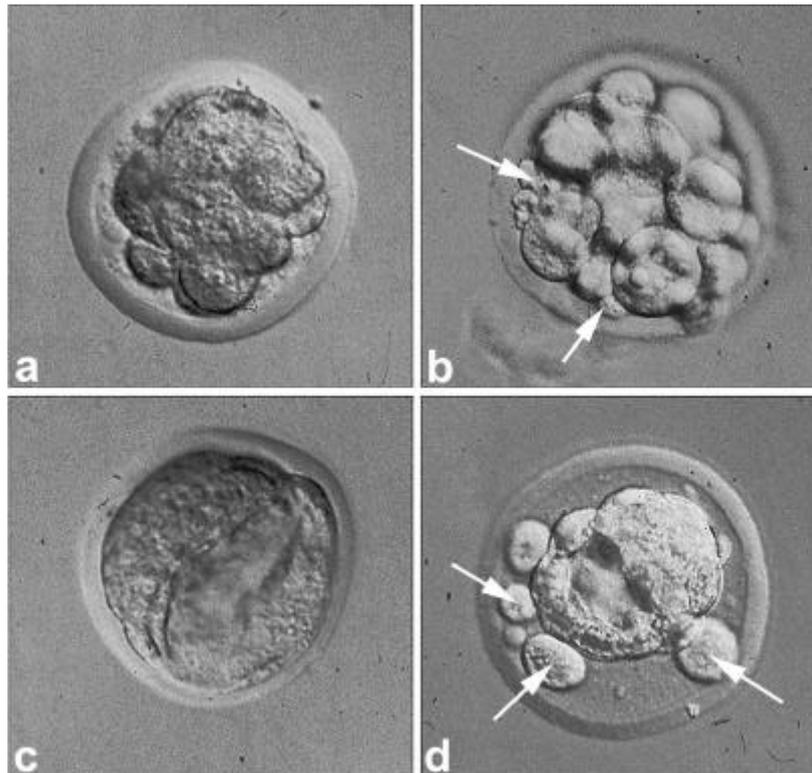


Abb. 10

Morphologie der Embryonen vor/nach Behandlung a) Kontrolle: Morulastadium (d4 p.c.) b) A + O: Morulastadium (d4 p.c.) nach Behandlung (d1-d3 p.c.) c) Kontrolle: Blastocyste (d5 p.c.) d) A+O: Blastocyste (d5 p.c.) nach Behandlung (d1-d4 p.c.).

4.1.4 Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston in der Peri- und Postimplantationsphase

Um die Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston zu verschiedenen Zeiten des Implantationsvorganges zu untersuchen, wurde die Behandlung während zwei unterschiedlicher Phasen durchgeführt:

1. In der Periimplantationsphase von d5 - d8 p.c. und in der
2. In der Postimplantationsphase von d7 - d10 p.c.

Die Behandlung in der Periimplantationsphase von d5 - d8 p.c.

Die 4 tägige Behandlung der graviden Ratten in der Implantationsphase (d5 - d8 p.c.) in der Einzeldosierung mit Aminoguanidin oder mit Onapriston führt zu keiner Verringerung der Implantationsrate am Tag 9 p.c. im Vergleich zu den Kontrolltieren. Sowohl die Anzahl als auch das makroskopische Bild der Implantationsstellen (Abb. 11, Tab. 6) am Tag 9 p.c. weisen nach den Einzelapplikationen auf einen normalen Implantationsvorgang hin. Die Behandlung über 4 Tage in der Kombination mit Aminoguanidin und Onapriston (d5 - d8 p.c.) hingegen, führt am Tag 9 p.c. bei allen Tieren zu pathologisch veränderten Implantationsstellen, die auf eine Störung der Implantationsreaktion durch die Wirksubstanzen hinweisen, obwohl die absolute Anzahl der veränderten Implantationsstellen im Vergleich zu den Kontrolltieren und den Einzelapplikationen unbeeinflusst bleibt (Tab. 6).

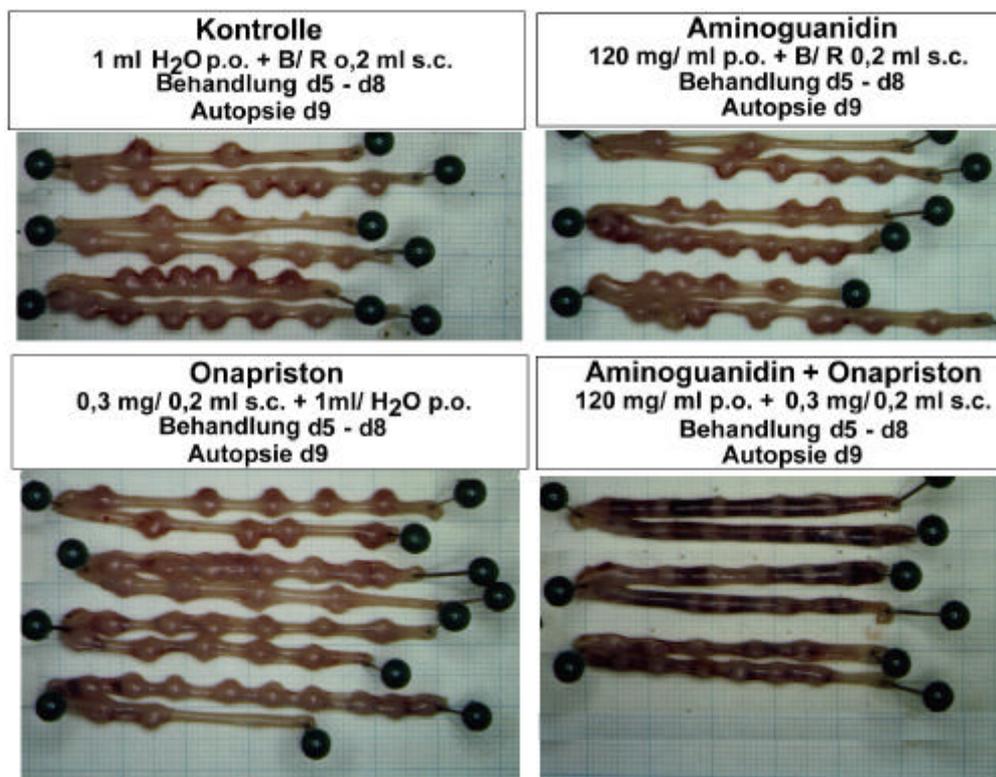


Abb. 11

Uteri mit Implantationsstellen nach Applikation von Aminoguanidin, Onapriston in der Einzeldosierung als auch in der Kombination Aminoguanidin + Onapriston in der Implantationsphase (d5 - d8 p.c.) und Autopsie am Tag 9 p.c.

Die Behandlung in der Postimplantationsphase von d7 - d10 p.c.

Die Einzelapplikation des iNOS Inhibitors Aminoguanidin über 4 Tage in der Postimplantationsphase (d7 - d10 p.c.) führt zu keinen makroskopischen Auffälligkeiten oder zu einer Reduzierung der Implantationsstellen am Tag 11 p.c. (Abb. 12, Tab. 7). Die Einzelapplikation mit Onapriston führt vereinzelt zu pathologisch veränderten Implantationsstellen, ohne jedoch deutliche Resorptionen erkennen zu lassen (Abb. 12). Eine 4 tägige Behandlung der graviden Ratten in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston (d7 - d10 p.c) hingegen, führt bei allen Tieren zu einer Hemmung der Gravidität mit resorptiven Implantationsstellen am Tag 11 p.c., die makroskopisch kaum noch sichtbar sind (Abb. 12, Tab. 7). **Dies deutet daraufhin, das die Postimplantationphase von d7 - d10 p.c., eine sehr sensible Phase für die Effektivität des iNOS Inhibitors Aminoguanidin in Kombination mit Onapriston darstellt.**



Abb. 12

Uteri mit Implantationsstellen nach Applikation von Aminoguanidin, Onapriston in der Einzeldosierung als auch in der Kombination Aminoguanidin + Onapriston in der Postimplantationsphase (d7 - d10 p.c.) und Autopsie am Tag 11 p.c.

4.1.5 Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die Geburtenrate während der Applikation in der Peri- und Postimplantationsphase

Um letztendlich die Auswirkungen des iNOS Inhibitors Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier) in Kombination mit Onapriston (0,3mg/Tag/Tier) nach einer 4 tägigen Applikation in den unterschiedlichen Phasen (d5 - d8 p.c., d6 - d9 p.c., d7 - d10 p.c.) auf die Gravidität beurteilen zu können, wurden die Tiere am Tag 19 p.c. autopsiert, und die absolute Anzahl der Nachkommen (Foeten) ermittelt.

Nach Applikation der Einzelsubstanzen Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier), Onapriston (0,3mg/Tag/Tier) in allen drei Implantationsphasen (d5 - d8 p.c., d6 - d9 p.c., d7 - d10 p.c.), sind gesunde lebende Foeten am Tag 19 p.c. im Uterus vorgefunden worden (Abb. 13, Tab. 8). Die Anzahl der Foeten am Tag 19 p.c. scheint jedoch nach den jeweiligen 4 tägigen Antigestagenbehandlungen mit Onapriston leicht reduziert gegenüber der Aminoguanidinbehandlung. Aminoguanidin in der Einzelapplikation zeigt keine Auswirkungen auf die Anzahl der Nachkommen im Vergleich zu den Kontrolltieren. (Abb. 9, Tab. 8). **Alle drei 4tägigen Behandlungsphasen zeigten letztendlich in den Einzelapplikationen mit Aminoguanidin, Onapriston keine Hemmung der Gravidität und führen zu einer Schwangerschaft, an deren Ende Foeten entwickelt wurden (Abb 13, Tab 8).**

Die Applikation von Aminoguanidin (120mg/Tag/Tier) und Onapriston (0,3mg/Tag/Tier) in der Kombination über 4 Tage (d5 - d8 p.c., d6 - d9 p.c., d7 - d10 p.c.) führten zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Anzahl der Foeten am Tag 19 p.c. Während nach der Applikation von Aminoguanidin und Onapriston in der Phase d5 - d8 p.c. die Anzahl der Foeten im Vergleich zu den Kontrolltieren nur leicht reduziert ist, wurden nach der Applikation der Kombination in der Phase d6 - d9 p.c. nur vereinzelt Foeten detektiert (Abb. 13, Tab. 8). Eine absolute Hemmung der Gravidität wurde aber auch hier nicht erreicht. Behandelt man allerdings gravide Ratten in der Kombination mit

Aminoguanidin und Onapriston von d7 - d10 p.c., so sind am Tag 19 p.c. keine Foeten vorhanden (Abb. 13, Tab. 8). Es kommt zu einer vollständigen Hemmung der Gravidität.

Nur die Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston in der Postimplantationsphase (d7 - d10 p.c.) ist geeignet, um eine vollständige Kontrazeption herbeizuführen.

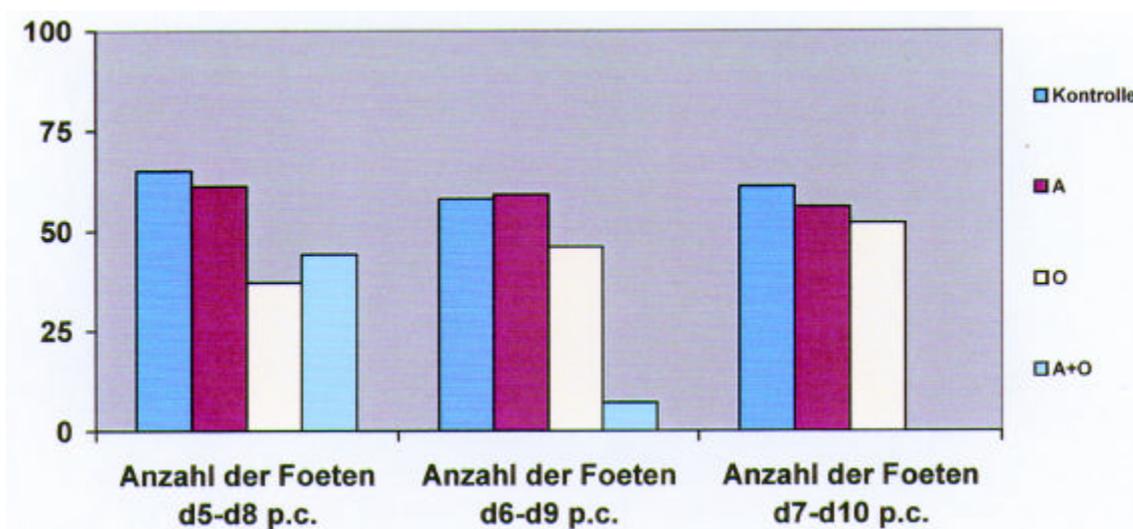


Abb. 13

Anzahl der Foeten am Tag 19 p.c., nach Applikation der Einzeldosierung Aminoguanidin, Onapriston und in der Kombination Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) in der Implantations- (d5 - d8 p.c.) und in der Postimplantationsphase (d6 - d9 p.c./ d7 - d10 p.c.)

4.1.6 Wirkung von Aminoguanidin und Onapriston auf die Geburtenrate bei kürzerer Behandlungsdauer während der Postimplantationsphase

Um zu klären, ob eine Hemmung der Gravidität zwischen d7 – d10 p.c. auch mit einer geringeren Behandlungsdauer zu bestimmten Tagen zu erreichen ist, wurde den Tieren die Kombination Aminoguanidin und Onapriston am Tag d8 p.c., Tag 9 p.c., Tag 7 p.c. und Tag 8 p.c., Tag 8p.c. und Tag 9 p.c. und am Tag 7 - Tag 9 p.c. appliziert und die Anzahl der Foeten am Tag 19 p.c. ermittelt.

Eine eintägige (Tag 8 p.c oder Tag 9 p.c.) oder zweitägige Behandlung (d7 + d8 p.c. oder d8 + d9 p.c.) mit Aminoguanidin und Onapriston von d7 - d10 p.c. führt zu keiner vollständigen Hemmung der Gravidität (Abb. 14, Tab. 9). Die eintägige Behandlung am Tag 9 p.c. scheint jedoch eine größere Effektivität auf die absolute Anzahl der Nachkommen zu haben als die eintägige Behandlung am Tag 8 p.c. Nach einer zweitägigen Applikation von Aminoguanidin und Onapriston (d7 + d8 p.c. oder d8 + d9 p.c.) nimmt die Anzahl der Foeten im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls ab, wobei die Tage d8 + d9 p.c. sensibler auf die Wirksubstanzen reagieren als die Tage d7 + d8 p.c. (Abb. 14, Tab. 9). Die eintägige bzw. zweitägige Applikation von Aminoguanidin und Onapriston zeigt, dass der Tag 9 p.c. besonders sensibel auf die Wirksubstanzen reagiert. Eine vollständige Hemmung der Gravidität erreichte man aber erst mit einer 3tägigen Behandlung von d7 - d9 p.c. (Abb. 14, Tab 9). Die Autopsie am 19. Graviditätstag zeigt ausschließlich Uteri ohne Foeten.

Die Austragungsversuche zeigen, daß nur eine 3tägigen Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston von d7 - d9 p.c. in der Postimplantationsphase zu einer vollständigen Hemmung der Gravidität führt.

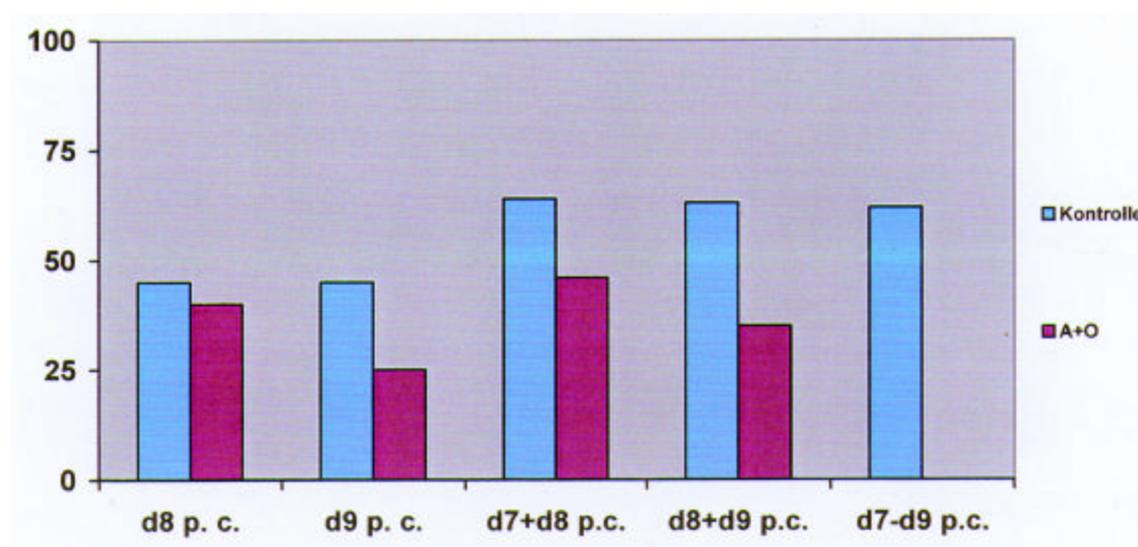


Abb. 14

Anzahl der Foeten m Tag 19 p.c. nach Applikation von Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) in der Kombination zu unterschiedlichen Tagen in der Postimplantationsphase (d8 p.c., d9 p.c., d7 + d8 p.c., d8 + d9 p.c., und d7 + d9 p.c.).

4.1.7 Bestimmung des genauen Zeitpunktes der Resorptionen nach dreitägiger Behandlung von Aminoguanidin und Onapriston in der Postimplantations-phase

Um die sensible Phase, die nach einer 3 tägigen Behandlung (d7 - d9 p.c.) in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston zu einer schnellen Resorption der Implantationsstellen führt, genauer zu bestimmen und um nachfolgende zellbiologische Untersuchungen zeitlich einengen zu können, wurden gravide

Ratten von d7 – d9 p.c. in der Kombination behandelt und danach am **Tag d9 p.c.** im Abstand von **2, 4, und 8 Stunden (10.00 Uhr/14.00Uhr/18.00Uhr)** nach der letzten Applikation autopsiert.

Bei den Kontrolltieren ist am Tag 9 p.c innerhalb von 10 Stunden (10.00 - 18.00 Uhr) eine deutliche Zunahme des Umfangs der Implantationsstellen zu beobachten. Dies deutet auf einen normalen Dezidualisierungsprozess hin. Bei den in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston behandelten Tieren erkennt man makroskopisch eine drastische Abnahme im Umfang der Implantationsstellen am **Tag 9 p.c.** innerhalb von **8 Stunden (10.00 - 18.00 Uhr)** (Abb. 15).

Um 10.00 Uhr, 2 Stunden nach der letzten Behandlung ist bei den meisten Tieren die in der Kombination behandelt wurden, kaum ein Unterschied im Ausmaß der Dezidualisierung bzw. im Umfang der Implantationsstellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren festzustellen. Eine Abnahme der Uterusgewichte im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde ebenfalls nicht festgestellt (**Tab. 15**).

Eine Reduzierung des Umfangs der Implantationsstellen und eine Abnahme der Uterusgewichte läßt sich erst am **Tag 9 p.c.** um **14.00 Uhr, 6 Stunden** nach Applikation von Aminoguanidin und Onapriston feststellen (Abb. 15). Offensichtlich führen die Wirksubstanzen nun zu einer Beeinträchtigung der Dezidualisierung mit einer Abnahme des Umfangs der Implantationsstellen.

Die Autopsie am **Tag 9 p.c. um 18.00 Uhr, 10 Stunden** nach der letzten Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston führt zu makroskopisch nur noch rudimentär vorhandenen Implantationsstellen. Vergleicht man makroskopisch den Umfang der Implantationstellen der behandelten Tiere mit den Implantationsstellen der Kontrolltiere, erkennt man deutlich die durch die Wirksubstanzen ausgelöste Resorption (Abb. 15).

Die Untersuchungen zur Zeitreihe zeigen, dass die Hemmung der Gravidität durch eine 3tägige Behandlung (d7 - d9 p.c.) mit Aminoguanidin und Onapriston, die letztendlich zu keinen Nachkommen führt, auf eine Störung des Dezidualisierungsprozesses zurückzuführen ist und sich in einer Resorption der Implantationsstellen am Tag 9 p.c. innerhalb weniger Stunden zwischen 14.00 und 18.00 Uhr resultiert.

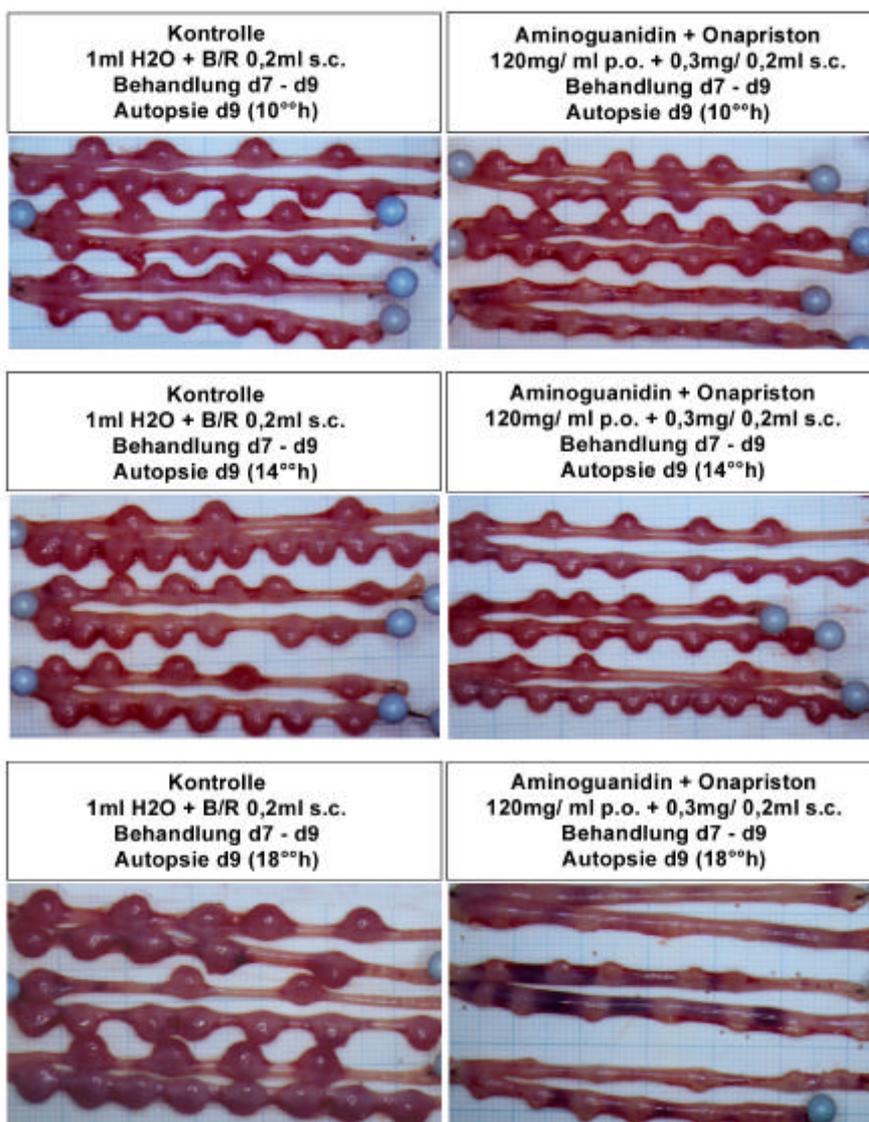


Abb. 15 (Zeitreihe)

Uteri mit Implantationsstellen nach einer 3tägigen Applikation in der Kombination Aminoguanidin + Onapriston in der Postimplantationsphase (d7 - d9 p.c.) und nachfolgenden Autopsien am Tag 9 p.c. um 10.00/14.00/18.00 Uhr.

4.2 Zellbiologische Veränderungen in der Dezidua am Tag 9 p.c. nach einer 3 tägigen Behandlung mit Aminoguanidin in Kombination mit Onapriston

Die Experimente mit den iNOS Inhibitor Amminoguanidin in Kombination mit dem Antigestagen Onapriston haben gezeigt, dass es eine synergistische Wirkung gibt, die sich drastisch auf den Dezidualisierungsprozess auswirkt. Es sollten im folgenden zellbiologische Mechanismen und Signalkaskaden gesucht werden, die diese synergistische Wirkung erklären, um damit den Pathomechanismus des iNOS-Inhibitors und des Antigestagens zu verstehen.

Longitudinalschnitte durch die Implantationskammern zwischen dem Tag 7 p.c. – Tag 10 p.c. lassen jeweils auf der antimesometralen Seite (AM) den Embryo (E) eines Kontrolltieres erkennen (Abb. 16 a - d). Mit dem sich entwickelnden Embryo läßt sich im Endometrium ein zeitliches und räumliches Muster der Dezidualisierung beobachten (Abb. 16 a - d). Am Tag 7 p.c. ist der Embryo noch vom Uterusepithel umgeben (Abb. 16 a). Im histologischen Bild (Abb. 16 a) erkennt man bereits auf der antimesometralen Seite eine Zone endometrialer Fibroblasten, die sich in Dezidualzellen differenziert haben (dunkelrote Anfärbung), die primäre Dezidualzone. Das restliche undifferenzierte endometriale Stroma ist am Tag 7 p.c. noch sehr locker mit großen Interzellularräumen (hellere Anfärbung) (Abb. 16 a). In Abb. 16 b erkennt man das die Dezidualisierung (D) am Tag 8 p.c., beinahe schon die ganze antimesometriale Seite erfasst hat (sekundäre Dezidualzone) und sich bereits zur mesometralen (M) Seite hin orientiert. Nur im Randbereich auf der antimesometralen Seite sind noch Fibroblasten zu erkennen, die nicht dezidualisiert sind (Abb. 16 b). Der Grenzbereich zwischen der antimesometrialen und der mesometrialen Seite, die „junctional zone“ (J), ist ebenfalls am Tag 8 p.c. vom Dezidualisierungsprozeß betroffen (Abb. 16 b).

Am Tag 9 p.c. ist die antimesometrale Seite vollständig dezidualisiert (Abb. 16 c). Man erkennt dicht gepackte große polygonale Deziduazellen, die aneinandergrenzen und kaum Interzellularräume erkennen lassen (Abb. 16 e). Am Tag 9 p.c. hat die Dezidualisierung auch fast die gesamte mesometrale Seite erfasst, allerdings sind die Deziduazellen hier kleiner als auf der antimesometralen Seite und lassen mehr Interzellularräume erkennen. (Abb. 16 f). Im Zuge der Dezidualisierung entwickeln sich ab dem Tag 9 p.c. auf der mesometralen Seite größere Sinusoide (S), die sich bis in den Bereich der „junctional zone“(J) ziehen (Abb. 16 c). Diese strahlenförmige Anordnung der Sinusoide auf der mesometralen Seite ist besonders am Tag 10 p.c. deutlich zu erkennen (Abb. 16d). Neben der Dezidualisierung des endometrialen Stromas erkennt man ab Tag 9 p.c. eine Zunahme der Embryonalentwicklung die einhergeht mit einer größeren Anzahl der Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus (Abb. 16 c, d).

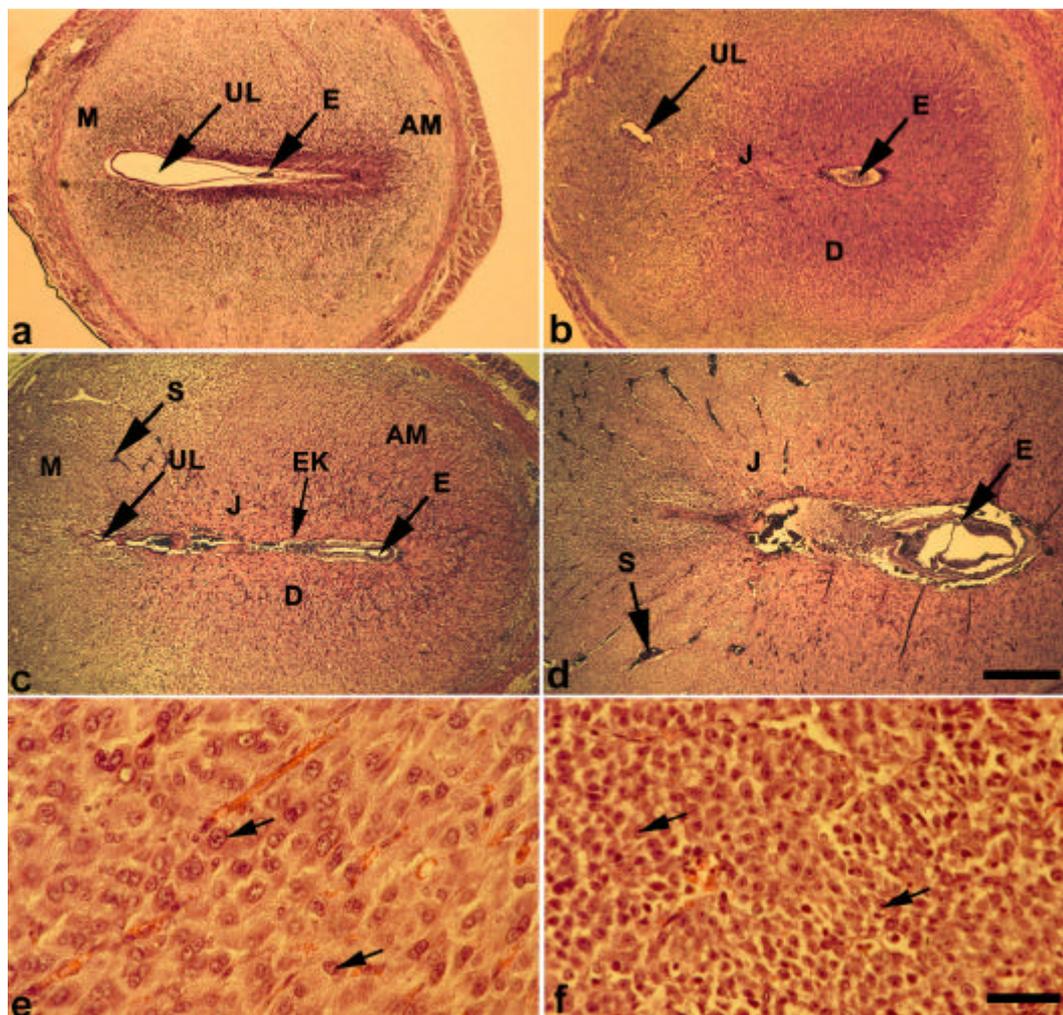


Abb. 16

HE-Färbung. Kontrolle: a – d) Embryo-Implantation während der Postimplantationsphase von d7 - d10 p.c. e) Polygonale Deziduazellen auf der antimesometralen Seite (d9 p.c.) f) Deziduazellen auf der mesometralen Seite. (d9 p.c.) Abk.: AM: Antimesometral, M: Mesometral, E: Embryo, UL: Uteruslumen, J: Junctional zone, D: Dezidua, S: Sinusoide, EK: Ektoplazentarkonus (Balken = 400µm a - d, 100 µm e - f).

4.2.1 I-NOS Expression in der Dezidua am Tag 8 p.c. und Tag 9 p.c.

Bisher war die Beteiligung von iNOS an der Dezidualisierungsreaktion unbekannt. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen bereits am Tag 8 p.c. eine erhöhte Expression der induzierten NO Synthase (iNOS) im endometrialem Stroma eines Kontrolluterus (Abb. 17 a). Die Ausbreitung der induzierten NO Synthase reicht von der antimesometralen Seite bis in den Bereich der „junctional zone“ (Abb. 17 a). Die erhöhte iNOS Expression am Tag 8 p.c. korreliert mit der Dezidualisierung der Fibroblasten im Stroma (Abb. 16 b, 17 a). Am Tag 9 p.c. erkennt man eine Ausbreitung der iNOS Expression von der antimesometralen Seite bis zur mesometralen Seite in den Bereich des zu diesem Zeitpunkt noch sichtbaren restlichen Uterusepithels bzw. Uteruslumens (Abb. 17 b). Besonders auf der antimesometralen Seite im Randbereich der sekundären Dezidualzone und auf der mesometralen Seite, in der sich die Sinusoide entwickeln, ist eine erhöhte iNOS Expression sichtbar (Abb. 17 b).

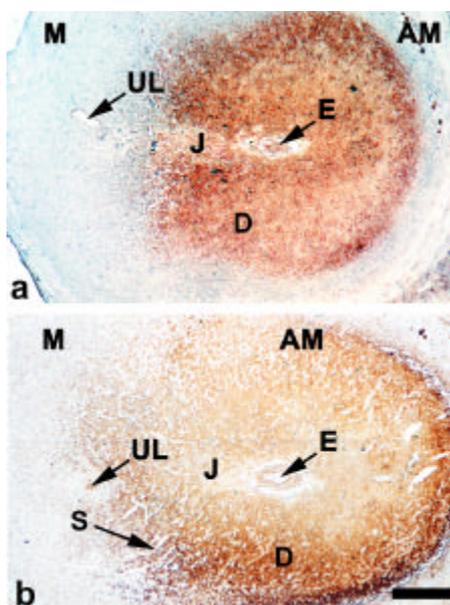


Abb. 17

Expression der induzierten NO-Synthase (iNOS) im endometrialem Stroma während der Postimplantationsphase am **Tag 8 + 9 p.c.**. Kontrolle : a) d8 p.c., b) d9 p.c. Abk.: AM: Antimesometral, M: Mesometral, E: Embryo, UL: Uteruslumen, J: Junctional zone, D: Dezidua, S: Sinusoide, (Balken = 450µm).

4.2.2 Proliferation und Apoptose nach Applikation

Nach Applikation von Aminoguanidin in Kombination mit einer ultra-low-dose Onapriston zeigten sich stark veränderte Differenzierungsmuster in der Dezidua, die im folgenden beschrieben werden. Die PCNA (proliferating cell nuclear antigen) Markierung am Tag 9 p.c. zeigt bei den Kontrolltieren eine unverminderte Proliferationsfähigkeit der Deziduazellen auf der antimesometralen und mesometralen Seite an (Abb. 18 a). Die von d7 – d9 p.c. in der Kombination behandelten und Tag 9 p.c. um 18.00 Uhr autopsierten Tiere, **10 h nach der letzten Applikation** lassen auf der antimesometralen Seite nur noch eine schwache und auf der mesometralen Seite der Dezidua eine bis zu diesem Zeitpunkt unverminderte Proliferation der Deziduazellen erkennen. Der Embryo zeigt ebenfalls weiterhin Teilungsaktivität (Abb. 18 b). Ein Proliferationsstopp ist jedoch im Grenzbereich zwischen der antimesometralen und mesometralen Seite der Dezidua, in der „junctional zone“ zu beobachten (Abb. 18 b). Zusätzlich lassen sich in diesem Grenzbereich apoptotische Zellen nachweisen (Abb. 18 c, d).

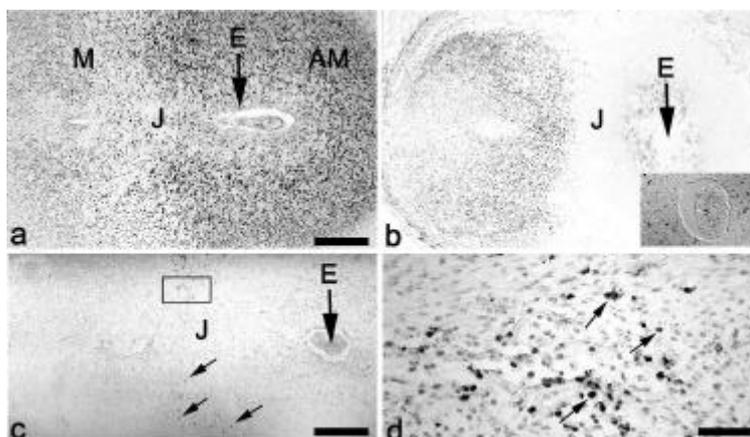


Abb. 18

Proliferation/Apoptose in der Dezidua ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) während der Postimplantationsphase mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und nachfolgender Autopsie am **Tag 9 p.c., 10 h nach der letzten Applikation**. a) Kontrolle (PCNA); b) PCNA Markierung von behandelten Ratten mit A + O. c - d) Apoptose Nachweis von behandelten Ratten mit A + O in der junctional zone. Abk.: AM: Antimesometral, M: Mesometral, E: Embryo, J: Junctional zone, (Balken = 400µm a - c, 80 µm in d).

4.2.3 Desmin-Expression nach Applikation

Die Kontrolltiere zeigen am Tag 9 p.c. in der Dezidua eine erhöhte Desmin-Expression, die sich von der antimesometralen zur mesometralen Seite erstreckt (Abb. 19 a). Das Desmin Expressionsmuster korreliert mit der iNOS Expression in der Dezidua am Tag 9 p.c. (Abb. 17 b). Besonders die differenzierten polygonalen Deziduazellen auf der antimesometralen Seite lassen im Cytoplasma eine Expression dieser Intermediärfilamente erkennen (Abb. 19 b). Eine Störung im Differenzierungsprogramm der Dezidualzellen zeigt sich nach einer 3tägigen Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston am Tag 9 p.c., **6 h nach der letzten Applikation**. Auf der antimesometralen Seite der Dezidua bis in die „junctional zone“ hinein sind mehrere Bereiche sichtbar, die ihre cytoplasmatische Desminexpression verlieren (Abb. 19 c). In der Vergrößerung lassen sich Bereiche dieser undifferenzierten Deziduazellen beobachten (Abb. 19 d).

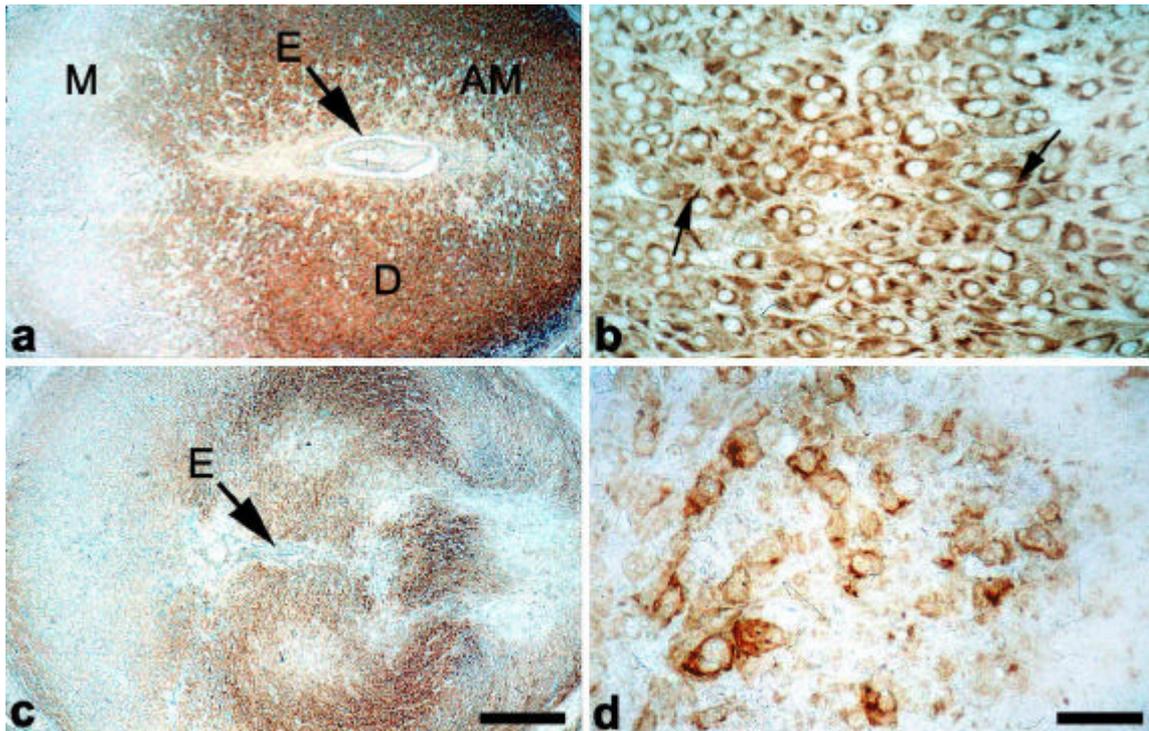


Abb. 19

Desmin Expression in der Dezidua ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) während der Postimplantationsphase mit Aminoguanidin + Onapriston und Autopsie am **Tag 9 p.c., 6 h nach der letzten Applikation.** a) Kontrolle (Desmin Expression in der Dezidua), b) Kontrolle (Differenzierte Deziduazellen), c) Desmin Expression in der Dezidua von behandelten Ratten mit A + O, d) Undifferenzierte Deziduazellen nach Behandlung. Abk.: AM = Antimesometral, M = Mesometral, E = Embryo, D = Dezidua (Balken = 400 μ m a + c, 100 μ m in b + d).

4.2.4 Sinusoidausbildung und COX II Expression nach Applikation

Die induzierte Form der Cyclooxygenase (COX II) wurde am Tag 9 p.c., vor allem in Deziduazellen nachgewiesen die im Bereich der „junctional zone“ liegen (Abb. 20 b). In diesem Grenzbereich zwischen der antimesometralen/mesometralen Dezidua läßt sich zur selben Zeit am Tag 9 p.c. eine verstärkte Sinusoidbildung erkennen (Abb. 20a). Nach einer 3tägigen Behandlung von d7 – d9 p.c. mit Aminoguanidin und Onapriston ist die COX II-Expression in diesem

Bereich nicht mehr nachweisbar (Abb. 20 d). Die bei den Kontrolltieren in der „junctional zone“ vorhandene Sinusoidbildung ist nach der Behandlung nur noch rudimentär nachzuweisen (Abb. 20 c).

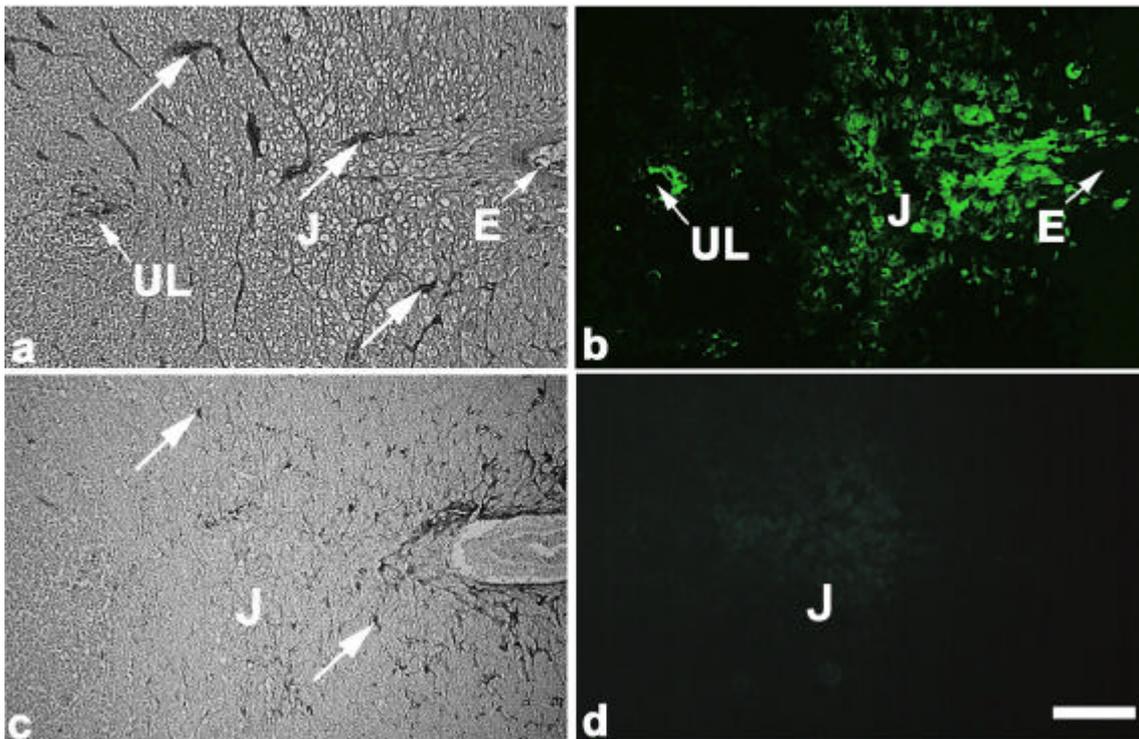


Abb. 20

Sinusoidbildung und COX II Expression in der „junctional zone“ ohne/nach einer 3tägigen Behandlung während der Postimplantationsphase (d7 – d9 p.c.) mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und Autopsie am **Tag 9 p.c., 6h nach der letzten Applikation**. a) Kontrolle (Sinusoide), b) Kontrolle (COX II-Expression), c) Sinusoidbildung nach Behandlung mit A + O, d) COX II-Expression nach Behandlung mit A + O. Abk.: E = Embryo, UL = Uteruslumen, J = „junctional zone“, S = Sinusoide (Balken = 250µm in a - d).

4.2.5 Expression des Angiogenesemarkers CD 90 auf der mesometralen Seite nach Applikation

Die CD-90 Markierung des Endothels der Ratte am Tag 9 p.c., zeigt eine verstärkte Angiogenese mit weitleumigen Sinusoiden auf der mesometralen Seite (Abb. 21 a). Die 3tägige Behandlung in der Kombination Aminoguanidin und Onapriston führt dagegen auf der mesometrale Seite der Dezidua zu englumigen Gefäßen. Dies weist auf eine Störung in der Entwicklung der Sinusoide hin (Abb. 21 b).

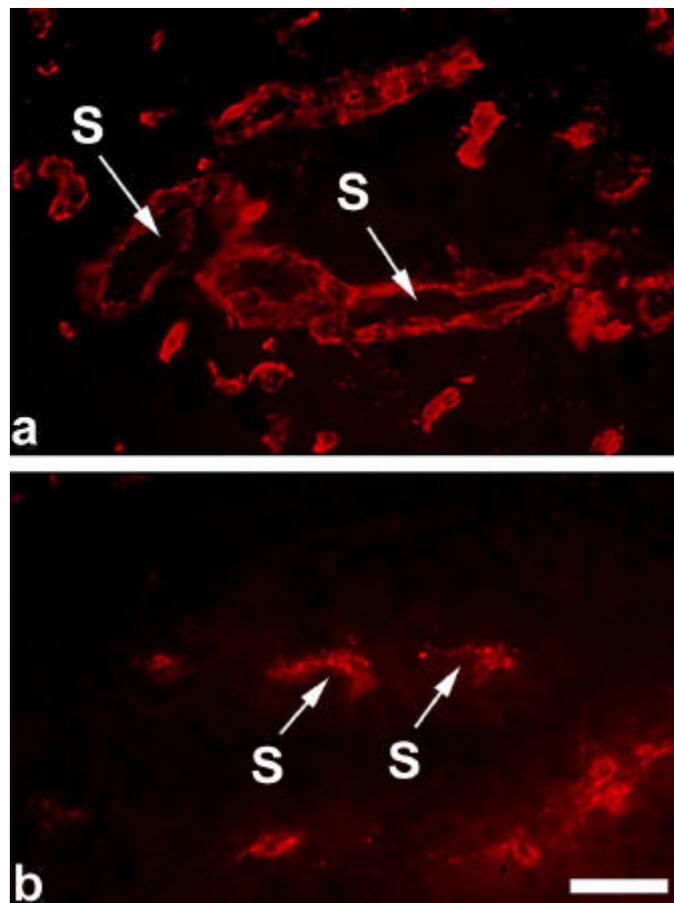


Abb. 21

CD-90 Expression auf der mesometralen Seite der Dezidua ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und Autopsie am **Tag 9 p.c., 6 h nach der letzten Applikation.** a) Kontrolle, b) Sinusoide nach Behandlung mit A + O. Abk.: S = Sinusoide ET = Endothel (Balken = 50 µm in a + b).

4.2.6 Expression des Transkriptionsfaktors NFkappaB nach Applikation

Der Transkriptionsfaktor NFkappaB konnte bei den Kontrolltieren am Tag 9 p.c. während des Dezidualisierungsprozesses immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 22 a). Das NFkappa Expressionsmuster, welches sich von der antimesometralen zur mesometralen Seite ausdehnt, korreliert mit dem iNOS und dem Desmin Expressionsmuster der Kontrolltiere am Tag 9 der Gravidität (Abb. 17 b, Abb. 19 a). Die Deziduazellen zeigen ausschließlich eine cytoplasmatische Lokalisation von NFkappaB (Abb. 22 b). Die 3tägige Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston führt in der Dezidua zu einem Verlust von NFkappaB (Abb. 22 c). Die Bereiche in der Dezidua, in denen sich eine Abnahme der NFkappaB-Expression beobachten lässt, zeigen eine Translokation von NFkappaB vom Cytoplasma in den Kern (Abb. 22 d). Der Verlust von NFkappaB, korreliert mit dem Verlust von Desmin in der Dezidua - ebenfalls nach einer 3tägigen Behandlung - in einem identischen Muster am Tag 9 p.c., 6 h nach der letzten Applikation (Abb. 19 c, 22 c).

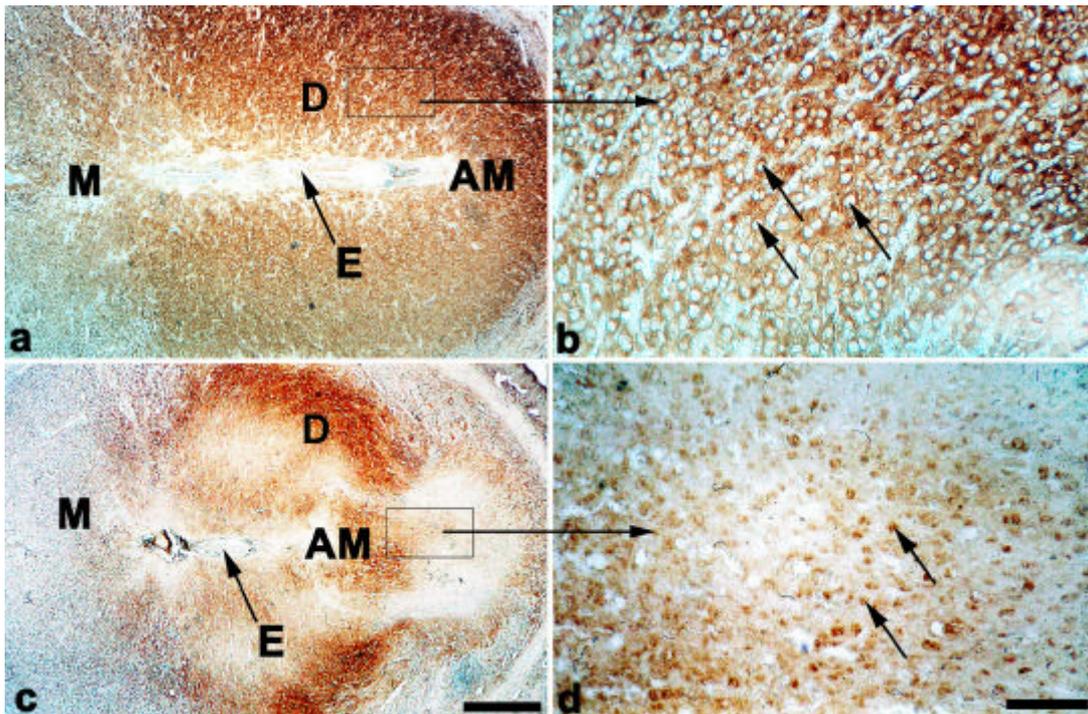


Abb. 22

Expression des Transkriptionsfaktors NFkappaB in der Dezidua ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und Autopsie am **Tag 9 p.c., 6 h nach der letzten Applikation**. a) Kontrolle (Übersicht), b) Kontrolle (Cytoplasmatische Lokalisation von NFkappaB) , c) Behandlung mit A + O (Verlust von NFkappaB in der Dezidua), d) Behandlung mit A + O (Nukleäre Translokation). Abk.: AM = Antimesometral, M = Mesometral, E = Embryo, D = Dezidua (Balken = 400 µm a + c, 100 µm in b + d).

4.2.7 Expression der aktivierten MAPkinase ERK1&2 am Tag 8 p.c. und Tag 9 p.c. und am Tag 9 p.c. nach Applikation

Es konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass die aktivierte MAPkinase ERK1&2 in der Dezidua exprimiert wird. Die aktivierte MAPkinase ERK1&2 ist entsprechend der Dezidualisierung der Fibroblasten am Tag 8 p.c. zunächst in der antimesometralen und dann zusätzlich in der mesometralen Seite exprimiert (Abb. 23a). Sie folgt damit wie alle Differenzierungsmarker dem räumlichen und zeitlichen Muster des Dezidualisierungsprozesses. Die mesometrale Seite der Dezidua - in den Bereichen der Sinusoidbildung - in denen bereits am Tag 8 p.c.

aktiviertes ERK1&2 nachgewiesen wurde, differenzieren sich erst am Tag 9 p.c. in Deziduazellen (Abb. 16 b, c). Am Tag 9 der Gravidität ist in der gesamten Dezidua der mesometralen Seite aktiviertes ERK1&2 nachzuweisen (Abb. 23 b). Besonders in der Region der Sinusoide ist diese aktive MAPkinase kernständig anzutreffen (Abb. 23 b). Die bereits differenzierten Deziduazellen auf der antimesometralen Seite (Abb. 19 a, b) zeigen am Tag 9 p.c. dagegen eine deutlich schwächere oder gar keine Expression der MAPkinase ERK1&2 (Abb. 23 b).

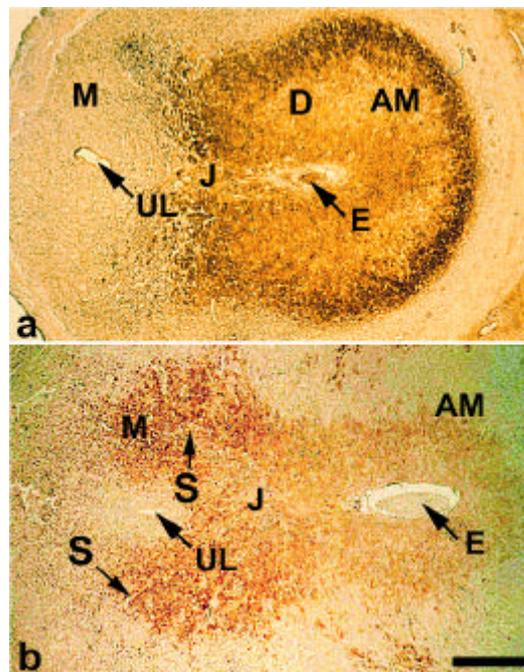


Abb. 23

Expression der aktivierten MAPkinase ERK1&2 während der Postimplantationsphase. Kontrolle: a) d8 p.c. b) d9 p.c.. Abk.: AM =Antimesometral, M= Mesometral, E= Embryo, S= Sinusoide, UL= Uteruslumen, D= Dezidua (Balken=400µm a-c)

Die Kontrolltiere zeigen am Tag 9 p.c. auf der mesometralen Seite und in der „junctional zone“ eine im Bereich der Sinusoide hohe Expression der aktivierten MAPkinase ERK1&2. Die 3tägige Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston von d7 - d9 p.c. führt in Abhängigkeit von dem Zeitraum nach der letzten Applikation am Tag 9 p.c. zu einem unterschiedlichem Verlust der

aktivierten MAPkinase ERK1&2 in der Dezidua. Bereits 2 Stunden nach Applikation läßt sich eine Abnahme der aktivierten Form von ERK1&2 auf der mesometralen Seite der Dezidua und im Bereich der „junctional zone“ beobachten (Abb. 24 b). 6 Stunden nach Applikation ist ein vollständiger Verlust von aktiviertem ERK1&2 in der gesamten Dezidua beobachten (Abb. 24 c). Überraschenderweise wird 10 Stunden nach Applikation ERK1&2 auf der mesometralen Seite reexprimiert; nicht jedoch in der „junctional zone“ im Bereich der Sinusoidbildung (Abb. 24 d). Möglicherweise hängt die Reexpression der aktiven MAPkinase von der Abnahme des iNOS-Inhibitors und dem Antigestagen im Serum der Ratte ab. Anscheinend kann aber die aktive Form von ERK1&2 nicht in allen Subpopulationen der Dezidua wieder exprimiert werden.

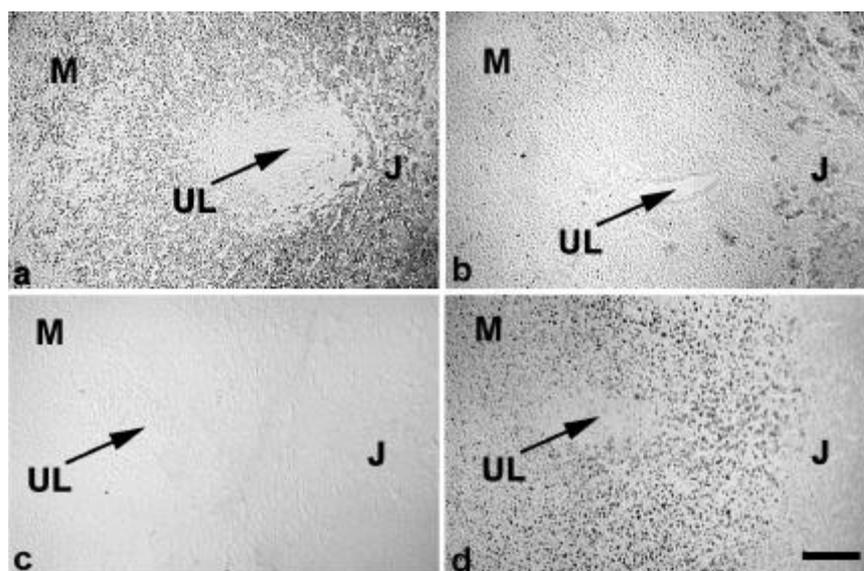


Abb. 24

Expression der aktivierten MAPkinase ERK1&2 in der Dezidua ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und Autopsie am **Tag 9 p.c., 2, 6, und 10 h nach der letzten Applikation.** a) Kontrolle (Übersicht), b) Behandlung mit A + O (2h nach der letzten Applikation), c) Behandlung mit A + O (6h nach der letzten Applikation), d) Behandlung mit A + O (10h nach der letzten Applikation). Abk.: AM = Antimesometral, M = Mesometral, E = Embryo, J = „Junctional zone“ (Balken = 300 µm a - d)

4.2.8 Ko-lokalisierung von aktiviertem ERK 1&2 und iNOS im Endothel nach Applikation

Wie in Abb. 23 b zu sehen ist, wird die aktivierte MAPkinase ERK 1&2 am Tag 9 p.c. besonders auf der mesometralen Seite der Dezidua und in der „junctional zone“ im Bereich der Sinusoide exprimiert. Da am Tag 9 p.c. während der Dezidualisierung iNOS ebenfalls in diesem Bereich nachgewiesen wurde (Abb. 17 b), stellte sich die Frage nach einer gemeinsamen Beteiligung an der Entwicklung der Sinusoide.

In den Endothelien der Sinusoide auf der mesometralen Seite konnte sowohl iNOS als auch die MAPkinase ERK1&2 nachgewiesen werden (Abb.25 b, c, d). Die 3tägige Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston führt am Tag 9 p.c., 6 Stunden nach der letzten Applikation zu einem Verlust von iNOS als auch der aktiven MAPkinase ERK 1&2 im Endothel (Abb 25 f). Dies weist auf eine Beteiligung sowohl von iNOS als auch von ERK 1&2 an der Sinusoidentwicklung auf der mesometralen Seite hin.

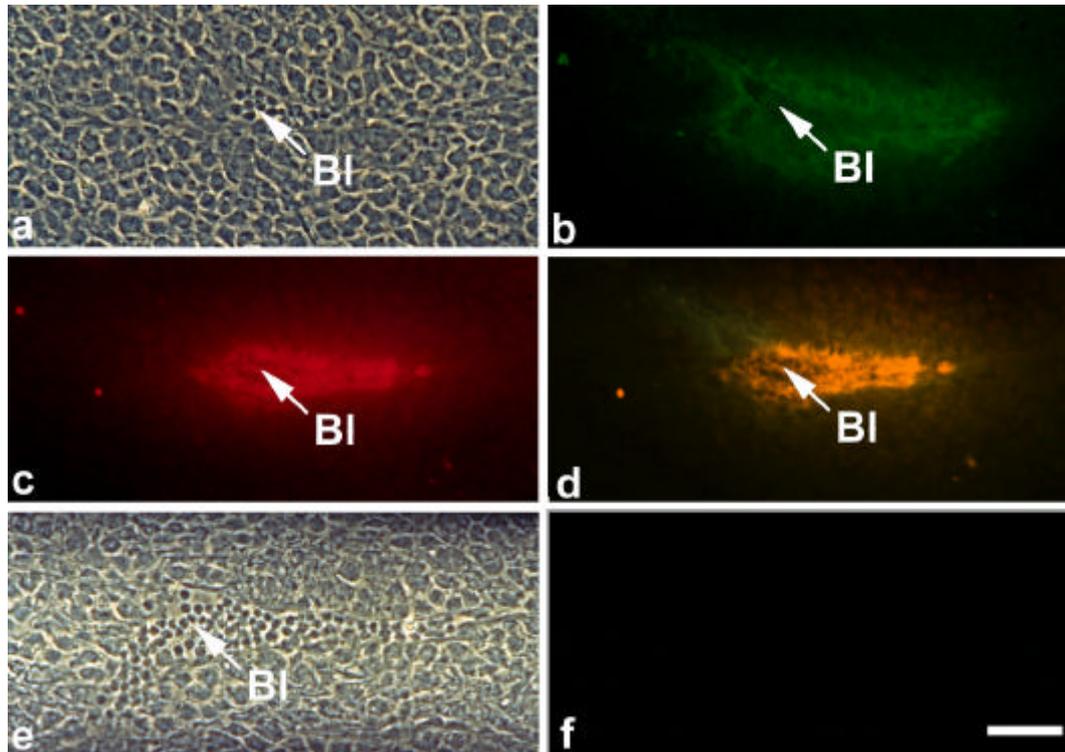


Abb. 25

Ko-lokalisierung der aktivierten MAPkinase ERK1&2 und iNOS im Endothel ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und Autopsie am **Tag 9 p.c., 6 h nach der letzten Applikation.** a) Kontrolle (Phasenkontrast), b) iNOS Expression c) ERK1&2 Expression, d) Kolokalisation von iNOS und ERK1&2, e) behandelte Tiere (Phasenkontrast), f) behandelte Tiere (Verlust von iNOS und ERK1&2 im Endothel). Abk.: Blutgefäß (BL) (Balken = 50 μ m a - f).

4.2.9 Ko-lokalisierung von aktiviertem ERK 1&2 und iNOS im Ektoplazentarkonus nach Applikation

Seit kurzer Zeit wird die Beteiligung von iNOS an der Trophoblastentwicklung bei der Ratte/Maus und dessen Bedeutung für die Angiogenese in den verschiedenen Implantationsphasen diskutiert. Es konnte bei Kontrolltieren am Tag 9 p.c eine deutliche iNOS Expression im Ektoplazentarkonus gezeigt werden (Abb. 26 b). Auch die aktivierte MAPkinase ERK1&2 wurde in den Trophoblastzellen exprimiert (Abb. 26 c). In Abb 26 d erkennt man die Ko-lokalisierung in den Trophoblastzellen. Nach einer dreitägigen Behandlung mit Aminoguanidin und Onapriston, 6 Stunden nach Applikation werden beide sowohl iNOS als auch ERK1&2 in den Trophoblastzellen nicht mehr exprimiert (Abb 26 f-h). Die erstmals detektierte Kolokalisation von iNOS und aktiviertem ERK1&2 im Ektoplazentarkonus und der zeitgleiche Verlust könnte erneut ein wichtiger Hinweis für die gegenseitige Interaktion zwischen NO und ERK1&2 sein.

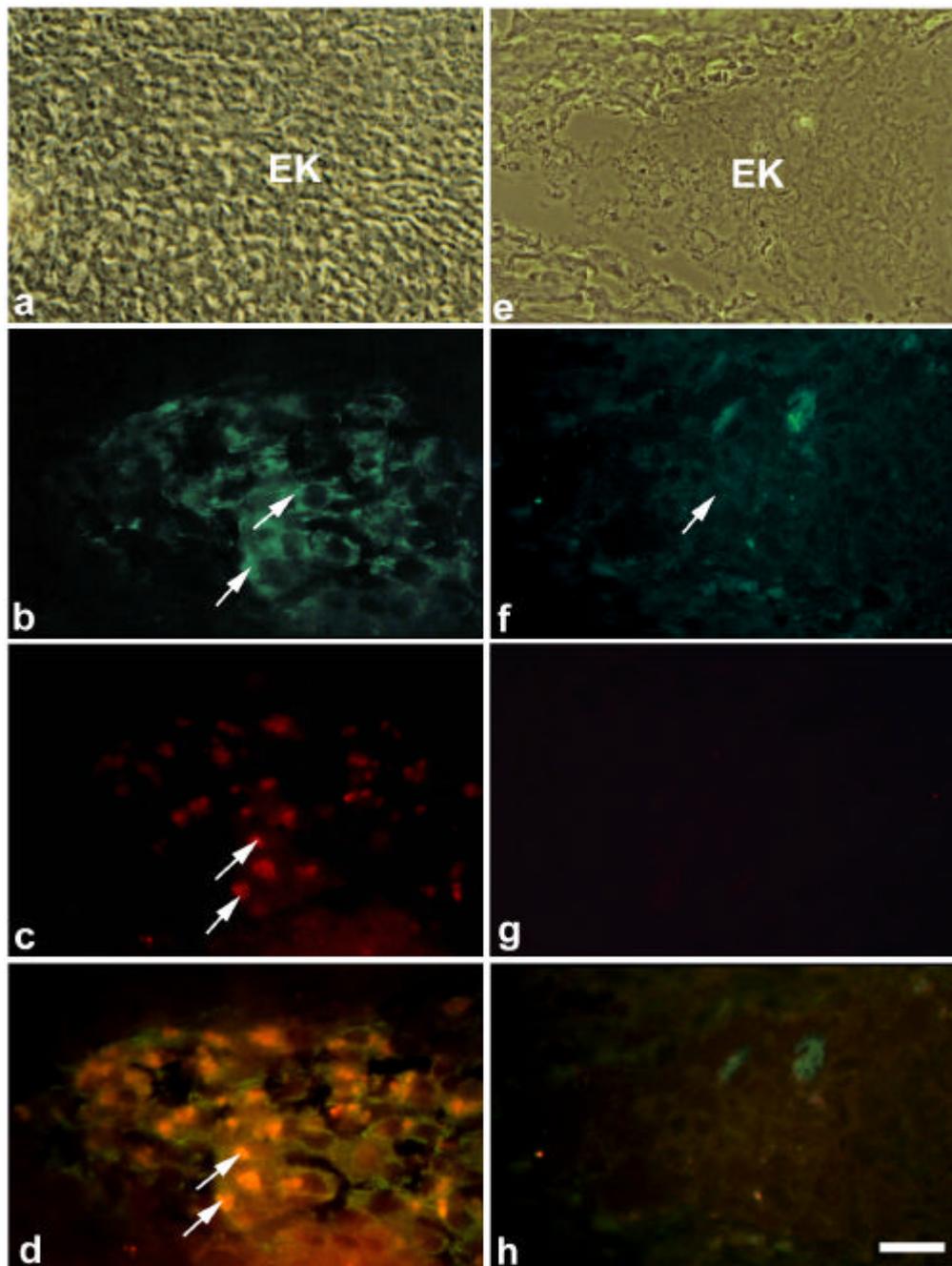


Abb. 26

Kolokalisation der aktivierten MAPkinase ERK1&2 und iNOS im Ektoplazentarkonus ohne/nach einer 3tägigen Behandlung (d7 – d9 p.c.) mit Aminoguanidin (A) + Onapriston (O) und Autopsie am **Tag 9 p.c. um 14.00Uhr, 6 Stunden nach der letzten Applikation** . a) Kontrolle (Phasenkontrast), b) iNOS Expression c) ERK1&2 Expression, d) Co-Expression von iNOS und ERK1&2, e) behandelte Tiere (Phasenkontrast), f) behandelte Tiere (Verlust von iNOS im Ektoplazentarkonus), g) behandelte Tiere (vollständiger Verlust von ERK1&2 im Ektoplazentarkonus), h) behandelte Tiere (Verlust der Koexpression von iNOS und ERK1&2 im Ektoplazentarkonus).

5 Diskussion

Eine normale Entwicklung der Oozyte nach der Fertilisation und die koordinierte Implantation der Blastocyste in das endometrialen Stroma und die damit verbundenen zellbiologischen Veränderungen im Endometrium sind eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft bei allen Mammalia. Die zellbiologischen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge während der Prä-, Peri-, und Postimplantationsphase stellen eine sehr sensible Phase für den Erhalt der Schwangerschaft dar. Trotz einer erfolgreichen *in vitro*-Fertilisation (IVF) und einem gelungenen Embryotransfer bleibt oft eine Schwangerschaft bei einer großen Anzahl von Frauen aus. Daher steht gerade die Aufklärung zellbiologischer Fragestellungen in diesen Phasen der Frühgravidität im Mittelpunkt reproduktionsmedizinischer Grundlagenforschung.

Andererseits ist die Frühgravidität auch ein geeigneter Zeitraum um erfolgreich – mittels einer postkoitalen Pille - eine ungewollte Schwangerschaft zu unterbinden. Beides, eine gezielte Förderung oder eine Unterbindung der Schwangerschaft mit neuen Therapeutika ist aber nur möglich, wenn die zellbiologischen Abläufe in den unterschiedlichen Implantationsphasen besser verstanden und interpretiert werden.

Aufgrund des schwierigen experimentellen Zuganges und des deutschen Embryonenschutzgesetzes beim Menschen sind aber gerade diese Phasen bis heute weitestgehend unverstanden (Bischof und Campana 1996). Der Ansatz zu einem besseren Verständnis der zellbiologischen Abläufe in der Prä-, Peri-, und Postimplantationsphase beim Menschen bieten daher ausschließlich *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen mit tierischem Gewebe.

In vitro Experimente bieten zwar die Möglichkeit der gezielten Untersuchung spezieller zellbiologischer Fragestellungen, haben aber den Nachteil, die komplexen physiologischen und zellbiologischen Vorgänge der Frühgravidität nicht immer zu berücksichtigen. Um diese komplexen Verflechtungen besser

verstehen zu können, ist das in vivo-Experiment weiterhin ein wichtiges Instrumentarium zum Verständnis der Vorgänge in der Frühgravidität. Allerdings haben in vivo-Experimente den Nachteil, dass die Ergebnisse von einer Spezies nicht unbedingt auf andere Spezies übertragbar sind, da die zellbiologischen Abläufe beim Implantationsvorgang durchaus variieren können. Selbst zwischen dem Menschen und dem Primaten gibt es Unterschiede im Implantationsprozess zu beobachten (Enders 1991). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Wahl des Tiermodells für die in vivo-Untersuchungen. Möchte man die Auswirkungen bestimmter Wirksubstanzen auf den Verlauf der Gravidität beurteilen, sind Spezies mit langen Tragzeiten denkbar ungeeignet.

Ratte und Maus mit ihren 8 - 14 Nachkommen/Tier und einer Tragzeit von ~ 22 Tagen stellen oftmals die geeignetere Wahl dar um erste in vivo-Experimente durchzuführen. Letztendlich aber ist die Wahl des in vivo-Modells abhängig von der Aussage, die man mit dem experimentellen Ansatz erreichen möchte.

5.1 Bedeutung der NOS Expression in der Frühgravidität

In den letzten Jahren mehrten sich speziell durch in vivo-Experimente bei Ratten und Mäusen Anzeichen, dass nicht nur Progesteron allein für die zellbiologischen Veränderungen im Endometrium während der Implantation verantwortlich ist, sondern dass insbesondere NO, über iNOS und/oder eNOS synthetisiert, daran beteiligt sind. Ebenso scheint die Expression von iNOS/eNOS bei der Entwicklung der Präimplantationsembryonen, an der Trophoblastinvasion in das Endometrium und an der Trophoblast-Interaktion mit dem endometrialen Stroma eine Rolle zu spielen. Im einzelnen wurde diskutiert, ob iNOS/eNOS an der Vasodilatation, Angiogenese, am Dezidualisierungsprozeß und an der Bildung der Plazenta bei der Ratte und Maus involviert ist (Novaro et al. 1996, 1997; Purcell et al. 1998, Chwalisz et al. 1999, Purcell et al. 1999). Knock-out-Experimente für das iNOS (Mac Micking et al. 1995) und eNOS Gen (Huang et

al. 1995) zeigten allerdings keine Auswirkungen auf die Fertilität und auf die Gravidität bei Mäusen. Unsere ersten in vivo-Untersuchungen zum Synergismus von NO und Progesteron während der Prä-, und Periimplantationsphase an Ratten, demonstrierten nach Applikation von Onapriston in einer „ultra low dose“, den unterstützenden inhibitorischen Effekt des unspezifischen NO Inhibitors L-NAME auf die Frühgravidität (Chwalisz et al. 1999). Diese Untersuchungen bestätigen eine Beteiligung von NO während der Prä- und Periimplantationsphase, aber nur in Kombination mit einer leichten Reduktion von Progesteron-Serumwerten. Auch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit unterstützen, dass NO an den zellbiologischen Vorgängen während der Frühgravidität insbesondere über iNOS beteiligt ist.

Um zunächst die Bedeutung von NO für den Dezidualisierungsprozess bei der Ratte zu bewerten, wurde eine räumliche Lokalisation von iNOS in der Dezidua anhand von immunhistochemischen Methoden durchgeführt. Es konnte eine hohe Expression von iNOS in den differenzierten Fibroblasten der Dezidua in den Endothelzellen der Sinusoide als auch in den Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus detektiert werden.

In den letzten Jahren konnten bereits andere Arbeitsgruppen anhand von Enzym Assays und durch Western blot-Analysen eine iNOS/eNOS Expression und Aktivität im Endometrium nachweisen (Novaro et al. 1996). Erst in letzter Zeit wurde durch die Entwicklung spezifischer Antikörper die Lokalisation von iNOS und eNOS im Endometrium und während des Dezidualisierungsprozesses ermöglicht (Purcell et al. 1998, 1999)

Mara Suburo et al. (1995) konnte durch eine NADPH Diaphorase Aktivität im normalen zyklischem Ratten Endometrium NO nachweisen. Die Anwesenheit von iNOS in humanen dezidualisierten Stromazellen (Telfer et al. 1997) und im sekretorischem Endometrium (Tschugguel et al. 1998) wurde anschließend durch die Immunhistochemie bestätigt. Bei der Ratte wurden am Tag 5 p.c. und am Tag

6 p.c. erstmals zum Zeitpunkt der Implantation eine erhöhte iNOS/e-NOS Aktivität im Endometrium gemessen (Novaro et al. 1997). Durch immunhistochemische Untersuchungen an graviden Mäusen wurde iNOS im endometrialem Stroma und im Ektoplazentarkonus detektiert (Purcell et al. 1999). E-NOS hingegen wurde überwiegend am Tag 6 p.c. in der primären Dezidualzone und im Endothel von Blutgefäßen auf der antimesometralen Seite nachgewiesen. Durch quantitative Western blot-Analysen wurde gezeigt, dass die Expression der iNOS Isoform im Endometrium zwischen d 6 p.c. - d 9 p.c. hochreguliert wird, während das Protein für die eNOS Isoform ab dem Tag 8 p.c. nur noch in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (Purcell et al. 1998, 1999). Die Western blot-Analysen und die immunhistochemischen Untersuchungen von Purcell et al. (1999) zur iNOS Expression unterstützen die Ergebnisse zur iNOS Expression in der vorliegenden Arbeit mit einer hohen iNOS Expression am Tag 8 p.c. und am Tag 9 p.c. in der Dezidua und mit einer Expression im Ektoplazentarkonus. Alle bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die iNOS Isoform am Tag 9 p.c. im graviden Endometrium die dominierende ist.

Die iNOS Expression im Endometrium geht dabei mit der Transformation der Fibroblasten in Dezidualzellen (Dezidualisierungsprozeß) einher. Inwieweit NO über iNOS, insbesondere in der Phase von d8 – d9 p.c. den Dezidualisierungsprozeß unterstützt oder beeinflusst, ist bis heute unklar. In den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, daß eine hohe Übereinstimmung im Expressionsmuster zwischen iNOS und dem Differenzierungsmarker Desmin in der sich entwickelnden Dezidua zu beobachten ist. Bei den weiteren Untersuchungen konnte ausgehend vom iNOS Expressionsmuster nicht nur eine Korrelation mit dem Differenzierungsmarker Desmin, sondern auch zum erstenmal eine Korrelation mit dem Expressionsmuster von NFkappaB in der Dezidua am Tag 9 p.c. beobachtet werden. Der Transkriptionsfaktor NFkappaB ist bei den Kontrolltieren ausschließlich inaktiv im Cytoplasma der Dezidualzellen lokalisiert. NFkappaB

ist bekannt dafür, ebenso wie iNOS an Entzündungsprozessen beteiligt zu sein und kann über dieselben Zytokine (IL-1, TNF) aktiviert werden um anschließend an zahlreiche Promotoren binden zu können, um dann die Expression inflammatorischer Zytokine zu bewirken (Manning und Rao 1997). Die Aktivierung von NFkappa B verläuft dabei über eine Phosphorylierungsreaktion an IkappaB. Durch die Phosphorylierung an IkappaB wird NFkappaB freigesetzt und kann im Zellkern unterschiedlichste Genexpressionen aber auch apoptotische Signalkaskaden auslösen. So kann NFkappaB auch an der Bildung von iNOS bei der Ratte beteiligt sein, da für NFkappaB zwei Bindungsstellen im Promoterbereich des iNOS Gens zu lokalisieren sind (Keinänen et al. 1999).

NO ist bekannt dafür, dass es über eine direkte Interaktion mit NFkappaB ebenfalls die Genexpression beeinflussen kann (Sen and Packer 1996). Die in vitro Daten hierzu sind aber widersprüchlich. Einerseits wurde berichtet, dass ein erhöhter NO Spiegel, ausgelöst durch NO Donoren, zu einer Verstärkung (Lander et al. 1993), andererseits zu einer Abschwächung der NFkappaB Bindung an der DNA führt (Peng et al. 1995). Eine Inhibierung der DNA Bindung erfolgt dabei über eine Bindung von NO an Cysteinresten von NFkappaB, welche für die DNA Bindung verantwortlich ist (Matthews et al. 1996). Insbesondere der inhibierende Einfluß von NO in progesteronabhängigen Geweben auf die NFkappaB Translokation wird diskutiert (Chwalisz, Habilitationsschrift 1999). Die Lokalisation von NFkappaB im Cytoplasma der Deziduazellen in Korrelation mit der iNOS Expression bei der Ratte am Tag 9 p.c. könnte daher ein Hinweis für ein inhibierenden Einfluß von NO auf die Translokation des NFkappaB sein.

Die Untersuchungen am Tag 9 p.c. bei der Ratte, zeigen nicht nur eine erhöhte iNOS Expression in der Dezidua, sondern auch in den Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus. Diese Beobachtungen wurden durch die Untersuchungen von der Arbeitsgruppe Purcell et al. (1999) und Gagioti et al. (2000) bestätigt. Die Bedeutung von NO im Trophoblasten des Ektoplazentarkonus und in den

differenzierten Deziduazellen während der Dezidualisierung ist unklar. Denkbar ist jedoch, dass NO an der Proliferation der Trophoblastzellen und an der Dilatation der Gefäße auf der mesometralen Seite beteiligt ist (Welsh und Enders 1991).

Unterstützt wird die Hypothese einer erhöhten Proliferationstätigkeit der Trophoblastzellen durch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, dass die aktivierte diphosphorylierte MAPkinase ERK1&2 am Tag 9 p.c. im Ektoplazentarkonus kernständig nachzuweisen ist und ko-exprimiert mit iNOS vorliegt. Die Eigenschaft des aktiviertem ERK1&2, über eine Translokation in den Kern die Genexpression über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, ist bekannt (Blumer und Johnson, 1994). Die am besten untersuchte Aktivierung der Genexpression durch ERK1&2 ist die Phosphorylierung von ELK-1 und SAP-1 (Hill und Treisman 1995, Su und Karin 1996). Beide Transkriptionsfaktoren binden mit einem weiteren Protein, dem „Serum Response Faktor“ an das „Serum Response Element“, das man als regulatorische Sequenz vor verschiedenen Genen in höheren Eukaryonten findet. Zu den Genen, die von ELK-1 reguliert werden, gehört der Transkriptionsfaktor c-fos, der mit c-jun den Transkriptionfaktor AP-1 bildet (Krauss 1997). AP-1 ist bekannt dafür, an Proliferationsvorgängen und Differenzierungsvorgängen entscheidend beteiligt zu sein.

NO ist im MAPkinase Signalweg involviert und in der Lage u.a. ERK1&2 zu aktivieren (Lander et al. 1995, 1996, Yun et al. 1998). So konnte Lander et al. (1996) für eine humane T-Zelllinie zeigen, dass über eine Nitrosylierung des p21^{ras} Proteins direkt durch NO eine Phosphorylierungskaskade bis zur Aktivierung von ERK1&2 ausgelöst werden kann (Lander et al. 1996). Die Phosphorylierung von ERK1&2 kann jedoch auch über eine indirekte Aktivierung über cGMP vermittelte Vorgänge, an denen auch NO beteiligt ist erfolgen (Callsen et al. 1998). Extrazelluläre Signale wie Interleukin-1 oder auch TNF- α können ebenfalls ERK1&2 aktivieren. Interleukin-1 hat -wie bereits

erwähnt- einen starken induzierenden Effekt auf die NO Synthese und kann daher Vorgänge, die an der Aktivierung von ERK1&2 involviert sind unterstützen. Ob dieser Mechanismus für die Trophoblastzellen zutrifft bleibt zu klären.

Die Entwicklung und Dilatation der Sinusoide auf der mesometralen Seite hat eine große Bedeutung für den Erhalt der Gravidität, da die Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus in die Sinusoide invadieren und an der Bildung der Plazenta beteiligt sind (Glasser et al. 1987, Welsh und Enders 1991). Diskutiert wird, ob die iNOS Expression in den Trophoblastzellen direkt oder indirekt mit der Dilatation der Sinusoide und mit der stattfindenden Angiogenese auf der mesometralen Seite zusammenhängt. So führen Nanaev et al. (1995) die Dilatation der uteroplazentaren Arterien beim Meerschweinchen auf die Expression der iNOS Isoform in den extravillösen Trophoblastzellen zurück.

Diskutiert wird auch die direkte Beteiligung von iNOS an der Angiogenese. Anhand einen spezifischen uterinen Angiogenesemarkers (CD-90) konnten die Endothelzellen der dilatierten Sinusoide markiert werden. Zusätzlich konnte eine iNOS Expression im Endothel der Sinusoide auf der mesometralen Seite der Dezidua gezeigt werden. Inwieweit die iNOS Expression für die Angiogenese verantwortlich ist bleibt allerdings weiterhin unklar und wird zur Zeit intensiv diskutiert (Radomski et al. 1987, Ignarro 1989, Vallance et al. 1989, Ahokas und Sibai 1992, Conrad et al. 1993 Robbins et al. 1994, Pfeilschifter et al. 1996).

Wie schon im Ektoplazentarkonus wurde im Endothel auf der mesometralen Seite eine Ko-Expression von iNOS Expression und der aktivierten Form der MAPkinase ERK1&2 nachgewiesen. Denkbar wäre, dass die Angiogenese insbesondere auf der mesometralen Seite der Dezidua durch iNOS (NO) und durch die aktivierte MAPkinase ERK1&2 unterstützt wird. In vitro wurde bereits in koronaren Endothelien die aktive Form dieser MAPkinase bestätigt (Parenti et al. 1998). Die gleiche Arbeitsgruppe um Parenti et al. (1998) konnte zeigen, dass

NO die proliferativen Effekte des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF durch eine Aktivierung der MAPkinase ERK1&2 fördert. Weiterhin wurde bei in vitro Untersuchungen nachgewiesen, dass die durch VEGF ausgelösten Migrations- und Wachstumsprozesse bei postkapillaren Endothelzellen der Cornea durch den NO Inhibitor L-NAME gehemmt wurden (Ziche et al. 1997).

VEGF aber auch bFGF wurden in den letzten Jahren auch im Zusammenhang mit der Angiogenese im humanen und im Ratten Endometrium diskutiert (Carlone und Rider 1993, Greb et al. 1997). Besonders bFGF und nicht VEGF scheint für die Angiogenese im Uterus der Ratte von Bedeutung zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von bFGF auf mRNA Ebene zum Zeitpunkt der Angiogenese auf der mesometralen Seite der Dezidua stark hochreguliert wird, die VEGF Expression auf mRNA Ebene aber auf einem niedrigem Niveau stagniert (Srivastava et al. 1998). Die Experimente mit VEGF Antagonisten bei Ratten unterstützen diese Beobachtungen, da kein inhibierender Effekt in der Frühgravidität auf die Gefäßentwicklung gezeigt werden konnte (Heß-Stumpp, mündliche Mitteilung). Eine Beteiligung von bFGF und iNOS zur Aktivierung der aktiven MAPkinase ERK1&2 ist bei Betrachtung der bisher publizierten Daten in Betracht zu ziehen.

5.2 Bedeutung von Progesteron für die Frühgravidität

Progesteron kontrolliert direkt oder indirekt Proliferations- und Differenzierungsvorgänge in der Prä-, Peri-, und Postimplantationsphase im graviden Uterus der Ratte. Weiterhin reguliert Progesteron synergistisch mit Östrogen den Embryotransport in der Tube und ist verantwortlich für die Überführung des Endometriums in die rezepptive Phase, die eine Implantation der Blastocyste ermöglicht. Auch für den Dezidualisierungsprozess und für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ist Progesteron absolut essentiell. Die Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren, Zytokine, Transkriptionsfaktoren (c-

myc, c-jun) (Fujimoto et al. 1994, Bany und Kennedy 1999) und spezifischer Zellverbindungen wie die Connexine stehen in der Frühgravidität bei der Ratte unter Progesteroneinfluss (Winterhager et al. 1991, Tabidzadeh und Babaknia 1995). Auch die iNOS Expression wird im Endometrium zur Zeit der Implantation und während der Dezidualisierung bei der Ratte unter Progesteroneinfluss hochreguliert, wobei aber nicht endgültig geklärt ist, ob Progesteron dafür allein verantwortlich ist oder auch andere Mechanismen eine Rolle spielen (Dong et al. 1998). Diese Abhängigkeit des Implantationsprozesses von Progesteron läßt diese Phase der Frühgravidität besonders geeignet für eine endometriale Kontrazeption erscheinen, wobei die Transformation des Endometrium in die rezep tive Phase ausschließlich vom Progesteron abhängig ist. Progesteronabhängige Marker, die für die rezep tive Phase des Endometriums stehen, wurden bei unterschiedlichen Tierspezies identifiziert (Beier 1975, Fliss et al. 1991, Faszleabas und Verhage 1994). Ein universaler Marker für die endometriale Rezeptivität, welche eine erfolgreiche Implantation voraussagt ist allerdings bis heute nicht verfügbar. Ebenso unbekannt sind die zellbiologischen Vorgänge die der Blastocyste erlauben zu implantieren. Es stellt sich daher die Frage, ob die iNOS Aktivität zur Zeit der Implantation bei der Ratte mitverantwortlich für die Transformation und Erhaltung der Rezeptivität ist.

Durch Applikation von Antiprogestinen wie dem Onapriston läßt sich die Rezeptivität am Endometrium beeinflussen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete „ultra low dose“ Dosis von Onapriston (0,3 mg/Tier/Tag) wurde appliziert um eine leichte Veränderung der Rezeptivitäts am Endometrium zu erreichen. Diese „ultra low dose“ Onapriston wirkt bei der Ratte nicht ovulations-, oder implantationshemmend und verändert nicht den Zyklus der Tiere. Diese Merkmale sind ist auch eine Grundvoraussetzung für den Einsatz von Antigestagenen für therapeutische Zwecke. Eine vollständige Implantationshemmung in der Einzeldosierung mit Onapriston wird erst mit einer zehnfach höheren Dosierung erreicht.

5.3 Zum Synergismus von NO und Progesteron in der Präimplantationsphase

Die Ergebnisse zu den Versuchen in der Präimplantationsphase demonstrieren, dass durch die Applikation des spezifischen iNOS (NO)-Hemmers Aminoguanidin die inhibitorischen Effekte von Onapriston während der Präimplantationsphase (d1-d4 p.c.) dramatisch erhöht werden und eine vollständige Hemmung der Implantation erfolgt. Die gleichen Effekte wurden bei vorangegangenen Versuchen nach Applikation des unspezifischen NO Hemmers L-Name mit Onapriston beobachtet (Chwalisz et al. 1999). Es war unklar, ob dieser synergistische Effekt von Aminoguanidin und Onapriston nach Applikation in der Präimplantationsphase auf eine Rezeptivitätshemmung am Endometrium oder auf andere Ursachen zurückzuführen waren.

Durch Tuben- und Uteruspülungen wurde deutlich, dass die Anzahl der Embryonen -zum Zeitpunkt der Differenzierung vom Morula zum Blastocystenstadium- dramatisch abnahm. Nur vereinzelt konnten Blastocysten nachgewiesen werden, die allerdings Entwicklungsstörungen zeigten. Die Frage stellte sich, warum die Applikation eines NO Hemmers in Kombination mit einer sehr niedrigen Dosis Onapriston zu solchen dramatischen Effekten führt. Eine Beteiligung von NO an der Embryonalentwicklung wurde bis dahin nicht beschrieben.

Erst vor kurzem wurde von einigen Arbeitsgruppen durch in vitro- und in vivo-Experimente der Nachweis erbracht, dass Präimplantationsembryonen von Mäusen und Ratten in der Lage sind - über eNOS und/oder iNOS - NO zu synthetisieren (Barroso et al. 1998). Zusätzlich zeigten einige in vitro-Untersuchungen an Präimplantationsembryonen von Mäusen die Möglichkeit, dass NO an der Embryonalentwicklung in der Präimplantationsphase beteiligt ist. So konnten sich nach Gabe von NO-Inhibitoren (L-NAME, N-nitro-L-arginine)

Präimplantationsembryonen im Kulturmedium nicht bis zur Blastocyste differenzieren (Biswas et al. 1998, Gouge et al. 1998). Die vorliegenden Versuche zeigten aber, dass Aminoguanidin (iNOS Inhibitor) alleine in vivo keinen Einfluß auf die Entwicklung von Präimplantationsembryonen hat, sondern nur bei zusätzlicher Reduktion von Progesteronwerten.

Der Einfluß von NO und von Progesteron auf die Präimplantationsembryonen bleibt aber weiterhin unklar. Behandelte Blastocysten von Ratten mit RU 486 zeigten nach Embryotransferexperimenten eine verzögerte Implantation (Roblero und Croxatto 1991), während nach Applikation von verschiedenen Progesteronantagonisten bei Kaninchen in der Präimplantationsphase kein Effekt auf die Embryonen beobachtet wurde, sondern eine Verschiebung des „implantation window“ erfolgt (Beier et al. 1994).

Die in vivo Experimente zum Synergismus in der Präimplantationsphase zeigen letztendlich eine Beteiligung von NO und Progesteron an der Embryonalentwicklung bei Ratten, wobei die genauen zellbiologischen Vorgänge in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden

Gagioti et al. (2000) detektierten vor kurzem (in vitro) die Expression von iNOS in den Trophoblastzellen von Mauspräimplantationsembryonen. Welche Auswirkungen die iNOS/eNOS Expression für die Invasion der Blastocyste und für die Implantation hat, ist nur hypothetisch zu beantworten. Denkbar ist jedoch, dass NO einen positiven Einfluß auf die Permeabilität und Erweiterung von Gefäßen hat (Wu et al. 1996, Ni et al. 1997). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten „Pontamin blue“ Färbungen zur Gefäßpermeabilität zeigen nach der Kombinationsbehandlung in der Präimplantationsphase, neben einem hemmenden Effekt auf die Embryonalentwicklung eine antidilatorischen zum Zeitpunkt der Implantation. Ob dieser antidilatorische Effekt auf den Verlust der Blastocysten im Uterus oder auf eine direkte Wirkung der Substanzen auf die Gefäße im Endometrium zurückzuführen ist, bleibt noch zu klären.

Biswas et al. (1998) konnten mit Hilfe der Pontamin blue-Färbung ebenfalls einen inhibierenden Einfluß des NO Inhibitors L-NAME auf die Dilatation der Gefäße zum Zeitpunkt der Implantation feststellen. Ein direkter Effekt auf die Gefäße ist eher unwahrscheinlich, da die iNOS Knock-out-Maus keinen inhibierenden Einfluß auf die Gefäßentwicklung zeigt. Daher werden zur Zeit einige Mediatoren diskutiert, die den dilatorischen Effekt von NO unterstützen.

Besonders Interleukin 1- β (IL-1 β) wird im Zusammenhang mit der maternalen Gefäßentwicklung (Corbett et al. 1992, Inoue et al. 1993) in Verbindung gebracht. Interleukin1 und dessen Rezeptor wird bei Mäusen in den Präimplantationsembryonen hochreguliert und erreicht sein Expressionsmaximum mit dem Schlüpfen der Blastocyste aus der Zona pellucida (Kruessel et al. 1997). Daher ist die Hypothese, dass die Blastocyste selbst IL-1 bildet und dadurch eine Signalkaskade, unter Einbeziehung von NO in Gang setzt die letztendlich in einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität im Bereich der Implantationsstelle resultiert sehr wahrscheinlich.

5.4 Zum Synergismus von NO und Progesteron in der Peri- und in der Postimplantationsphase

Die gleichzeitige Applikation des iNOS Inhibitors Aminoguanidin in Kombination mit einer geringen Dosierung des Antigestagens Onapriston zeigten in der Periimplantationsphase und vor allem in der Postimplantationsphase eine synergistische Wirkung auf den Dezidualisierungsprozess. Dabei zeigte sich die Behandlung in der Postimplantationsphase von d7-d9 p.c. effektiver auf den Abbruch der Gravidität, als die Behandlung in der Periimplantationsphase von d5 – d8 p.c.. Der iNOS Inhibitor Aminoguanidin zeigte keine und das in einer niedrigen Dosierung applizierte Antigestagen Onapriston hatte nur marginale Auswirkungen auf den Dezidualisierungsprozess in den beiden Phasen.

Die zum erstenmal durchgeführten Untersuchungen zur Rolle des NO in Kombination mit Progesteron unterstützten die Hypothese einer progesteronabhängigen Bedeutung von NO im Dezidualisierungsprozess. So konnte gezeigt werden, dass die Applikation des iNOS Inhibitors in Kombination mit einem niedrig dosierten Antigestagen Auswirkungen auf die Differenzierung der endometrialen Fibroblasten und auf die Gefäßentwicklung in der mesometralen Seite der Dezidua hat. Weiterhin konnte die Beteiligung von NO und Progesteron auf Signalkaskaden während der Dezidualisierung aufgezeigt werden.

So wurde die Expression des Differenzierungsmarker Desmin, der während des Dezidualisierungsprozesses in den Fibroblasten exprimiert wird durch Gabe des iNOS Inhibitors in Kombination mit dem Antigestagen gestört. Die Beteiligung von Progesteron an der Differenzierung der endometrialen Stromazellen ist beschrieben (Glasser und Julien 1986, Glasser et al. 1987). So sind nach Applikation von hohe Dosierungen eines Antigestagens endometriale Fibroblasten nicht mehr in der Lage sich zu differenzieren. Die Beteiligung von NO an diesen Differenzierungsprozessen in der Frühgravidität war bislang allerdings unbekannt. Der Verlust von Desmin bedeutet letztendlich eine Destabilisierung der Deziduazellen mit einer sich daraus ergebenden Beeinträchtigung der geordneten Trophoblastinvasion.

Ein weiterer zu detektierender synergistischer Effekt des NO Inhibitors in Kombination mit Onapriston sind englumige Sinusoide in der mesometralen Seite der Dezidua, die anhand des Endothelmarkers CD-90 nachgewiesen wurden. Durch diese sehr englumigen Sinusoide könnte die Ernährung des Embryos, die zu diesem Zeitpunkt noch histiotroph erfolgt zum späteren Zeitpunkt der Gravidität beeinträchtigt werden. Auch eine Beeinträchtigung der Plazentaentwicklung durch diese englumigen Gefäße ist möglich.

Um eine Beteiligung von Signalkaskaden an dem gestörten Dezidualisierungsprozess und der Gefäßentwicklung, die durch Applikation des iNOS Inhibitor in Kombination mit dem Antigestagen ausgelöst wurde, zu untersuchen, sind verschiedene Signaltransduktionsmarker auf ihre veränderte Expression in der Dezidua, in den Gefäßen und in den Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus detektiert worden.

Der erste Marker der auf Veränderungen im Expressionsmuster in der Dezidua untersucht wurde, war die Cyclooxygenase II (COX II). COX II wird oft in proinflammatorischen Prozessen mit iNOS zusammen induziert und exprimiert. Die Expression der beiden Enzyme kann durch dieselben Zytokine wie z.B. das Interleukin-1 erfolgen. Es ist bekannt das COX II aber nicht COX I eine wichtige Rolle im Implantationsprozess und in der Dezidualreaktion spielt. COX II knockout Mäuse zeigen eine verzögerte Implantation und eine Störung des Dezidualisierungsprozesses (Lim et al. 1997).

So wurde am Tag 9 p.c. eine hohe COX II Expression in den Deziduazellen im Bereich der „junctional zone“ in der die Sinusoide ausgebildet nachgewiesen. Sowohl in der Einzelapplikation mit dem iNOS Inhibitor Aminoguanidin als auch mit Onapriston wurde diese Expression beobachtet. Nach Applikation des iNOS Inhibitors in Kombination mit dem Antigestagen ist ein fast vollständiger Verlust der COX II Expression beobachtet worden. Im Synergismus beider Substanzen hat anscheinend das Antigestagen Onapriston den Effekt des NO Inhibitors Aminoguanidin verstärkt. Die Folge ist ein Verlust der COX II Expression und damit eine drastische Abnahme der Prostaglandinsynthese im Bereich der Sinusoide.

NO ist in der Lage COX II direkt zu aktivieren um letztendlich darüber die Bildung von Prostaglandinen oder Prostazyklinen zu steuern (Salvemini et al. 1995). Prostaglandine (PG) und Prostazykline (PGI) sind mitunter für ihre vasoaktiven Eigenschaften im Endometrium bekannt. Besonders Prostazykline

(PGI) sind als starke Vasodilatoren und als Inhibitoren der Thrombozytenaggregation an inflammatorischen Prozessen beteiligt (Salvemini 1996).

Der Verlust der COX II Aktivität durch eine Abnahme des NO Spiegels und die daraus resultierende Abnahme der Prostaglandinsynthese im Bereich der Sinusoide könnte ein Grund für die englumigen Sinusoide auf der mesometralen Seite sein. Salvemini et al. (1995) konnten zeigen, dass eine Hemmung der iNOS Aktivität durch NO Inhibitoren (L-NIL, Aminoguanidin) nicht nur den NO Spiegel senkt, sondern auch dadurch direkt die Prostaglandinsynthese abnimmt. Diese Abnahme der Prostaglandinsynthese konnte durch die Gabe von NO Donoren wie Natriumnitropusside (SNP) wieder rückgängig gemacht werden. Es ist daher möglich das COX II über iNOS an der Dilatation der Sinusoide auf der mesometralen Seite der Dezidua entscheidend beteiligt ist.

Einen entscheidenden Beitrag zu den Auswirkungen des Synergismus von NO und Progesteron auf die Dezidualisierung könnte auch der Transkriptionsfaktor NFkappaB haben. Progesteron ist bekannt dafür, durch seine immunsupprimierenden Eigenschaften den Erhalt der Gravidität zu gewährleisten. Diese immunsupprimierenden Eigenschaften des Progesteron könnte unter anderem von NFkappaB vermittelt werden da der Transkriptionsfaktor NFkappaB durch Progesteron inhibiert wird (Kakkhoven et al. 1996) und zwar dadurch das Progesteron nachdem es an seinem Steroidrezeptor gebunden hat, NFkappaB hemmt und eine Translokation in den Kern verhindert wird.

Die gegenseitige Hemmung der Kofaktoren ist Folge einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen NFkappaB und den beiden Steroidrezeptoren (Kakkhoven et al. 1996). Diese hemmende Interaktion von Progesteron kann durch NO verstärkt werden (Baldwin 1996).

Durch die Applikation beider Substanzen (iNOS-Inhibitor+Antigestagen) wurde ein verändertes Expressionsmuster von NFkappaB in der Dezidua nachgewiesen. Der sonst im inaktiven Zustand im Cytoplasma lokalisierte NFkappaB Transkriptionsfaktor erfährt durch die Gabe beider Substanzen (iNOS-Inhibitor+Antigestagen) eine Translokation in den Kern (Thienel et al. 2000). Diese Translokation in den Kern könnte zur Folge haben, dass eine Anzahl von Genen aktiviert werden die sich auf den Dezidualisierungsprozess und auf den Erhalt der Gravidität hemmend auswirkt. In einigen Bereichen ist die Expression von NFkappaB – nach der Translokation – in der Dezidua nicht mehr nachweisbar. Durch den Progesteronentzug und durch den NO Inhibitor ist es denkbar, dass die Interaktion zwischen dem Progesteronrezeptor und NFkappaB aufgehoben wird und es zu einer Translokation kommen konnte. Inwieweit dieser molekulare Mechanismus tatsächlich zutrifft bleibt zu untersuchen.

Die Einzelapplikationen mit Aminoguanidin oder Onapriston zeigen keine Translokation und keinen Abbau von NFkappa B in der Dezidua.

Zum erstenmal konnte ein synergistischer Effekt von NO und Progesteron – neben dem Transkriptionsfaktor NFkappaB – auf die aktivierte diphosphorylierte MAPkinase ERK1&2 in der Dezidua nachgewiesen werden. 6 Stunden nach Applikation des iNOS Inhibitors in Kombination mit dem Antigestagen wurde ein Verlust der diphosphorylierten Form von ERK1&2 in der gesamten Dezidua beobachtet (Thienel et al. 2000). Dieser Verlust der diphosphorylierten Form von ERK1&2 konnte auch im Endothel und im Ektoplazentarkonus nachgewiesen werden. Erst 10 Stunden nach der letzten Applikation beider Substanzen konnte diphosphoryliertes ERK1&2 auf der mesometralen Seite der Dezidua wieder detektiert werden. In der junctional zone im Bereich der Sinusoide wurde diese aktive Form nicht reexprimiert. In diesem Bereich wurden verstärkt apoptotische Zellen nachgewiesen. In dieser Region mit ihren großen Sinusoiden scheint die Abwesenheit von ERK1&2 sich dramatischer auszuwirken.

Es liegt daher die Vermutung nahe das die Abnahme der Konzentration beider Substanzen im Blut zu einer Reaktivierung der aktivierten MAPkinase ERK1&2 auf der mesometralen Seite der Dezidua führt. Dies würde auch erklären, weshalb man die Substanzen über 3 Tage geben muss um den Dezidualisierungsprozess irreversibel zu unterbinden.

Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, das die MAPkinase ERK 1&2 synergistisch von NO und Progesteron geregelt wird, wahrscheinlich über ihren Phosphorylierungszustand. Da über die MAPkinase ERK 1&2 zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie u.a. c-fos und ELK-1 aktiviert werden ist dieser Signalweg im Bezug auf einen synergistischen Effekt als der Regulierende einzustufen.

Es bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten, welche Signalkaskaden entscheidend an dem synergistischen Effekt beteiligt sind.

6 Zusammenfassung

Nach der Fertilisation ist die Implantation der Blastocyste in das Endometrium eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft. Progesteron, das schwangerschaftserhaltende maternale Steroidhormon, kontrolliert nicht nur die Transformation des Endometriums in die rezep tive Phase und ermöglicht damit der Blastocyste zu implantieren, sondern ist auch verantwortlich für die Transformation der endometrialen Fibroblasten in Deziduazellen. Das kompakte Deziduagewebe ist auch an der Kontrolle der Invasion der Trophoblastzellen beteiligt, die letztendlich für die Entstehung eines feto-maternalen Austauschorgans der Plazenta verantwortlich sind.

Unter vielen anderen Faktoren induziert der erhöhte Progesteronspiegel während und nach der Implantation eine erhöhte Expression von induzierter Nitric Oxide Synthase (iNOS) im Endometrium und führt damit zu einer Erhöhung des NO Spiegels. Welche Rolle NO vor allem während und nach der Implantation der Blastocyste zukommt ist unbekannt. Um die zellbiologischen Grundlagen der Bedeutung von iNOS zu erarbeiten und seine mögliche Interaktion mit Progesteron zu evaluieren wurden im Rahmen der Promotionsarbeit gravide Ratten in der Präimplantationsphase (d1-d4 p.c.), Periimplantationsphase (d5-d8) und in der Postimplantationsphase (d7-d10 p.c.) mit jeweils dem iNOS Inhibitor (Aminoguanidin) und dem Antigestagen (Onapriston) sowohl in der Einzelapplikation, als auch in der Kombination behandelt.

Die Applikation der Einzeldosierungen in der Präimplantationsphase führte bei Aminoguanidin (iNOS Inhibitor) zu keinem und bei Onapriston (Antigestagen) zu einem geringen Effekt auf die Implantationsrate. Bei allen Tieren hingegen, die in der Kombination behandelt wurden, zeigte sich eine drastische Erhöhung des Onapriston Effektes durch den iNOS Inhibitor der zu einer vollständigen Hemmung der Gravidität führte. Diese drastische Auswirkung auf die Gravidität

ist auf einen Effekt auf die Präimplantationsembryonen zurückzuführen. Im Synergismus der beiden Substanzen entwickeln sich nur vereinzelt Blastocysten die zudem morphologisch verändert aussehen.

In der Peri- als auch in der Postimplantationsphase zeigte ebenfalls der iNOS Inhibitor keinen und das Antigestagen nur einen marginalen Effekt auf den Erhalt der Gravidität. Die Kombination beider Substanzen führte sowohl in der Peri- als auch in der Postimplantationsphase zu einem Synergismus, der allerdings nur nach Applikation in der Postimplantationsphase von d7-d9 p.c. zu einer vollständigen Hemmung der Gravidität führte. Diese Hemmung resultiert in einer Störung des Dezidualisierungsprozesses, bei dem sowohl die Differenzierungsvorgänge betroffen waren, als auch Markergene von Signalkaskaden der Deziduazellen verändert wurden.

So zeigte sich ein gestörtes Expressionmuster des Differenzierungsmarkers Desmin, der nicht mehr in allen Deziduazellen vorhanden war. Zusätzlich wurde eine Beeinträchtigung der Sinusiodausbildung in der „junctionalen zone“ und in der mesometralen Seite nachgewiesen, die Sinusoide bleiben englumig. Zu einem späteren Zeitpunkt lässt sich in der „junctionalen zone“ zusätzlich ein Proliferationsstopp, und apoptotische Zellen nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass dieser Bereich der Dezidua besonders sensibel auf die Kombination beider Substanzen reagiert.

Die Applikation des iNOS Inhibitors in Kombination mit dem Antigestagen führt während der Dezidualisierung zu einer veränderten Expression von COX II und NFkappa B als auch der aktivierten MAPkinase ERK1&2. Die Einzeldosierungen zeigen hingegen keine Auswirkungen auf diese Signaltransduktionsmarker.

Der Verlust von COX II nach Applikation beider Substanzen im Bereich der „junctionalen zone“ deutet auf eine Beteiligung der Prostaglandine bei der Dilatation der dezidualen Gefäße hin. Unter der synergistischen Wirkung der Substanzen kommt es in den Deziduazellen zu einer Translokation des Transkriptionsfaktor NFkappaB in den Kern mit folgendem Abbau. Die aktivierte MAPkinase ERK1&2 konnte nach Gabe der Substanzen in der gesamten Dezidua nicht mehr nachgewiesen werden, wird aber bei abnehmender Wirkkonzentration beider Substanzen auf der mesometralen Seite reexprimiert. Die Reexpression des aktivierten diphosphorylierten ERK1&2 weist auf eine direkte Beteiligung von NO und Progesterons an der Aktivierung des MAPkinase Signalweges in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanzen im Blut hin. Wie der Einsatz des iNOS-Inhibitors und des Antigestagens aufgezeigt haben, liegt der synergistische Effekt von NO und Progesteron in der Induzierung und Aufrechterhaltung von verstärkten Phosphorylierungsvorgängen, die für die Differenzierungskaskaden der Fibroblasten in Deziduazellen erforderlich sind.

7 Literaturverzeichnis

Ahokas R A, Sibai B M (1992) Endothelium-derived relaxing factor inhibition augments vascular angiotensin II reactivity in the pregnant rat hind limb. *Am J Ob Gyn* 167: 1053–1058.

Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield R E (1997) Changes in expression of nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 3: 995-1003.

Baldwin A S (1996) The NFkappaB and IkappaB proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 14: 649-681

Bany B M, Kennedy T G (1999) Role of interleukin 1 in the regulation of cyclooxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells. *J Reprod Fertil* Jan 115(1): 125- 131.

Barroso R P, Osuampke C, Nagamani M, Yallampalli C (1998) Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Mol Hum Reprod* 4 (5): 503-507.

Bart van der Burg and Van der Saag P T (1996) Nuclear factor kappa B / steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti- inflammatory action of steroids in reproductive organs. *Mol Hum Reprod* 2 (6): 433-438.

Beato M, Herrlich P, and Schütz G (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search for a plot. *Cell* 83: 851-857.

Beck K F, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Meßmer U K, Mühl, Pfeilschifter J P (1999) Inducible NO Synthase: Role in cellular signalling (Review):. *J Exp Biol* 202: 645-653.

Beier H M (1975) Uteroglobin and related biochemical changes in the reproductive tract during early pregnancy in the rabbit. *J Reprod Fertil (Suppl)* 25: 53-69.

Beier H M, Hegele-Hartung C, Mootz U, Beier Hellwig K (1994) Modification of endometrial cell biology using progesterone antagonists to manipulate the implantation window. *Hum Reprod* 9 (suppl. 1), 98-115.

Beier-Hellwig K, Sterzik K, Bonn B, Hilmes U, Bygdeman M, Gemzell-Danielsson K, Beier H M (1994) Hormone regulation and hormone antagonist effects on protein pattern of human endometrial secretion during receptivity. In Bulletti C, Gorpide E, Flamigni C (eds) *The human endometrium*. *Ann NY Acad Sci* 734: 143-157.

Bhatt H, Brunet L J, Stewart C L (1991) Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 11408-11412.

Bischoff P, Campana A (1996) A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum Reprod Update* 2: 262-270.

Biswas S, Kabir S N, Pal A K (1998) The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fertil* 114: 157-161.

Blumer K J, Johnson G L (1994) „Diversity in function and regulation of MAPkinase pathways“. *Trends Biochem. Sci* 19: 236-240.

Boughton-Smith N K, Tinker A C (1998) Inhibitors of nitric oxide synthase in inflammatory arthritis. *Drugs* 1(3): 321-333.

Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield R E (1996) Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reprod* 11: 1755-1766.

Callsen D, Pfeilschifter J and Brüne B (1998) Rapid and delayed p42/p44 MAPK activation by nitric oxide: the role of cGMP and tyrosine phosphatase inhibition. *J Immunol* 161: 4825-4858.

Carlone L D, Rider V (1993) Embryonic Modulation of Basic Fibroblast Growth Factor in the Rat Uterus. *Biol Reprod* 49:653-665.

Chard T (1995) Cytokines in implantation. *Hum Reprod Update* 1: 385-396.

Christofferson R H, Nilsson B O (1988) Morphology of the endometrial microvasculature during early placentation in the rat. *Cell Tissue Res* 253: 209-220.

Chwalisz K, Buhimschi I, Garfield R E (1996) Role of nitric oxide in obstetrics. *Prenat Neonat Med* 1: 292-329.

Chwalisz K, Ciesla I, Garfield R E (1994) Inhibition of nitric oxide (NO) synthesis induces preterm parturition and preeclampsia-like conditions in guinea pigs. *Soc Gynecol Invest* 36. Abstr. 104, 41 st Annual Meeting

Chwalisz K, Gemperlein I, Puri CP, Shao-Qing S, Knauthe R (1997) Endometrial contraception with progesterone antagonists: An experimental approach. In Beier HM, Harper, MJK, Chwalisz K (eds); Ernst Schering Research Foundation Workshop 18, Springer Verlag, pp: 223-259.

Chwalisz K, Gemperlein, Puri C P, Shao-Qing S, Knauthe R (1997) Endometrial Contraception with Progesterone Antagonists: An Experimental Approach. In: *The Endometrium is a target for contraception*. Ernst Schering Research Foundation Workshop 18. Springer Verlag Berlin. pp 223-252.

Chwalisz K, Stöckemann K, Fuhrmann U, Fritzemeier K H, Einspanier A, and Garfield R E (1994) Mechanism of action of antiprogestins in the pregnant uterus. *Ann NY Acad Sci* 203-222.

Chwalisz K, Winterhager E, Thienel T, Garfield R E (1999) Synergistic role of nitric oxide and progesterone during the establishment of pregnancy in the rat. *Hum Reprod* 14 (2): 542-552.

Conrad K P, Joffe G M, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle L G, Smith, R P, Chavez J E, Mosher M D (1993) Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB* 7: 566-571.

Corbett A, Tilton R G, Chang K, Hasan K S, Ido Y, Wang J L, Sweetland M A, Lancaster J R, Williamson J R, Mc Daniel M L (1992) Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41: 523-556.

Corbett J A, Kwon G, Turk J, Mc Daniel ML (1993) IL-1 induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islet of langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochem* 32: 13767-13770.

Cullingford RW, Pollard J W (1988) RU 486 completely inhibits the action of progesterone on cell proliferation in the mouse uterus. *J Reprod Fertil.* 83: 909-914.

D`Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner R L (1995) Activation of mitogen activated protein kinase by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-k-DA N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6374-6378.

De Vera M E, Shapiro R A, Nussler A K, Mudgett J S, Simmons R L, Morris S M, Biliar T R, Geller D A (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS 2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1054-1059.

Denker H W (1990) Trophoblast-endometrial interaction at embryo implantation: a cell biological paradox. Trophoblast research Vol 4. New York/London pp. 3-29.

Denker H W (1993) Implantation: a cell biological paradox. J Exp. Zool. 266: 541-558.

Dong Y L, Fang L, Gangula P R R, Yallampalli C (1998) Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Messenger Ribonucleic Acid Expression in Pregnant Rat Uterus. Biol Reprod 59: 933-940

Enders A C (1972) Mechanisms of implantation of the blastocyst. In: Biology of Reproduction. Basic and clinical studies III. Pan American Congress of Anatomy, New Orleans, pp. 331-334.

Enders A C (1991) Current topic: structural responses of the primate endometrium to implantation . Placenta Jul-Aug 12 (4) : 309-325.

Enders A C, Schlafke S (1967) A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am J Anat. 120: 185-226.

Fasleabas A T, Verhage H G (1994) Expression and regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and retinol binding protein in the baboon (*Papio anubis*) uterus. In: Glasser S R, Mulholland J, Psychoyos A (eds) Endocrinology of embryo-endometrium interactions. Plenum. New York, pp 57-75.

Finn C A, Martin L (1974) The control of implantation. J Reprod Fertil 39: 195-206.

Fliss A E, Michel F J, Chen C L, Höfig A, Bazer F W, Chou J Y, Simmen R C M (1991) Regulation of the uteroferrin gene promoter in endometrial cells: interaction among estrogen, progesterone, and prolactin. Endocrinol 129: 697-704.

Folkmann J, Shing Y (1992) Angiogenesis. J Biol Chem 267: 10931-10934.

Frey A, Reif A, Zabel U, Schmidt H (1998) NO: 10 Jahre. Biospektrum 2: 27-31.

Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Nishigaki M, Tamaya T (1994) Tissue differences in the expression of mRNAs of Ha-ras, c-myc, fos and jun in human uterine endometrium, myometrium and leiomyoma under the influence of estrogen/progesterone. *Tumour Biol* 15 (6): 311-317.

Furfine E S, Harmon M F, Paith J E, Garvey E P (1993) Selective Inhibition of constitutive nitric oxide synthase by NG-nitroarginine. *Biochemistry* 32: 8512-8517.

Geller D A, Lowenstein C J, Shapiro R A, Nussler A K, Di S M, Wang S C, Nakayama D K, Simmons R L, Snyder S H, Billiar T R (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 3491-3495.

Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine contains heme and copper. *FEBS Lett* 132: 71-74.

Glasser S R, Lampelo S, Munir M I, and Julien J A (1987) Expression of Desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. *Different* 35: 132-142.

Glasser (1985) Laboratory models of implantation. In: *Reprod Toxicol*. Raven press, New York pp. 311-345.

Glasser S R (1972) The uterine environment in implantation and decidualization. In : *Reprod Biol. Excerpta medica*, Amsterdam, pp. 127-154.

Glasser S R, Clark J H (1975) A determinant role for progesterone in the development of uterine sensitivity to decidualization and ovo-implantation. In: *The Developmental Biology of Reproduction*. Markert C L and Papaconstantinou, eds. Academic press, New York, pp. 311-345.

Glasser S R, Julian J, Munir Idrees M, Soares M J (1987) Biological Markers During Early Pregnancy: Peri-Implantation Period. *Environment Health Pers.* 74: 129-147.

Glasser S R, Julien J A (1986) Intermediate filament protein as a marker for uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* 35: 463-474.

Gouge R C, Marshburn P, Gordon B E, Nunley W, Huet-Hudson (1998) Nitric Oxide as Regulator of Embryonic Development. *Biol Reprod* 58: 875-879.

Greb RR, Heikinheimo O, Williams R F, Hodgen G D, Goodman A L (1997) Vascular endothelial growth factor in primate endometrium is regulated by oestrogen –receptor and progesterone-receptor ligands in vivo. *Hum Reprod* 12: (6) 1280-1292.

Grümmer R, Chwalisz K, Mulholland J, Traub O, Winterhager E (1994) Regulation of Connexin 26 and Connexin 43 Expression in Rat Endometrium by Ovarian Steroid Hormones. *Biol Reprod* 51: 1109-1116.

Grümmer R, Winterhager E (1998) Regulation of gap junctions in the endometrium during early pregnancy. *Cell Tissue Res* 293: 189-194.

Haddad E K, Duclos A J, Baines MG (1995) Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cell. *J Exp Med* 182: 1143-1151

Hall P A, Levison D A, Woods A L, Yu C C W, Kellock D B, Watkins J A (1990) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasm. *J Pathol* 162: 285- 294.

Hegele-Hartung C, Mootz U, Beier H M (1992) Luteal control of endometrial receptivity and its modification by progesterone antagonists. *Endocrinol* 131: 2446-2460.

Hibbs J B, Taintor R R, Vavrin Z (1987) Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and Imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476.

Hida A, Kawakami A, Nakashima T, Yamasaki S, Sakai H, Urayama S, Ida H, Nakamura H, Migita K, Kawabe Y, Eguchi K (2000) Nuclear factor kappaB and caspases co-operatively regulates the activation and apoptosis of human macrophages. *Immunol Apr*; 99 (4): 553-560.

Hill C S, Treisman R (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211.

Huang P L, Dawson T D, Brecht D S, Snyder S H, Fishman M C (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273-1286.

Huang P L, Huang Z, Mashimo H (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242.

Ignarro L G (1989) Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 65: 1-21.

Inoue T, Fukuo K, Nmorimoto S, Koh E, Ogihara T (1993) Nitric oxide mediates interleukin 1 induced prostaglandin E 2 production by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 194: 420-424.

Ishizu A, Ishikura H, Nakamaru Y, Kikuchi K, Koike T, Yoshiki T (1997) Interleukin-1 α Regulates Thy-1 Expression on Rat Vascular Endothelial Cells. *Micro Res* 53: 73-78.

Izumi H, Yallampalli C, Garfield R E (1993) Gestational changes in L-arginine induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1327-1337.

-
- Kalkhoven E, Wissink S, Saag van der P T, Burg van der B (1996)** Negative Interaction between the Rel A (p65) Subunit of NfkappaB and the Progesterone Receptor. *J Biol Chem* 271(11): 6217-6224.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gogoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D and Chambon P (1995)** Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Nature* 270: 1491-1494.
- Kaur K, Yao J, Pan X, Matthews C and Hassid A (1998)** NO decrease phosphorylation of focal adhesion proteins via reduction of Ca^{2+} in rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274: H1613-H1619.
- Kay Mc L I, Cidlowski J A (1998)** Cross Talk between Nuclear Factor-kappaB and the Steroid Hormone Receptors: Mechanisms of Mutual Antagonism. *Mol Endo* 12 (1): 45-56.
- Keinänen R, Vartiainen N, Koistinaho J (1999)** Molecular cloning and characterization of the rat inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Gene* 234: 297-305.
- Kennedy T G (1983)** Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci.* 36: 531-543.
- Kennedy T G (1985)** Prostaglandins and blastocyst implantation. *Prostaglandins Perspectives* 1: 1-3.
- Kennedy T G, Squires P M, Yee G M (1989)** Mediators involved in decidualization. In: *Blastocyst Implantation*. Yoshinaga K, ed, Adams Publishing Group Ltd, Boston, pp. 135-143.
- Kirby D R S (1965)** The invasiveness of the trophoblast, in: *The Early Conceptus, Normal and Abnormal* (W.W.Park, eds), E S Livingstone, Edinburgh, pp.68-73.

Klein-Hitpass L, Cato ACB, Henderson D, Ryffel G U (1991) Two types of antiprogestins identified by their differential action in transcriptionally active extracts from t47D cells. *Nucleic Acid Res* 19: 1227-1234.

Knowles R G, Moncada S (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Koering M J, Healy D L, Hodgen G D (1986) Morphologic response of endometrium to a progesterone receptor antagonist, RU 486, in monkeys. *Fertil Steril* 45: 280-286.

Krauss G (1997) *Biochemie der Regulation und der Signaltransduktion: das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner.* Weinheim ; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto:Wiley VCH Verlag.

Kruessel J K, Huang H Y, Wen Y, (1997) Different pattern of interleukin-1 β - (IL1 β), interleukin-1receptor antagonist-(IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I-(IL-1Rtl) mRNA expression in single preimplantation mouse embryos at various development stages. *J Reprod Immunol* 34: 103-120.

Lander H M, Jacovina A T, Davis R J, Tauras J M (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* 271 (33): 19705-9.

Lander H M, Ogiste J S, Paerce S F A, Levi R and Novogrodsky A (1995) Nitric oxide stimulated guanine nucleotide exchange on p 21 ras. *J Biol Chem* 270: 7017-7020.

Lander H M, Sehajpal P, Levine D M, Novogrodsky A (1993) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 150: 1509-1516.

Lange C A, Shen T, Horwitz K B (2000) Phosphorylation of human progesterone receptor at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci* 97 (3): 1032-7.

Lee S H, Hurwitz J (1990) Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87(5): 672-676.

Lee W S, Jain M K, Arkonac B M, Zhang D, Shaw S Y, Kashiki S, Maemura K, Lee S L, Hollenberg N K, Lee M E, Haber E (1998) Thy-1, a Novel Marker for Angiogenesis Upregulated by inflammatory Cytokines. *Circ Res* 82: 845-851.

Lia Q P, Buhimschi I A, Saade (1997) Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones. *Hum Reprod* 12: 2777-2784.

Lim H, Paria B C, Das S K (1997) Multiple female reproductive failure in cyclooxygenase 2 deficient mice. *Cell* 91: 197-208.

Mac Micking J D, Nathan C, Hom G (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81: 1273-1283.

Manning A, Rao A (1997) IKK-1 And IKK-2: Cytokine Activated IkappaB Kinases Essential for NFkappaB Activation. *Science* 278: 860-866.

Mara Suburo A, Chaud M, Franchi A (1995) Distribution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorases and nitric oxide synthases in rat uterine horns under different hormonal conditions. *Biol Reprod* 52: 631-637.

Martello E M VG, Abrahamson P A (1986) Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. *Acta Anatom* 127: 146-150.

Matrisian L (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 6: 121-125.

Matthews J R, Botting C H, Panico M, Morris H R, Hay R T (1996) Inhibition of NFkappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic acids Res* 24: 2236-2242.

Mc Call T B, Boughon-Smith N K, Palmer R M J, Whittle B R J, Moncada S (1989) Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 261: 293-296.

Miller L, Alley E W, Murphy W J, Russel S W, Hunt J S (1996) Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 59: 442-450.

Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmac Rev* 43: 109-142.

Moore W M, Webber R K, Jerome G M, Tjoeng F S, Misko T P, Currie M G (1994) L-N-(1-Iminoethyl)lysine: A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37: 3886-3888.

Nanaev A, Chwalisz K, Frank H G, Kohlen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P (1995) Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of the extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res* 282: 407-421

Nathan C and Xie O W (1994) Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918.

Neff G, Beier S, Elger W, Henderson D, Wiechert R (1984) Mew steroids with antiprogestational and antiglucocorticoid activities. *Steroids* 44: 349-372.

Ni Y, Meyer M, Osol G (1997) Gestation increases nitric oxide mediated vasodilation in rat uterine arteries. *Am J Obst Gynecol* 176: 856-864.

Niwa M, Kawai Y, Nakamura N, Futaki S (1997) The structure of the promoter region for rat inducible nitric oxide synthase gene. *Life Science* 61(5): 45-49.

Novaro V, Gonzalez E, Jawerbaum A, Rettori V, Canteros G, Gimeno M F (1997) Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reprod Fertil* 9: 557-564.

Novaro V, Rettori V, Gonzalez ET, Jawerbaum A, Faletti A, Canteros G, De Gimeno M A F (1996) Interaction between uterine PGE and PGF 2 alpha production and the nitridegic system during embryonic implantation in the rat. *Prostaglandins* 51: 363-376

Palmer R M J, Ferrige A G, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.

Parenti A, Morbidelli L, Cui L X, Douglas G J, Hood J D, Granger H J, Ledda F, Ziche M (1998) Nitric oxide Is an Upstream Signal of Vascular Endothelial Growth factor-induced Extracellular Signal –regulated Kinase 1&2 Activation in Postcapillary Endothelium. *Am Soc Biol Chem* 273: 7 (13) 4220-4226.

Paria B C, Huet-Hudson Y M, Dey S K (1993) Blastocyst state of activity determines the window of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10159-10162.

Parr E L, Tung HN, Parr M B (1987) Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 36: 211-225.

Parr M B, Parr E L (1986) Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: Studies using fluorescein-labeled proteins and dextrans. *Biol Reprod* 34: 393-403.

Parr M B, Parr E L (1989) The implantation reaction. In: *Biology of the Uterus*. Wynn R M, and Jollie W P, eds. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 233-277.

Peng H B, Rajavashisth T B, Libby P, Liao J K (1995) Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 17050-17055.

Pfeilschifter J, Huwiler A (1996) Nitric oxide stimulates stress activated protein kinases in glomerular endothelial and mesangial cell. *FEBS Lett.* 396: 67-70.

Philibert D, Deraedt R, and Teutsch G (1981) RU 38486: a potent antigluocorticoid in vivo. 8th International Congress of Pharmacology, Tokyo. Abstr. 1463.

Philibert D, Moguilewsky M, Mary M, Lecaque D, Tournemine C, Secchi J, Deraedt R (1985) Pharmacological profile of RU 486 in animals. In: Baulieu EE, Segal SJ (eds). *The antiprogestone steroid RU 486 and human fertility control*. Plenum Press, New York, pp.49-68.

Pollard J W, Hunt J S, Wiktor-Jedrzejczak W, Stanley E R (1991) A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev Biol* 148: 273-283.

Psychoyos A (1960) La reaction deciduale est precedee de modification precoces de la permeabilite capillaire de l' uterus. *C R Soc Biol* 154: 1384-1387.

Psychoyos A (1961) Permeabilite capillarie et decidualisation uterine. C R Acad Sci Paris 252: 1515-1517.

Psychoyos A (1973) Endocrine control of egg implantation. In: Handbook of physiology, Section 7 (Endocrinology) Vol II (Female Reproductive System) Part 2, RO Greep (ed), American Physiology Society, Washington DC, pp. 187-215.

Psychoyos A (1976) Hormonal control of uterine receptivity for nidation. J Reprod Biol 7: 143-157.

Psychoyos A (1986) Uterine receptivity for nidation. Ann NY Acad Sci 476: 36-42.

Psychoyos A (1995) Nidation window: from basic to clinic. In: S.K. Dey (ed.). Molecular and cellular aspects of Periimplantation Processes. Springer-Verlag, New York pp 1-14.

Purcell T L, Given R, Chwalisz K, Garfield R E (1999) Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. Mol Hum Reprod 5(5): 467-475.

Purcell T, Given R, Chwalisz K (1998) Inducible and endothelial nitric oxide synthase (iNOS and eNOS) exhibit continual increases in the uterus during the implantation and post-implantation periods. J Soc Gynecol Invest 5 (suppl.): Abstract 314.

Radomski M W, Palmer R M, Moncada S (1987) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. Biochem Biophys Res Comm. 148: 1428-1489.

Regulsky M and Tully T (1995) Molecular and biochemical characterization of eNOS: a Drosophila Ca²⁺ / calmodulin dependent nitric oxide synthase. Biochemistry 92: 9072-9076.

Rider V, Carlone D L, Foster R T (1997) Östrogen and progesterone control basic fibroblast growth factor mRNA in the rat uterus. *J Endocrinol* 154: 75-84.

Rider V, Psychoyos (1994) Inhibition of progesterone receptor function results in loss of basic fibroblast growth factor expression and stromal cell proliferation during uterine remodelling in the pregnant rat. *J Endocrinol* 140: 239-249.

Riemer R K, Buscher C, Bansai R K (1997) Increased expression of nitric oxide synthase in the myometrium of the pregnant rat uterus. *Am J Physiol* 272: E 1008-E1015.

Risau W (1998) Angiogenesis Is Coming Of Age. *Circ Res* 82: 926-928.

Robbins R A, Barnes P J, Springall D R, Warren J B, Kwon O J, Buttery L D, Wilson A J, Gellner D A, Polak J M (1994) Expression of inducible nitric oxide synthase in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 203: 209-218.

Roblero L S, Croxatto H B (1991) Effect of RU 486 on development and implantation of rat embryos. *Mol Reprod Develop* 29: 342-346.

Sakuma I, Stuehr D J, Gross S S, Nathan C, Levi R (1988) Identification of arginine as a precursor of endothelium derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8664-8667.

Salvemini D, Currie M G, Mollace V (1996) Nitric oxide mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J Clin Invest* 97: 2562-2568.

Salvemini D, Misko T P, Maferrer J (1995) Role of nitric oxide in the regulation of cyclooxygenase. In Moncada S, Feelish M, and Busse R, (eds) *Biology of Nitric Oxide* 4. Enzymology, Biochemistry and Immunology. Portland Press, London.

Salvemini D, Misko T P, Maferrier J L, Seibert K, Currie M G, Needleman P (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7240-7244.

Schlafke S, Enders A C (1975) Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod* 12: 41-65.

Seger R, Krebs E G (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735.

Seibert K, Maferrier J (1994) Role of inducible cyclooxygenase (COX II) in inflammation. *Receptor* 94: 17-23.

Sen C K, Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10: 709-720.

Sladek S M, Regenstein A C, Lykins D (1993) NO synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1285-1291.

Southan G J, Salzmann A L, Szabo C (1995) Mercaptoalkylguanidines: A novel class of inhibitors of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *FASEB J* 9: A 28.

Srivastava R K, Gu Y, Ayloo S, Zilberstein M, Gibori G (1998) Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J Mol Endocrinol* Dec; 21 (3): 355- 362.

Starck D (1975) Embryologie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Stewart C L, Kaspar P, Brunet L J, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F&S J, Abbondanzo (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359: 76-79.

Strickland S, Richards W G (1992) Invasion of the trophoblast. *Cell* 71: 355-357.

Su B, Karin M (1996) Mitogen activated protein kinase cascade and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8: 402-411.

Tabidzadeh S, Babaknia A (1995) The signal and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 10: 1579-1609.

Tabucchi A, Sano K E, Tsuchiya T, and Tsuda M (1994) Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett* 351: 123-127.

Tachi S, Tachi C, Lindner H R (1970) Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in rat. *J Reprod fertil.* 21: 37-56.

Thienel T, Chwalisz K, Winterhager E (2000) Increased Expression of the MAPkinases (ERK1&2) during rat implantation: Regulation by Progesterone and Nitric oxide. *Soc Gynecol Invest Vol 7, No 1 .Abstr. 599, 47st Annual Meeting Chicago.*

Thienel T, Chwalisz K, Winterhager E (2000) NFkappaB is Upregulated during Decidualization and Correlates with Differentiation Markers. *Soc Gynecol Invest Vol 7 No 1.Abstr. 603, 47st Annual Meeting Chicago.*

Trachtman H, Futterweit S, Garg P (1996) Nitric oxide stimulates the activity of a 72-kDa neutral matrixmetalloproteinase in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 218: 704-708.

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2: 997-1000.

Waseem N H, Lane D P (1990) Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96:121-129.

Weiner A, Lyszasoain I, Baylis S A, Knowles R G, Charles I G (1994) Induction of calcium dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5212- 5216.

Welsh A O, Enders A C (1991) Chorioallantoic Placenta Formation in the Rat:II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *Am J Anat* 192:347-365.

Wilcox A J, Weinberg C R, O` Connor J F (1988) Incidence of early pregnancy loss. *N Engl J Med* 319: 189-194.

Winterhager E, Stutenkemper R, Traub O, Beyer E, and Willecke K (1991) Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization at term. *Eur J Cell Biol* 55: 133-142.

Wolff D J, Lubeskie A (1995) Aminoguanidine is an isoform selective, mechanism based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 316: 290-301.

Wu H M, Huang Q, Yuan Y, Granger H J (1996) VEGF induces NO dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol.* 271: H2735-H2739.

Wu K K (1995) Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 33: 179-207.

Yun H Y, Gonzalez-Zulueta, Dawson V L, Dawson T M (1998) Nitric oxide mediates N-methyl-D- aspartate receptor induced activation of p 21 ras. *Neurobiol* 95: 5773-5778.

Zhang S, Funk C, Glasser S R, Mulholland J (1994) Progesterone regulation of heparin-binding epidermal growth factor- like growth factor gene expression during sensitization and decidualization in the rat uterus: Effects of the Antiprogestin, ZK 98.299. *Endocrinol* 135 (3):1256-1263.

Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang H T, Donnini S, Granger H J, Bicknell R (1997) Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor –induced angiogenesis. *J Clin Invest* Jun 1; 99 (11): 2625-2634.

Zorn T M T, Bevilacqua E M A F, Abrahamson P A (1986) Collagen remodeling during decidualization in the mouse. *Cell Tissue Res* 244: 443-448.

8 Anhang

8.1 Chemikalien

Hersteller:

Aether	(Hoechst AG, Nürnberg)
Benzylbenzoat	(Riedel de Haen AG, Seelze)
Bovine Serum Albumin Fraction V	(Sigma)
DAB Konzentrat	(DAKO)
Formaldehyd	(Merck)
Glycerin	(Sigma)
H ₂ O ₂	(Sigma)
HCL (Salzsäure)	(Merck)
NaCl	(Merck)
NaOH	(Merck)
Phosphatpuffer	(Gibco)
Proteinase K	(DAKO)
Rizinusöl (nach DAB 10)	(Schering AG, Berlin)
Schafsserum	(Sigma)
Ziegenserum	(Sigma)

8.2 Tabellen

Tabelle 3 (1Teil) (Experiment 1)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung auf die Implantationsrate (AutopsieTag 9 p.c.) nach Applikation in der Präimplantationsphase (d1-d4 p.c.).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Gesamtgewicht Ovarien (mg)	Implantationsstellen je Ratte
		d1 p.c.	d9 p.c.			
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	196,3	233,7	689,5	66	13
2		197,8	228,1	686,3	69,7	11
3		196,7	223,8	639,6	64,1	11
4		199,3	236,2	856,7	98,2	14
5		196,8	239,4	683,2	75,6	12
6		197,2	226,8	598,3	65,4	10
(n=6)						Gesamtanzahl 71
7	Aminoguanidin (120 mg/ml) + B/R (1+4) (0,2 ml s.c.)	191,5	216,9	521,3	68	9
8		193,7	204,6	523,3	64	9
9		204,1	233	404,4	68,1	4
10		194,1	219,8	682,1	68,8	13
11		192,1	195,7	451,4	63,6	11
12		197,1	224	724,1	80,1	13
(n=6)						Gesamtanzahl 59

Tabelle 3 (2Teil) (Experiment 1)

Auswirkungen von Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung und von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Implantationsrate (AutopsieTag 9 p.c.) nach Applikation in der Präimplantationsphase (d1-d4 p.c.).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Gesamtgewicht Ovarien (mg)	Implantationsstellen pro Ratte
		d1 p.c.	d9 p.c.			
13	Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.) + M/NaCl (1 ml)	205,1	231,1	316,1	67,6	4
14		190	213,2	268,2	65,8	4
15		194,8	220,2	379,9	71,9	4
16		193,5	218,4	432,8	67	8
17		191,8	222,0	278,3	84,2	4
18		198,6	220,3	407,8	74,7	8
(n=6)						Gesamtanzahl 32
19	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	194,2	221,9	247,8	87,4	0
20		191,9	217,8	314,0	64,3	0
21		193,5	203,7	256,6	93,0	0
22		206,8	226,0	229,3	75,2	0
23		194,1	216,0	288,8	81,5	0
24		192,8	190,7	264,2	66,5	0
(n=6)						Gesamtanzahl 0

Tabelle 4 (Experiment 2)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination nach Applikation in der Präimplantationsphase (d1-d4 p.c.) und nachfolgender Pontamin blue Färbung mit Autopsie am Tag 6 p.c.

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Gesamtgewicht Ovarien (mg)	Anzahl der Implantationsstellen nach Pontamin blue Färbung (Gefäßerweiterung)
		d1 p.c.	d6 p.c.	d6 p.c.	d6 p.c.	
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	215	226	416,2	79,2	10
2		213,4	224,4	432,9	55,9	12
3		212,6	225,1	408,3	59,1	9
4		210,6	227,8	370,4	77	14
5		200,4	212,6	335,6	68,4	8
6		207,1	223	458,8	57,4	13
7		202,1	216,8	324,1	80,5	9
8		207,3	223,6	329,1	69,2	10
(n=8)						Gesamtanzahl 85
9	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	194,5	210	286,8	76,2	3
10		205,1	209,5	284,9	92,1	3
11		202,3	180	197,9	79,2	0
12		218,1	219,9	285,8	84,0	1
13		204,0	211,1	254,7	77,7	3
14		194,6	198,4	261,6	88,5	2
15		204,6	210	234,9	76,4	2
16		204,8	222,3	355,7	81,4	3
(n=8)						Gesamtanzahl 17

Tabelle 5 (1Teil) (Experiment 3)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Anzahl der Embryonen nach Applikation in der Präimplantationsphase (d1, d1+d2) und nachfolgender Tubenspülung und/oder Uterusspülung (d2, d3).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Anzahl der Embryonen	Gesamtgewicht der Ratten in g		Anzahl der Embryonen
		d1 p.c.	d2 p.c.	d2 p.c.	d1 p.c.	d3 p.c.	d3 p.c.
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.) (n=6)	199	201	10	195	200,5	9
2		210	211	8	200	207	7
3		195	197	12	197	204	13
4		202	204	11	204	210	11
5		200,4	203	10	199	207	10
6		196	199,5	6	199	205,5	11
				Gesamtanzahl 57			Gesamtanzahl 61
7	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.) (n=6)	195	195,4	10	203	204	9
8		197	200	5	198	201	4
9		201	199	6	199	205	8
10		200	202	9	196	204	10
11		196	197	11	197	205	8
12		203	203,5	6	204	210	7
				Gesamtanzahl 47			Gesamtanzahl 46

Tabelle 5 (2Teil) (Experiment 3)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Anzahl der Embryonen nach Applikation in der Präimplantationsphase (d1-d3, d1-d4) und nachfolgender Tubenspülung und/oder Uteruspülung (d4, d5).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Anzahl der Embryonen (Morula Stadium) d4 p.c.	Gesamtgewicht der Ratten in g		Anzahl der Embryonen (Blastocysten) d5 p.c.
		d1 p.c.	d4 p.c.		d1 p.c.	d5 p.c.	
13	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	212,6	223,8	8	205,7	225	4
14		195,9	212,3	10	210,2	226	4
15		202,8	218,2	9	196,2	221,7	10
16		202,0	212,4	11	202,8	221,7	7
17		195,4	219,5	4	202,7	220,8	12
18		192,9	214,9	11	208,7	227,8	13
19		205,6	219,9	10	196,7	219,4	10
20		216,3	229,3	11	206,8	215,5	8
(n=8)				Gesamtanzahl 74			Gesamtanzahl 68
21	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	199,6	187,1	1	213,6	217,5	2
22		195,9	214,8	4	200,4	205,9	0
23		213,7	218,5	1	200,8	204	0
24		210,4	227,0	0	197,5	215,6	1
25		201,9	210,1	3	202,5	211,2	0
26		195,4	204,4	5	202,5	212,7	0
27		209,9	178,9	6	199,5	200,1	0
28		202,6	211,6	5	211,1	220,9	0
(n=8)				Gesamtanzahl 25			Gesamtanzahl 3

Tabelle 6 (1Teil) (Experiment 4)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung auf die Implantationsrate (AutopsieTag 9 p.c.) nach Applikation in der Implantationsphase (d5-d8 p.c.).

Tier Nummer:	Applizierte Substanzen (Dosis):	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Anzahl der Implantationsstellen
		d1 p.c.	d9 p.c.	d9 p.c.	d9 p.c.
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	204,2	223,2	325,7 (krank)	1
2		201,1	225,8	764,4	14
3		208,5	228,1	699,6	11
4		205,3	254,4	748,2	12
5		197,2	214,7	619,9	9
6		194,6	214,4	525,9	7
7		213,6	248,7	767,3	12
(n=7)					Gesamtanzahl 66
8	Aminoguanidin (120 mg/ml) + B/R (1+4) (0,2 ml s.c.)	196,1	217,7	681,8	11
9		204,1	229	krank	0
10		199,3	224,8	645,8	12
11		195,3	211,6	403,9	4
12		206	241,8	449,4	7
13		201,9	227,7	584,2	12
14		194,2	223,5	608,9	12
(n=7)					Gesamtanzahl 58

Tabelle 6 (2Teil) (Experiment 4)

Kontrolle; Auswirkungen von Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung und von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Implantationsrate (AutopsieTag 9 p.c.) nach Applikation in der Implantationsphase (d5-d8 p.c.).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Anzahl der Implantationsstellen
		d1 p.c.	d9 p.c.	d9 p.c.	d9 p.c.
15	Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.) + M/NaCl (1 ml)	194,9	227	538,5	9
16		207,8	229,0	693,6	13
17		195,5	222,1	599,7	11
18		206,8	235,2	563,4	11
19		210,6	239,2	425,9	9
20		207,8	227,1	369,4	3
21		201,5	224	582,6	13
(n=7)					Gesamtanzahl 69
				alle pathologisch	
22	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	207,6	228,5	691,2	12
23		206,2	241	470,0	2
24		205,4	226,8	666,2	12
25		199,5	223	541,2	11
26		196,8	212	367,9	6
27		205	211,4	401,2	8
28		209,9	223,9	589,5	11
(n=7)					Gesamtanzahl 62

Tabelle 7 (1Teil) (Experiment 5)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung auf die Implantationsrate (AutopsieTag 11 p.c.) nach Applikation in der Postimplantationsphase (d7-d10 p.c.).

Tier Nummer:	Applizierte Substanzen (Dosis):	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Anzahl der Implantationsstellen
		d1 p.c.	d11 p.c.	d11 p.c.	d11 p.c.
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	194,1	228,7	775	7
2		218,5	239,7	1167	12
3		208,1	229,6	983	7
4		207,3	222,6	1390	11
5		213,8	239,4	1380	9
6		197,6	234,7	1170	11
7		210,8	227,2	1140	12
8		202	226	660	5
(n=8)					Gesamtanzahl 74
9	Aminoguanidin (120 mg/ml) + B/R (1+4) (0,2 ml s.c.)	205,5	209,1	939	10
10		212,1	222,3	937	11
11		209,9	231,5	1464	13
12		218,1	233,1	1295	13
13		203,8	226	1110	12
14		219,9	235,1	840	8
15		195,8	221	650	4
16		214,6	242,1	1230	9
(n=8)					Gesamtanzahl 80

Tabelle 7 (2Teil) (Experiment 5)

Effekte von Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung und von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Implantationsrate (AutopsieTag 11 p.c.) nach Applikation in der Postimplantationsphase (d7-d10 p.c.).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Gesamtgewicht der Ratten in g		Gesamtgewicht Uterus (mg)	Anzahl der Implantationsstellen
		d1 p.c.	d11 p.c.	d11 p.c.	d11 p.c.
17	Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.) + M/NaCl (1 ml)	203	239,5	1210	12
18		207,2	226,1	775	7
19		217,6	247,7	1507	13
20		215,2	247,3	1281	12
21		210,8	228,9	430	2 (pathologisch)
22		213,8	227,8	1470	13
23		204,6	202,2	940	6 (pathologisch)
24		188,8	203,9	1130	13
(n=8)					Gesamtanzahl 78
25	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	208	215,9	475	0
26		208,7	202,3	506	0
27		216,6	229,6	453	0
28		212,4	220,9	452	0
29		215,4	237,9	417	0
30		197,5	225,4	542	0
31		186,8	215,4	415	0
32		187,7	226,7	543	0
(n=8)					Gesamtanzahl 0

Tabelle 8 (1Teil) (Experiment 6-8; Austragungsversuch)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung auf die Anzahl der Foeten (AutopsieTag 19 p.c.) nach Applikation in der Implantationsphase (d5-d8 p.c.)/.Postimplantationsphase (d6/d9 p.c.)/ (d7-d10 p.c.).

Tier Nummer:	Applizierte Substanzen (Dosis):	Anzahl der Foeten	Anzahl der Foeten	Anzahl der Foeten
		d5-d8 p.c. (Experiment 6)	d6-d9 p.c. (Experiment 7)	d7-d10 p.c. (Experiment 8)
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	11	8	11
2		12	9	11
3		12	8	9
4		13	13	10
5		11	10	12
6		6	10	8
(n=6)		Gesamtanzahl 65	Gesamtanzahl 58	Gesamtanzahl 61
7	Aminoguanidin (120 mg/ml) + B/R (1+4) (0,2 ml s.c.)	4	10	10
8		13	13	8
9		11	3	12
10		9	10	4
11		13	14	13
12		11	9	9
(n=6)		Gesamtanzahl 61	Gesamtanzahl 59	Gesamtanzahl 56

Tabelle 8 (2Teil) (Experiment 6-8; Austragungsversuch)

Auswirkungen von Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Einzeldosierung und von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Anzahl der Foeten (AutopsieTag 19 p.c.) nach Applikation in der Implantationsphase (d5-d8 p.c.)/.Postimplantationsphase (d6/d9 p.c.)/ (d7-d10 p.c.).

Tier Nummer	Applizierte Substanzen (Dosis)	Anzahl der Foeten	Anzahl der Foeten	Anzahl der Foeten
		d5-d8 p.c. (Experiment 6)	d6-d9 p.c. (Experiment 7)	d7-d10 p.c. (Experiment 8)
13	Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.) + M/NaCl (1 ml)	5	nicht gravid	4
14		2	11	10
15		nicht gravid	7	10
16		10	11	6
17		7	4	11
18		13	13	11
(n=6)		Gesamtanzahl 37	Gesamtanzahl 46	Gesamtanzahl 52
19	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	10	0	0
20		2	2	0
21		0	0	0
22		13	5	0
23		14	0	0
24		5	0	0
(n=6)		Gesamtanzahl 44	Gesamtanzahl 7	Gesamtanzahl 0

Tabelle 9 (Experiment 9-13; Austragungsversuche)

Kontrolle; Auswirkungen von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag) + Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) in der Kombination auf die Anzahl der Foeten (AutopsieTag 19 p.c.) nach Applikation zu verschiedenen Tagen in der Postimplantationsphase (d8, d9, d7+d8, d8+d9, d7-d9); (*) =gleiche Kontrollgruppe.

Tier Nummer:	Applizierte Substanzen (Dosis):	Anzahl der Foeten d8* (Experiment 9)	Anzahl der Foeten d9* (Experiment10)	Anzahl der Foeten d7+d8 (Experiment 11)	Anzahl der Foeten d8+d9 (Experiment12)	Anzahl der Foeten d7-d9 (Experiment13)
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	10	10	12	9	10
2		13	13	11	13	10
3		11	11	9	11	10
4		11	11	12	12	12
(5)		-	-	8	10	11
(6)		-	-	12	8	8
(n=4/6)		Gesamtanzahl 45	Gesamtanzahl 45	Gesamtanzahl 64	Gesamtanzahl 63	Gesamtanzahl 62
5	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	13	5	9	11	0
6		7	0	11	0	0
7		9	9	0	13	0
8		11	11	9	0	0
(9)		-	-	12	7	0
(10)		-	-	5	5	0
(n=4/6)		Gesamtanzahl 40	Gesamtanzahl 25	Gesamtanzahl 46	Gesamtanzahl 35	Gesamtanzahl 0

Tabelle 10 (Experimente 14-16; Zeitreihe)

Kontrolle; Auswirkungen einer 3tägigen Applikation (d7-d9 p.c.) von Aminoguanidin (120 mg/Ratte/Tag)+ Onapriston (0,3 mg/Ratte/Tag) auf die Implantationsstellen am d9 p.c. und nachfolgender Autopsie zu unterschiedlichen Zeiten (10.00/14.00/18.00 Uhr).

Tier Nummer:	Applizierte Substanzen (Dosis):	Anzahl der Implantationsstellen (d 9 p.c. 10.00 Uhr)	Uterusgewichte in mg (d 9 p.c. 10.00 Uhr)	Anzahl der Implantationsstellen (d 9 p.c. 14.00 Uhr)	Uterusgewichte in mg (d 9 p.c. 14.00 Uhr)	Anzahl der Implantationsstellen (d 9 p.c. 18.00 Uhr)	Uterusgewichte in mg (d 9 p.c. 18.00 Uhr)
1	Kontrolle M/NaCl (1 ml p.o.) + B/R (1+4) (0,2ml s.c.)	9	555	14	802	12	1051
2		11	661	14	839	10	1044
3		4	504	13	717	10	959
4		11	733	12	658	12	953
(n=4)		Gesamtanzahl 35		Gesamtanzahl 53		Gesamtanzahl 44	
5	Aminoguanidin (120 mg/ml) + Onapriston (0,3mg/0,2ml s.c.)	14 (pathologisch)	702	13	761	10 (pathologisch)	629
6		13	685	12	693	13 (pathologisch)	681
7		10	658	13	717	13 (pathologisch)	649
8		9	641	11	505	14 (pathologisch)	641
(n=4)			Gesamtanzahl 46		Gesamtanzahl 49		Gesamtanzahl 50

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. E. Winterhager für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ständige Gesprächsbereitschaft mit zahlreichen Diskussionsrunden und für die vorbildliche Betreuung der Arbeit.

Für die Anregung der Thematik und für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung der zahlreichen Experimente bei der Schering AG in Berlin bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn PD. Dr. K. Chwalisz.

Mein allergrößter Dank bei der Schering AG gilt Frau Bärbel Bragulla für die Unterstützung bei den Tierexperimenten und für die außergewöhnlich gute Zusammenarbeit in einem freundschaftlichen Umfeld.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. E. Schillinger für das Schering-Stipendium.

Für die zahlreichen Arbeiten am PC nicht nur zur Fertigstellung dieser Arbeit, sondern auch zur Präsentation von Vorträgen und mehreren Postern möchte ich mich recht herzlich bei Dave Kittel und bei der Mannschaft des Zentralen Fotolabors bedanken. Mein Dank gilt auch Frau U. Tlolka für die über Jahre gute Zusammenarbeit im histologischen Labor. Einen herzlichen Dank auch an allen Mitarbeitern für die gute Atmosphäre und für das geduldige Zuhören bei meinen Vorträgen am Institut für Anatomie.

Ein Dankeschön auch an meinen Freund Heiko Trabhardt für die Fertigstellung der Dissertation am PC.

Das größte Dankeschön möchte ich aber an meine Frau Stephanie richten. Ohne ihre finanzielle und moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten wäre nicht nur mein Biologiestudium, sondern auch die Fertigstellung dieser Dissertation undenkbar gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanken die mir bei der Bewältigung alltäglicher Probleme, die im Zusammenhang mit dieser Dissertation stehen, geholfen haben.

Als letztes möchte ich mich auch bei meinem Freund Herrn Marcus Blum bedanken, der die ganzen Jahre über ein offenes Ohr für die alltäglichen Probleme eines Doktoranden hatte.

Lebenslauf

Name Thomas Thienel
Geburtsdatum 28. Mai 1966 in Dortmund
Familienstand verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1972-1976 Besuch der Kautsky-grundschule, Dortmund
1972-1977 Besuch der Gesamtschule Dortmund,
Abschluß:Abitur

Zivildienst

01/1986-08/1987 Zivildienst in der St. Martin-Gemeinde

Hochschulausbildung

09/1990-03/1997 Studium der Biologie an der Ruhr Universität
Bochum

Thema der Diplomarbeit:
„Licht- und Elektronen mikroskopische
Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von
Ceratomyxa sp.Thelohan, 1892 bei der Kliesche
(Limanda Limanda)“

04/1997-06/2000 Dissertationsarbeit am Institut für Anatomie (Prof. Dr.
Winterhager) des Universitätsklinikums Essen in
Kooperation mit der Schering AG, Berlin (Stipendium
der Schering AG)

Thema der Arbeit:
„Synergistische Effekte von NO und Progesteron auf
die Differenzierung des Endometriums zum Zeitpunkt
der Implantation“

Dortmund, 08 Juni 2000

Thomas Thienel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr, 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer.nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Synergistische Effekte von NO und Progesteron auf die Differenzierung des Endometriums zum Zeitpunkt der Implantation“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Thienel befürworte.

Essen den 08.06.2000

Prof. Dr. Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr, 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer.nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen den 08.06.2000

Thomas Thienel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr, 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer.nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen den 08.06.2000

Thomas Thienel