

**Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

# **Plazentare Steroide beim Rind**

**Biosynthese und Beziehungen zu Wachstum  
und Differenzierung der Plazentome**

Habilitationsschrift  
vorgelegt dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

von  
Dr. med. vet. Gerhard Schuler  
aus Otterstadt

Giessen 2000

**Diese Arbeit wurde mit Sachmittelbeihilfen durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die Ewald und Hilde Berge-Stiftung sowie die Kogge-Stiftung unterstützt.**

**Die Drucklegung dieser Habilitationsschrift wurde von der Ewald und Hilde Berge-Stiftung gefördert.**

## Vorwort

Die Plazenta stellt ein temporäres Organ dar, dessen intakte Funktion bei den Säugern Voraussetzung für die Etablierung, Aufrechterhaltung und erfolgreiche Beendigung einer Gravidität ist. Unbeschadet dieser einheitlichen, speziesübergreifenden Aufgabe hat die Evolution seit der „Erfindung“ des Prinzips „Plazenta“ bei den verschiedenen Spezies z.T. erhebliche Unterschiede hervorgebracht, welche sich sowohl in der Struktur als auch, soweit untersucht, hinsichtlich der placentaren Funktionen manifestieren (Übersichten siehe bei MOSSMAN, 1987; TALAMANTES und OGREN, 1988; LEISER und KAUFMANN, 1994<sup>1</sup>). Letzteres trifft in besonderem Maße auf die Rolle der Plazenta als Quelle und Zielorgan endo-, para-, juxta- und autokrin aktiver Substanzen zu. Eine bedeutende und phylogenetisch sehr alte Gruppe von Mediatoren, deren Bildung in der Plazenta vieler, jedoch nicht aller untersuchten Spezies nachgewiesen werden konnte, stellen die Steroidhormone dar. Die Plazenta des Rindes produziert erhebliche Mengen an Östrogenen, deren Konzentrationen im peripheren maternalen Blut im mittleren und letzten Trimester der Gravidität die Plasmaspiegel von Tieren im Östrus - der Phase des Reproduktionszyklus, in welcher der weibliche Genitaltrakt stark von der Wirkung follikulärer Östrogene geprägt ist - um den Faktor 100-1000 übersteigen (HOFFMANN et al., 1997). Allerdings handelt es sich mit Ausnahme der letzten 2-3 Graviditätswochen überwiegend um konjugierte, also am klassischen Östrogenrezeptor inaktive Östrogene. Weitere Besonderheiten der placentaren gegenüber der follikulären Östrogensynthese sind die lange Dauer der Anwesenheit sowie das gleichzeitige Vorhandensein von Progesteron in hohen Konzentrationen. Die biologische Bedeutung dieser „brunstaustlösenden“ Hormone beim graviden Rind war bisher weitgehend unklar. Allenfalls den gegen Ende der Gravidität verstärkt auftretenden freien Östrogenen wurden Funktionen im Rahmen der Vorbereitungen der weichen Geburtswege auf die mechanischen Belastungen unter der Geburt sowie der Milchdrüse auf die Versorgung des neugeborenen Kalbes zugeordnet, ohne daß die zugrundeliegenden Ereignisse auf molekularbiologischer Ebene näher charakterisiert wurden. Ebenso konnte eine häufig unterstellte physiologische Bedeutung placentarer Östrogene für die „Plazentareifung“ und den termingerechten Nachgeburtsabgang nicht zweifelsfrei belegt werden. Ähnlich rätselhaft ist die Bedeutung der placentaren Progesteronproduktion. Anders als beim Schaf, dessen Plazenta etwa ab der Mitte der Gravidität die Rolle der Hauptprogesteronquelle übernimmt (CASIDA und WARWICK, 1945; DENAMUR und MARTINET, 1955; RICKETTS und FLINT, 1980), trägt die Rinderplazenta, die lediglich temporär im Zeitraum zwischen dem ca. 180.-240. Graviditätstag eine experimentelle Ausschaltung der Lutealfunktion kompensieren kann (MAC DONALD et al., 1953; ESTERGREEN et al., 1967; CHEW et al., 1979; LAURENDALE, 1975; DAY, 1977; HOFFMANN et al., 1979; JOHNSON et al., 1981), nur marginal zum peripheren maternalen Progesteronspiegel bei (CHEW et al., 1979).

---

<sup>1</sup> Literatur s. Kapitel I

Noch weniger als zur Charakterisierung der Bildung plazentarer Steroide wurden beim Rind Anstrengungen bezüglich der Identifizierung möglicher Zielorgane sowie hinsichtlich der biologischen Funktionen unternommen. Über spezielle Zielorgane der placentaren Östrogene liegen kaum gesicherte Informationen vor. Eine biologische Notwendigkeit einer akzessorischen Progesteronquelle konnte beim Rind bisher ebenfalls nicht belegt werden. Im Rahmen der Regulation des weiblichen Sexualzyklus üben Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  ihre Wirkung über den klassischen endokrinen Wirkmechanismus, d.h. Produktion in einer speziellen endokrinen Drüse (Follikel bzw. Gelbkörper), Transport über die Blutbahn und Wirkung in einem mehr oder weniger weit entfernten Zielorgan, aus. Wie das Beispiel der Beteiligung des im Hoden selbst gebildeten Testosterons an der Regulation der Keimepithelfunktion zeigt, können Sexualsteroiden jedoch auch als lokale Mediatoren fungieren. Diesem Aspekt wurde bisher hinsichtlich der placentaren Steroide beim Rind kaum Rechnung getragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zunächst, im ersten Kapitel durch die in situ-Charakterisierung der placentaren Steroidbiosynthese mittels eines in vitro-Systems möglichst unbeeinflusst von peripheren Metabolisierungs- und Ausscheidungsvorgängen Informationen über die beschrittenen Synthesewege, die primären Metaboliten sowie über übergeordnete Regulationsmechanismen zu erhalten. Im zweiten Kapitel soll die Bildung von Estronsulfat - Hauptprodukt der placentaren Östrogenbiosynthese im maternalen Blut - ebenfalls im in vitro-Ansatz in den Plazentomen charakterisiert werden. Weiteres Ziel der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen ist die Charakterisierung der placentaren Östrogensulfatase-Aktivität. Die Bedeutung dieses Enzyms liegt darin, daß die in großen Mengen vom Trophoblasten produzierten sulfokonjugierten rezeptorinaktiven Östrogene in Sulfatase-exprimierenden Zellen wieder in freie, rezeptoraktive Formen überführt werden können ("Sulfatase-Pathway"). Im dritten Kapitel sollen die Konzentrationen placentarer Östrogene und die Progesteronkonzentrationen direkt in Karunkel- und Kotyledonengewebe gemessen werden, da – wie oben bereits angesprochen – periphere Hormonspiegel nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die an den Produktionsstätten bzw. Zielorganen vorhandenen Mengen bzw. biologischen Aktivitäten erlauben. Durch den immunhistologischen Nachweis von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren sollen im vierten Kapitel potentielle Zielzellen placentarer Steroide innerhalb der Plazentome selbst identifiziert werden. Ziel der in den letzten beiden Kapiteln durchgeführten Untersuchungen ist die Charakterisierung der beiden wesentlichen Komponenten der Zelldynamik innerhalb der Plazentome, der Zellproliferation und des programmierten Zelltods (Apoptose), um eventuelle Zusammenhänge zwischen der lokalen Verfügbarkeit placentarer Steroide, dem Vorhandensein progesteron- bzw. östrogenresponsiver Zellen sowie Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in den Plazentomen herauszuarbeiten.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Kapitel I</b>	<b>In vitro-Untersuchungen zur plazentaren Steroidbiosynthese des Rindes in der zweiten Trächtigkeitshälfte sowie unter der Geburt .....</b>	<b>1</b>
<b>Kapitel II</b>	<b>Untersuchungen zur Bildung und Bedeutung konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes .....</b>	<b>81</b>
<b>Kapitel III</b>	<b>Bestimmungen endogener Steroidhormonkonzentrationen in Kotyledonen- und Karunkelgewebe .....</b>	<b>139</b>
<b>Kapitel IV</b>	<b>Immunhistologische Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den Plazentomen des Rindes .....</b>	<b>151</b>
<b>Kapitel V</b>	<b>Untersuchungen zum proliferativen Verhalten verschiedener Zellpopulationen in den Plazentomen des Rindes mittels immunhistologischer Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen .....</b>	<b>215</b>
<b>Kapitel VI</b>	<b>Untersuchungen zur Bedeutung der Apoptose für Morphogenese und Funktion der Plazentome des Rindes .....</b>	<b>249</b>
<b>Kapitel VII</b>	<b>Zusammenfassende Schlußfolgerungen und Ausblicke .....</b>	<b>285</b>
<b>Kapitel VIII</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>289</b>



**KAPITEL I**

**IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR PLAZENTAREN  
STEROIDBIOSYNTHESE DES RINDES IN DER  
ZWEITEN TRÄCHTIGKEITSHÄLFTE  
SOWIE UNTER DER GEBURT**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.1.</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>Morphologie der Rinderplazenta.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>Steroidbiosynthese .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2.1.</b>	<b>Bereitstellung von Cholesterin in steroidogenen Zellen .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.2.2.</b>	<b>Die Enzyme der plazentaren Steroidbiosynthese.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2.2.1.</b>	<b>Cytochrom P450-Enzyme .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2.2.2.</b>	<b>Cytochrom P450scc (side-chain-cleavage enzyme).....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2.2.3.</b>	<b>Cytochrom P450c17<math>\alpha</math> (17<math>\alpha</math>-Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase).....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2.2.4.</b>	<b>3<math>\beta</math>-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-<math>\Delta_{5,4}</math>-Isomerase (3<math>\beta</math>-HSD).....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2.2.5.</b>	<b>Cytochrom P450arom (Aromatase).....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2.3.</b>	<b>Die Regulation der plazentaren Steroidbiosynthese beim Rind und anderen Spezies.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.3.</b>	<b>Graviditätsassoziierte Östrogenproduktion.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.4.</b>	<b>Progesteronquellen während der Gravidität und Progesteronwirkungen .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.5.</b>	<b>Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur plazentaren Steroidbiosynthese des Rindes .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.5.1.</b>	<b>Östrogene .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.5.2.</b>	<b>Progesteron .....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Untersuchungsziele .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2.1.</b>	<b>Tiermaterial und Probenentnahme .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2.2.</b>	<b>Präparation und Homogenisierung des Gewebes.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2.3.</b>	<b>Untersuchungen nach Zugabe exogener Substrate.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2.3.1.</b>	<b>Herstellung der <sup>3</sup>H-Substratlösungen.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2.3.2.</b>	<b>Inkubationsmedium.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2.3.3.</b>	<b>Durchführung der Inkubationen.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.2.3.4.</b>	<b>Extraktion.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.2.3.5.</b>	<b>Chromatographische Vorreinigung .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.2.3.6.</b>	<b>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....</b>	<b>32</b>
<b>1.2.2.3.7.</b>	<b>Erfassung der <sup>3</sup>H-Impulse in den HPLC-Fractionen und Berechnung der Substratumwandlung .....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.2.3.8.</b>	<b>Versuchsaufbau .....</b>	<b>35</b>

---

1.2.2.3.8.1.	Methodische Untersuchungen zum Einfluß der Cofaktorsupplementierung des Inkubationsmediums bzw. der Substratmenge auf die Substratumwandlung .....	35
1.2.2.3.8.2.	Untersuchungen zur Metabolisierung von Pregnenolon, Progesteron und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron in Abhängigkeit vom Graviditätszeitpunkt.....	36
1.2.2.4.	Begleitende Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf endogener Steroide in den Inkubationsansätzen.....	37
1.2.2.4.1.	Inkubationsansätze .....	37
1.2.2.4.2.	Probenaufbereitung .....	37
1.2.2.4.3.	Radioimmunologische Bestimmungen .....	37
1.2.2.4.4.	Probenauswertung .....	39
1.2.2.5.	Bestimmung von Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma .....	39
1.2.2.6.	Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Pufferlösungen .....	40
1.2.2.6.1.	Chemikalien .....	40
1.2.2.6.2.	<sup>3</sup> H-markierte Steroide.....	40
1.2.2.6.3.	Materialien und Geräte.....	41
1.2.2.6.4.	Puffer .....	41
1.2.3.	Ergebnisse .....	42
1.2.3.1.	Steroidhormonkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere .....	42
1.2.3.2.	Ergebnisse der Inkubationsversuche.....	43
1.2.3.2.1.	Einfluß der Cofaktor-Supplementierung bzw. der Substratmenge auf das Inkubationsergebnis.....	43
1.2.3.2.2.	Metabolisierung von Pregnenolon an verschiedenen Graviditätszeitpunkten.....	49
1.2.3.2.3.	Darstellung der Bedeutung des $\Delta$ 4- bzw. des $\Delta$ 5-Synthesewegs für die plazentare Östrogensynthese des Rindes .....	54
1.2.3.3.	Konzentrationsverlauf endogener Steroide bei Inkubationen an den Graviditätstagen 220 bzw. 270 .....	59
1.3.	Diskussion .....	61
1.3.1.	Diskussion der Methodik.....	61
1.3.1.1.	Quantifizierung der anteilmäßigen Verteilung von Substrat und Metaboliten mittels HPLC.....	61
1.3.1.2.	Bestimmung endogener Steroidkonzentrationen mittels HPLC-RIA .....	61
1.3.1.3.	Inkubationssystem .....	62
1.3.1.4.	Supplementierung des Inkubationsmediums mit Cofaktoren.....	63

1.3.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	63
1.4.	Literaturverzeichnis .....	70

## 1.1. Literaturübersicht

### 1.1.1. Morphologie der Rinderplazenta

Die Plazenta des Rindes wird nach morphologischen Kriterien als Placenta multiplex s. cotyledonaria bezeichnet (STRAHL, 1912). Nachdem sich der embryo-maternale Kontakt nach Anlagerung des Keimes an das Endometrium um den 18./19. Tag der Trächtigkeit zunächst über die nahezu gesamte Trophoblastoberfläche erstreckte, ergibt sich ab dem ca. 30. Tag dahingehend eine Differenzierung, daß sich der feto-maternale Kontakt zunehmend auf multiple abgegrenzte Bezirke beschränkt, in denen spezifische Strukturen, die Plazentome, ausgebildet werden (LEISER, 1975). Die Plazentome bestehen aus einem maternalen Anteil, der Karunkel, und dem fetalen Anteil, der Kotyledone. Die Karunkelanlagen werden beim weiblichen Rind bereits in der Fetalphase angelegt (ATKINSON et al., 1984). Die Zahl und Anordnung der Karunkelanlagen sind bei den einzelnen Wiederkäuerarten speziesspezifisch (MOSSMAN, 1987). Beim Rind sind im allgemeinen in jedem Uterushorn 4 Reihen mit je 10-15 Karunkelanlagen vorhanden. Entsprechend der reihenförmigen Anordnung der Karunkeln im Uterushorn erfolgt auch die Ausbildung der Kotyledonen am Chorion. Die Entwicklung der Plazentome setzt ein, indem sich im Bereich der Karunkelanlagen auf der fetalen Seite sogenannte "milky patches" bilden. Ein solcher spezialisierter Teil der fetalen Plazenta setzt sich aus einem mesodermalen Anteil, welcher dünnwandige, der Allantois entstammende Gefäße enthält, sowie einem aus dem Trophoblasten bestehenden epithelialen Überzug zusammen. Vom "milky patch" wachsen dann sukzessive Villi in das Kryptensystem einer sich entwickelnden Karunkelanlage ein (BJÖRKMAN, 1954; HRADECKY et al., 1988; RÜSSE und GRUNERT, 1993). Mit der Größenzunahme der Plazentome ist eine basale Einschnürung der Karunkeln verbunden, wodurch beim Rind der 2-3 cm lange, von drüsenloser Schleimhaut überzogene Karunkelstiel entsteht. Ihre endgültige Gestalt erreichen die Plazentome um den 100. Trächtigkeitstag. Während diesbezüglich bis zur Geburt kaum noch Veränderungen stattfinden, geht das Größenwachstum bis zum Graviditätsende weiter. Die Größe der Plazentome ist je nach Lokalisation unterschiedlich. Die größten bilden sich im mittleren Bereich des Fruchtsackes an der Eintrittsstelle der Nabelgefäße, während sie in Richtung Uterushörner und Korpus kleiner bleiben. Bei entwickelten Plazentomen des Rindes überziehen die Chorionplatten die Karunkeloberfläche kappenartig, wobei sich komplex verzweigte Chorionzotten tief in die Krypten der Uterusschleimhaut einsenken. Zwischen diesen Zotten sind karunkuläre Septen - komplementär zu den Zotten verzweigt – entstanden (BJÖRKMAN, 1954; RÜSSE und GRUNERT, 1993). Sie enthalten vom Karunkelstiel her eingewanderte Fibroblasten und senkrecht zur Karunkelbasis eingesproßte Gefäße (LEISER et al., 1996). Kurz vor der Geburt präsentieren sich in den mehr oder weniger pilzförmigen Plazentomen dendritisch verästelte fetale Zottenbüschel, welche das mütterliche Septengewebe bis nahe an seine schalenförmige Basis durchdringen. Die Septen reichen ihrerseits bis an die Zottenbasis. Somit entsteht eine große Oberfläche für den sich hier vollziehenden Stoffaustausch (HRADECKY et al., 1988; RÜSSE und GRUNERT, 1993; LEISER et al., 1996, 1997).

Bei den meisten Spezies stellt das Chorionepithel (Trophoblast) die entscheidende Austauschbarriere zwischen maternalem und fetalem Organismus dar. Beim Rindes ist es einschichtig; aufgrund morphologischer Kriterien können darin zwei verschiedene Zelltypen unterschieden werden (WIMSATT, 1951; BJÖRKMAN, 1954, 1969; LEISER, 1975; WOODING und WATHES, 1980):

- einkernige Trophoblastzellen (Hauptzellen), columnar trophoblastic cells; und

- Trophoblast-Riesenzellen (trophoblast giant cells); Diplokaryozyten; binuclear cells (BNC).

Als Trophoblastriesenzellen werden allgemein große Zellen des Trophoblasten bezeichnet, deren DNA-Gehalt größer ist als derjenige, welcher dem diploiden Chromosomensatz entspricht. Zu den Trophoblastriesenzellen werden auch die meist zweikernigen Trophoblastriesenzellen der Wiederkäuer gerechnet (HOFFMAN und WOODING, 1993). Die BNC stellen eine für die meisten Wiederkäuer charakteristische Trophoblastzellpopulation dar. Sie sind bereits in sehr frühen Stadien der Plazentation nachweisbar (LEISER, 1975; KING et al., 1979, 1980). Sie sollen im wesentlichen zwei Hauptaufgaben erfüllen: durch ihre Beteiligung am Aufbau eines fetomaternalen Syncytiums sollen sie essentiell für eine erfolgreiche Implantation sein. Ihre zweite Hauptaufgabe wird in der Bildung endokriner Signale gesehen (WOODING, 1992). Die Trophoblastriesenzellen des Rindes sind im typischen Fall zweikernig. Es werden jedoch gelegentlich auch einkernige bzw. solche mit einer höheren Anzahl an Kernen gefunden (KLISCH et al., 1999a). Die Kerne in jungen BNC sind kugelförmig, in älteren Zellen sollen sie dagegen mehr ovoid sein. Auffällig sind die deutliche Kernmembran und das in zahlreichen Klümpchen angeordnete Chromatin. Offensichtlich besitzen sie wie die einkernigen Trophoblastzellen keine Nucleoli. Die BNC weisen eine auffällige polare Struktur auf. Die beiden Kerne liegen etwas oberhalb einer gedachten Äquatorialebene und teilen das Zytoplasma dadurch in einen kleineren supranukleären und in einen größeren infranukleären Bereich ein. Die beiden durch die Kerne voneinander abgeteilten Zytoplasmabereiche unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, Anfärbbarkeit und bezüglich des Gehalts an Zellorganellen. Der supranukleäre Bereich ist charakterisiert durch die lichtmikroskopische Homogenität des Zytoplasmas, den hohen Gehalt an Mitochondrien und Golgi-Vesikeln sowie die starke Anfärbbarkeit durch Protein- und Ribonukleinsäurefärbungen. Charakteristisch für den infranukleären Bereich sind v.a. die glykoproteinhaltigen Granula (WIMSATT, 1951). Der Ursprung der BNC ist unklar. Bisher wurden keine spezifischen Stammzellen identifiziert. Nach WIMSATT (1951) werden sie aus den uninukleären Trophoblastzellen gebildet, indem nach einer Kernteilung die Zellteilung unterbleibt. Dementsprechend halten HOFFMAN und WOODING (1993) die Kerne der BNC für diploid (2C). KLISCH et al. (1999b) ermittelten jedoch den typischen DNA-Gehalt von Trophoblastriesenzellkernen als 8C. Aufgrund ihrer Untersuchungen postulierten sie, daß die Mehrzahl der überwiegend zweikernigen Trophoblastriesenzellen durch eine Abfolge von zwei azytokinetischen Mitosen, gefolgt von einer weiteren S-Phase ohne anschließende Mitose, gebildet werden. In einzelnen Zellkernen von Trophoblastriesenzellen fanden sie DNA-Gehalte von bis zu 32 C.

Die BNC entstehen an der Basis des Chorionepithels. Nach ihrer Bildung wird aufgrund licht- und elektronenmikroskopischer Befunde auf eine ständige Wanderungsbewegung der neugebildeten BNC in das maternale Uterusepithel und bis zu dessen Basalmembran - aber nicht darüber hinaus - geschlossen (WOODING und WATHES, 1980; KLISCH et al., 1999a). Die Migration dieser spezialisierten mehrkernigen Zellen ins Uterusepithel wird im Zusammenhang mit einer gerichteten Sekretion endokrin aktiver Substanzen - u.a. plazentarem Laktogen - ins maternale Kompartiment gesehen (WOODING und BECKERS, 1987; MORGAN et al., 1989). Der Anteil der BNC an der Gesamtzahl der Zellen des Chorionepithels ändert sich beim Rind über die Dauer der Gravidität kaum und beträgt ca. 20-25 Prozent. Unter der Geburt wurde ein Absterben bzw. Vitalitätsverlust der BNC beobachtet, welcher für den termingerechten Abgang der Nachgeburt von Bedeutung sein soll. Der Mechanismus, welcher dem Verschwinden bzw. dem Vitalitätsverlust der BNC zugrunde liegt, ist derzeit unklar (WILLIAMS et al., 1987; GROSS und WILLIAMS, 1988a; GROSS et al., 1991). Informationen zur Kontrolle der Trophoblastzell-Migration liegen beim Rind kaum vor. Entsprechende Untersuchungen bei Schafen bzw. Ziegen haben gezeigt, daß die Anzahl der BNC sowie deren Migrationsverhalten nicht beeinflußt wird durch Ovariectomie des Muttertieres, eine erhebliche Reduktion der Anzahl der Plazentome durch die operative Entfernung von Karunkelanlagen vor dem Decken, die Verabreichung des Progesteron-Synthesehemmers Epostan sowie des Prolaktin-Hemmers Bromocriptin. Auch die Hypophysektomie bzw. Adrenalektomie des Fetus sowie die Verabreichung von Bromocriptin an den Fetus zeigten keinen Effekt (WOODING et al., 1986). Die Tatsache, daß bei Zwillingssgraviditäten im Falle der Verabreichung eines ACTH-Präparates an einen der beiden Feten die Reduktion der BNC-Anzahl nur im behandelten Fetus eintrat, wurde von den Autoren dahingehend interpretiert, daß die Kontrolle über Zahl und Migrationsverhalten der BNC beim Fetus liegt.

LEISER und KAUFMANN (1994) interpretieren die BNC als primitiven Syncytiotrophoblast. Als Syncytiotrophoblast werden in der Humanplazenta hochspezialisierte oberflächliche Trophoblastzell-Syncytien im Bereich der Chorionzotten bezeichnet, welche durch Verschmelzung und Differenzierung aus basal gelegenen einkernigen, undifferenzierten Trophoblastzellen, die in ihrer Gesamtheit als Cytotrophoblast bezeichnet werden, entstehen. Da die Syncytien aufgrund des hohen Differenzierungsgrades ihre Teilungsfähigkeit verloren haben, müssen sie begleitend zum plazentaren Wachstum permanent aus der Stammzellreserve, den Zellen des Cytotrophoblasten, neu gebildet werden (Übersicht bei BENIRSCHKE und KAUFMANN, 1995). HOFFMAN und WOODING (1993) stellen jedoch Analogien zwischen den BNC der Wiederkäuer und Trophoblastriesenzellen anderer Spezies in Frage. Möglicherweise besitzen sie als einzige Gemeinsamkeiten ihre Größe und den erhöhten DNA-Gehalt.

Bei Schaf und Ziege werden in den Plazentomen an der fetomaternalen Grenzfläche durch Verschmelzung von BNCs mit uterinen Epithelzellen vielkernige Hybridzellen aufgebaut, wodurch v.a. bei der Ziege ausgedehnte Synzytien entstehen. Die Mehrzahl der Kerne dieser Riesenzellen entstammen hierbei den BNCs. Die Bedeutung der Synzytium-Bildung wird in

einer Erleichterung des fetomaternalen Stoffaustausches und in der gerichteten Abgabe von den BNC entstammenden, endokrin aktive Substanzen enthaltenden Granula ins maternale Kompartiment gesehen (WOODING, 1984; WANGO et al., 1990; WOODING et al., 1993). WOODING et al. (1993) sowie LEISER und KAUFMANN (1994) bezeichnen die Plazenta der Wiederkäuer daher als Plazenta synepitheliochorialis. Beim Rind werden derartige Synzytien zum Zeitpunkt der Implantation ebenfalls gebildet. Diese werden jedoch in späteren Stadien von Uterusepithelzellen, welche sich in ihrer Ultrastruktur von den Uterusepithelzellen in graviden Tieren unterscheiden, ersetzt. In fortgeschrittenen Stadien fusionieren die einwandernden BNC mit jeweils einer Karunkelepithelzelle zu einer trinukleären fetomaternalen Hybridzelle, welche nach Freisetzung der aus den BNC entstammenden spezifischen Granula degenerieren (WATHES und WOODING, 1980; WOODING und BECKERS, 1987; HOFFMAN und WOODING, 1993; KLISCH et al., 1999a). Über die funktionelle Differenzierung verschiedener Trophoblastzellpopulationen liegen beim Rind zur Zeit kaum Informationen vor. Bisherige Untersuchungen haben die Synthese von Progesteron (REIMERS et al., 1985) sowie von plazentarem Laktogen (MORGAN et al., 1989; WOODING, 1992) vorwiegend in den BNC lokalisiert. Vermutlich verbergen sich hinter den morphologisch sehr einheitlichen BNC-Populationen aber funktionell verschiedene Zellen (WIMSATT, 1951; WOODING, 1992).

Die einkernigen Trophoblastzellen sind teilweise kubisch bis hochprismatisch. Dort, wo sie an Trophoblastriesenzellen grenzen, sind sie durch diese vielgestaltig verformt (BJÖRKMAN, 1954; LEISER, 1975). Die Hauptaufgabe der einkernigen Trophoblastzellen wird aufgrund des ausgeprägten Mikrovillisaumes vorwiegend in einer resorptiven Tätigkeit gesehen. Offensichtlich sind sie jedoch ebenfalls endokrin aktiv (GROSS und WILLIAMS, 1988a; MORGAN et al., 1993; MATAMOROS et al., 1994). Die Befunde von MATAMOROS et al. (1994) lassen vermuten, daß sie die Hauptquelle der plazentaren Östrogene darstellen.

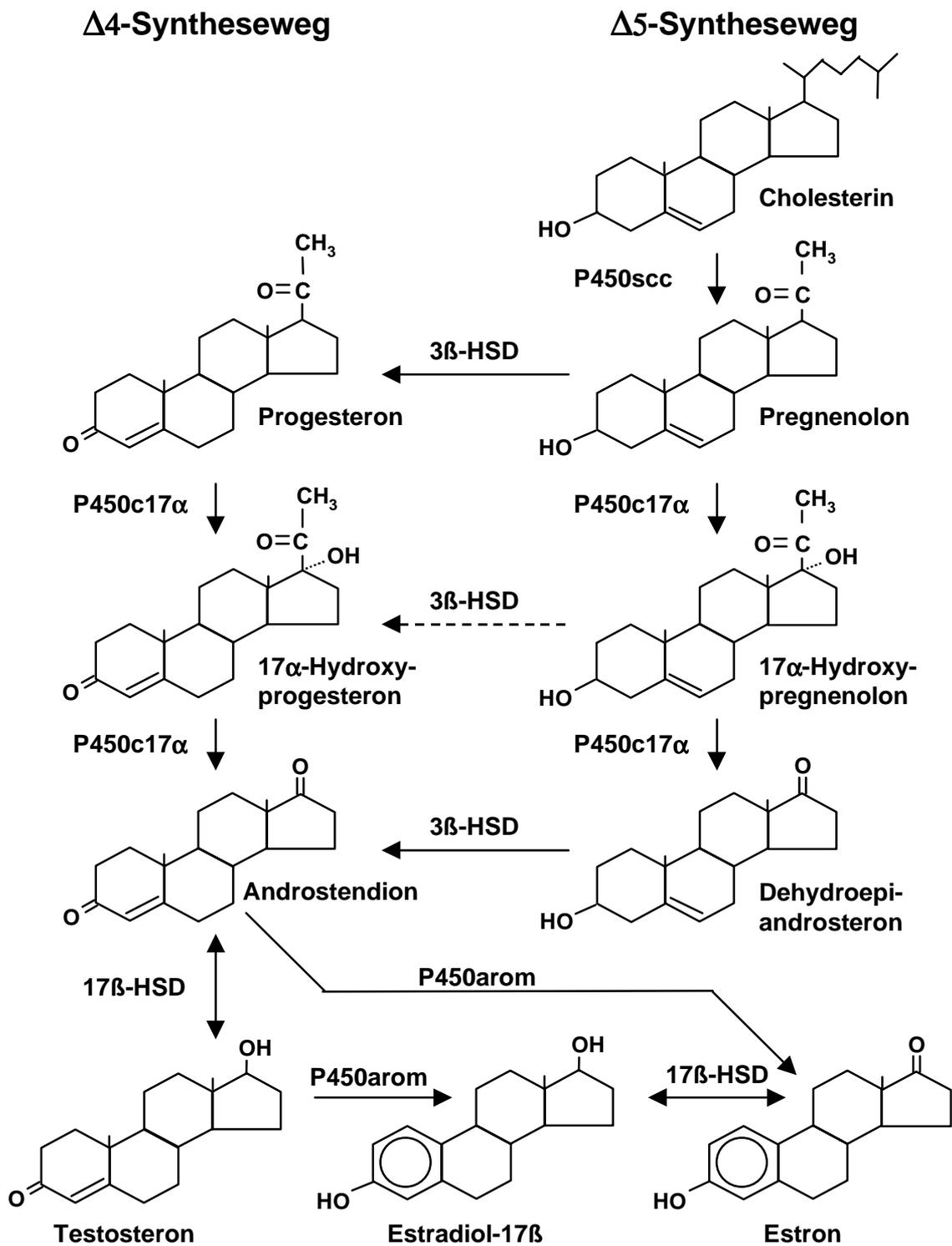
Komplementär zu den fetalen Zotten bilden sich auf der maternalen Seite die karunkulären Krypten aus. Diese werden von einem einschichtigen, aus zylindrischen bis kubischen Zellen bestehenden Epithel ausgekleidet. Auch im Karunkelepithel werden gelegentlich zwei-, seltener mehrkernige Zellen beobachtet, die sich jedoch morphologisch deutlich von den Trophoblastriesenzellen unterscheiden und offensichtlich rein maternalen Ursprungs sind (BJÖRKMAN, 1954, 1968, 1969). In der Spätphase der Gravidität kommt es zu einer erheblichen Reduktion des Karunkelepithels, welches zum Zeitpunkt der Geburt in reifen Plazentomen extrem abgeflacht bzw. nicht mehr nachweisbar ist. Daher wurde die Plazenta des Rindes auch als Plazenta syndesmochorialis bezeichnet. BJÖRKMAN (1954) lehnt diese Bezeichnung jedoch für die Rinderplazenta ab, da das vollständige Verschwinden des Karunkelepithels in der Spätphase der Gravidität allenfalls in den oberflächlichsten Bereichen der Karunkeln zu beobachten ist. Die präpartale Abflachung geht mit einer deutlichen Abnahme der Zelldichte des Karunkelepithels einher. In Fällen von Nachgeburtshaltungen unterbleiben diese Reifungsvorgänge ebenso wie der oben angesprochene drastische Abfall der Anzahl der BNC. Daraus kann gefolgert werden, daß die Plazentareifung nicht unmittelbar an die Rei-

---

fung des Fetus bzw. an die geburtsinduzierenden Mechanismen gekoppelt ist (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989).

### **1.1.2. Steroidbiosynthese**

Die für die plazentare Steroidbiosynthese des Rindes relevanten Reaktionsschritte der Steroidbiosynthese sollen im folgenden nur grob skizziert werden. Detailliertere Informationen sowie umfangreiche Literaturangaben sind den Zusammenfassungen von MILLER (1988), ALBRECHT und PEPE (1990) sowie KUSS (1994) zu entnehmen. Bezüglich der Östrogen-sulfotransferase und der Östrogensulfatase sei auf Kapitel II verwiesen.



**P450scc = Cytochrom P450 side-chain-cleavage**  
**P450c17 $\alpha$  = Cytochrom P450c17 $\alpha$  (17 $\alpha$ -Hydroxylase-C17,20-Lyase)**  
**3 $\beta$ -HSD = 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase- $\Delta$ 5/4-Isomerase**  
**17 $\beta$ -HSD = 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase**  
**P450arom = Aromatase**

Abb. 1: Schematische Darstellung der Progesteron- bzw. Östrogenbiosynthese

### 1.1.2.1. Bereitstellung von Cholesterin in steroidogenen Zellen

Steroidhormone werden in steroidogenen Zellen kaum in nennenswerter Menge gespeichert. Der gesteigerten Freisetzung infolge eines entsprechenden Stimulus liegt daher hauptsächlich eine gesteigerte Neusynthese zugrunde. Primäres Substrat der Synthese aller Steroidhormone ist Cholesterin, welches im ersten Schritt der Steroidbiosynthese an der inneren Mitochondrienmembran durch das Side-Chain-Cleavage Enzyme (P450<sub>scc</sub>; s. Abschnitt 1.1.2.2.) und ein zugehöriges, in der Mitochondrienmatrix lokalisiertes Elektronenzulieferersystem, in Pregnenolon umgewandelt wird. Bei der Aufregulation der Steroidhormonsynthese werden akute Mechanismen, deren Wirkung innerhalb von Minuten eintritt, und chronische, d.h. verzögert einsetzende und lang anhaltende Mechanismen, unterschieden. Letztere führen an mehreren Angriffspunkten vorwiegend - jedoch nicht ausschließlich - über die Aufregulation steroidumwandelnder Enzyme zu einer Verstärkung des Steroidhormonsyntheseapparates. Der Angriffspunkt der akuten Regulationsmechanismen ist dagegen ausschließlich die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon. Hierbei ist nicht die durch P450<sub>scc</sub> katalysierte Reaktion der limitierende Schritt, sondern die Mobilisierung und der Transport des Substrates Cholesterin aus den intrazellulären Speicherstätten zur inneren Mitochondrienmembran und die Beladung des P450<sub>scc</sub> (Übersichten bei JEFCOATE et al., 1992; MILLER, 1995; PAPA-DOPOULOS et al., 1997). Cholesterin liegt in den Zellen nicht gleichmäßig verteilt vor. Es ist Bestandteil von Membranen, wobei sich die Cholesteringehalte der Zytoplasmamembran und der intrazellulären Membranen um einem Faktor von bis zu 30 unterscheiden können. Während die Zytoplasmamembran relativ cholesterinreich ist, ist der Gehalt der Membranen des ER deutlich niedriger (SCHROEDER et al., 1996). Die innere Mitochondrienmembran ist nach SCHROEDER et al. (1996) praktisch cholesterinfrei. WATERMAN (1998) postuliert dagegen in der inneren Mitochondrienmembran steroidhormonproduzierender Zellen zwei Cholesterin-Pools: einen zur Erhaltung der Membranstruktur sowie einen steroidogenen Pool. Weitere Cholesterinspeicherstätten sind zytoplasmatische Fetttröpfchen („lipid droplets“). Die oben dargestellte asymmetrische subzelluläre Verteilung von Cholesterin legt den Schluß nahe, daß komplexe intrazelluläre Cholesterintransportsysteme und entsprechende Verteilungswege existieren (SCHROEDER et al., 1996), wobei die zugrundeliegenden biochemischen Vorgänge bisher nur teilweise geklärt sind.

Steroidhormonproduzierende Zellen sind zwar prinzipiell zur de novo-Synthese von Cholesterin befähigt, bevorzugen jedoch im allgemeinen vorgefertigtes Cholesterin, welches in lipoproteingebundener Form dem Blutplasma entnommen wird. Überwiegend werden als Hauptcholesterinquelle steroidhormonproduzierender Zellen Low Density-Lipoproteine (LDL) angesehen, welche über eine durch spezifische Rezeptoren vermittelte Endozytose aufgenommen und in Lysosomen abgebaut werden. Das dabei anfallende Cholesterin wird in veresterter Form in Fetttröpfchen, ein Charakteristikum steroidproduzierender Zellen, abgelagert (Übersichten bei JEFCOATE et al., 1992; TÓTH, 1992; TÓTH et al., 1997). Nach MILLER (1995) ist die Präferenz der Hauptcholesterinquelle speziesabhängig: während ste-

roidogene Gewebe des Menschen den Hauptteil des Cholesterins als LDL aufnehmen, werden von den Nagern High Density-Lipoproteine (HDL) bevorzugt. Auch bezüglich der Steroidsynthese in der Nebennierenrinde des Rindes wird die Bedeutung von HDL als wichtigste Cholesterinquelle diskutiert (YAGUCHI et al., 1998). In vivo- und in vitro-Untersuchungen beim Menschen haben gezeigt, daß das zur plazentaren Progesteronsynthese benötigte Cholesterin überwiegend dem maternalen Plasma entnommen wird (WINKEL et al., 1980; Übersicht bei RUNNEBAUM und RABE, 1983). Die Bedeutung von in steroidogenen Zellen aus Acetyl-CoA de novo synthetisiertem Cholesterin wird dagegen allgemein als quantitativ unbedeutend eingeschätzt. Nach der Aufnahme ausreichender LDL-gebundener Cholesterinmengen via LDL-Rezeptoren kommt es neben einer Down-Regulation der LDL-Rezeptoren und einer verstärkten Veresterung von freiem Cholesterin zu einer Unterdrückung der Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase, des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese (MYANT, 1990). Die de novo-Synthese von Cholesterin ist vermutlich nur dann von Bedeutung, wenn das als Substrat bevorzugte Lipoprotein-assoziierte Cholesterin aus dem Blutplasma nicht in erforderlichem Ausmaß zur Verfügung steht, wie z.B. im Fall der bovinen Granulosazellen. Diese finden in ihrem unmittelbaren Mikro-Milieu, der Follikelflüssigkeit, das für die Progesteronproduktion bevorzugte LDL-gebundene Cholesterin nicht vor (SAVION et al., 1982). Entsprechend wird in kultivierten menschlichen Trophoblastzellen die Cholesterinbiosynthese unterdrückt, solange ausreichend LDL zur Verfügung steht (WINKEL et al., 1980).

Der Transport von Cholesterin aus den intrazellulären Speichern zu den Mitochondrien ist noch weitgehend unklar. Freies Cholesterin ist wasserunlöslich und kann im wässrigen Zytosol nur an Protein gebunden transportiert werden. An diesen Transportprozessen sind vermutlich mehrere Faktoren beteiligt, unter denen das Sterol Carrier Protein-2 offensichtlich eine wichtige Rolle spielt (MILLER, 1995). HALL und ALMAHBOBI (1997) postulieren aufgrund von Untersuchungen an Nebennierenrindenzellen, daß bei der in stimulierten Zellen zu beobachtenden Zusammenlagerung von cholesterinhaltigen Fettspeichertröpfchen und Mitochondrien („Docking“) Abbauprozessen im Zytoskelett eine erhebliche Bedeutung zukommt, da sowohl Fettröpfchen als auch Mitochondrien an nichtkontraktilen Intermediärfilamenten fixiert sind. Am „Docking“ sollen weiterhin energieabhängige kontraktile Prozesse unter Beteiligung von Aktin sowie Phosphorylierungen beteiligt sein. Über den Transport von nicht den Fettröpfchen entstammendem Cholesterin sowie über den Eintritt von Cholesterin in die Mitochondrien liegen kaum Informationen vor (HALL und ALMAHBOBI, 1997).

Über den Transport des extrem hydrophoben Cholesterins durch die äußere Mitochondrienmembran und den hydrophilen Zwischenspalt zur inneren Mitochondrienmembran wurden in den vergangenen Jahren grundlegende Erkenntnisse gewonnen und zwei an diesen Vorgängen beteiligte Schlüsselproteine identifiziert, das Steroid Acute Regulatory Protein (StAR) sowie der Benzodiazepinrezeptor vom peripheren Typ (PBR). Die Bedeutung von StAR ist beispielsweise in Fällen von Kongenitaler Lipoider Hyperplasie der Nebennierenrinde (Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia) ersichtlich, einer StAR-Mutation, die mit einer erheblichen

Insuffizienz oder Fehlen der Steroidbiosynthese einhergeht. Die Nebennierenrinde ist hierbei massiv vergrößert und mit Cholesterinestern angereichert (MILLER, 1995; STOCCO, 1998; WATERMAN, 1998). Die Synthese von StAR-Protein wird beispielsweise in LEYDIG-Zellen nach LH-Stimulation sehr rasch innerhalb von wenigen Stunden aufreguliert (LUO et al., 1998). Die unmittelbaren StAR-Effekte sind vermutlich jedoch eher auf eine StAR-Phosphorylierung als auf die Erhöhung der StAR-Menge zurückzuführen (ARAKANE et al., 1997). Am Substrattransport durch die Mitochondrienmembranen sind offensichtlich weitere Komponenten maßgeblich beteiligt, da auch die Zerstörung des PBR-Gens in einer LEYDIG-zell-Tumorlinie zu einer drastischen Verminderung der Steroidbiosynthese führte. PBR ist in der äußeren Mitochondrienmembran mit einem spannungsabhängigen 32 kDa-Anionenkanal, in der inneren Mitochondrienmembran mit einem 30 kDa-Adeninnukleotid-Carrier assoziiert und besitzt als endogenen Liganden ein als Endozepin bezeichnetes 10 kDa-Protein. Während der PBR offensichtlich als Kanal für den Durchtritt des Cholesterins an Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran fungiert, ist der der Bedeutung von StAR zugrundeliegende Mechanismus unbekannt. Vermutlich agiert StAR vor dem PBR (MILLER, 1995; PAPADOPOULOS et al., 1997; STOCCO, 1998; WATERMAN, 1998).

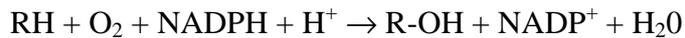
Die Untersuchungen zur Bereitstellung von Cholesterin in steroidogenen Zellen wurden in erster Linie an Nebennierenrindenzellen, daneben auch an steroidogenen Zellen der Gonaden durchgeführt. Entsprechende Informationen über den Cholesterinmetabolismus in steroidogenen Plazentazellen liegen erst in geringem Umfang vor. Aufgrund der in Abschnitt 1.1.2.3. angesprochenen Besonderheiten hinsichtlich der Regulation der Steroidsynthese der Plazenta und den offensichtlich vorhandenen speziesspezifischen Besonderheiten ist es zur Zeit offen, inwieweit die oben dargestellten Gegebenheiten auf die Plazenta, insbesondere die Plazenta des Rindes übertragen werden können. So wird beispielsweise nach MILLER (1995) StAR in steroidogenen Organen ohne akute Regulation wie Plazenta und Gehirn nicht exprimiert. PESCADOR et al. (1996) beschreiben dagegen den Nachweis von StAR-mRNA mittels Northern Blot in den Karunkeln und Kotyledonen des Rindes.

### **1.1.2.2. Die Enzyme der placentaren Steroidbiosynthese**

#### **1.1.2.2.1. Cytochrom P450-Enzyme**

Die Cytochrom P450-Enzyme bilden eine Familie von Enzymproteiden, die aus einem Proteingrundgerüst von ca. 500 Aminosäuren und einer darin aufgespannten Hämgruppe als reaktivem Zentrum bestehen (MILLER, 1988). Da ein erheblicher Anteil der steroidumwandelnden Enzyme zu dieser Gruppe gehört, sollen deren gemeinsame Eigenschaften zunächst in einem kurzen Überblick dargestellt werden. Namengebend für P450-Cytochrome ist eine Verlagerung des Absorptionsmaximums von 420 nm nach 450 nm, wenn Kohlenmonoxid durch eine reduzierte Cytochrom P450-Lösung geleitet wird (HALL, 1986). P450-Cytochrome sind Monooxygenasen, d.h. sie übertragen von molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) nur jeweils ein Sauerstoffatom auf das Substrat. Dazu werden zwei Elektronen benötigt, die von

Elektronentransportsystemen übertragen werden. P450-Cytochrome katalysieren die Hydroxylierung ihrer Substrate (RH) nach folgender Formel:



Weiterhin können P450-Cytochrome Kohlenstoffbrücken spalten. Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus ist jedoch noch weitgehend unklar (HALL, 1986). Die große Familie der P450-Cytochrome kann in 2 Gruppen unterteilt werden: neben relativ substratunspezifischen, induzierbaren P450-Cytochromen, die exogene Substrate wie zahlreiche Pharmaka und andere lipophile Fremdstoffe metabolisieren, gibt es die substratspezifischen P450-Cytochrome, zu denen auch die Cytochrome der Cholesterin-, Prostaglandin- und Steroidhormonsynthese gehören (HALL, 1986; COON et al., 1992). Ein Teil der P450-Cytochrome der Steroidbiosynthese ist in den Mitochondrien, ein anderer Teil im glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Bei Primaten sind die mitochondrialen P450-Cytochrome in der inneren Mitochondrienmembran verankert, wobei sie vermutlich in die Mitochondrienmatrix gerichtet sind. Die P450-Cytochrome des glatten ER sind ebenfalls membrangebunden, wobei eine Ausrichtung zum Zytoplasma vermutet wird (HALL, 1986; EDWARDS et al., 1991; VIJAYKUMAR und SALERNO, 1992). In Abhängigkeit von der Zellorganelle werden unterschiedliche, organellspezifische Elektronentransportsysteme zur Elektronenübertragung auf das Eisen des Häms verwendet. In den Mitochondrien erfolgt die Elektronenübertragung über ein funktionell zusammengehörendes Paar von Proteinen, das aus einem Flavoprotein (FAD-Adrenodoxin-Reduktase) sowie einem Eisen-Schwefel-Protein (Adrenodoxin) besteht (KITAGAWA et al., 1982; BLACK, 1987; ORME-JOHNSON, 1990). Mikrosomale P450-Enzyme benötigen dagegen zur Elektronenübertragung lediglich ein einziges membrangebundenes Enzym, die FAD-FMN-P450-Reduktase. Es liegen Hinweise vor, daß auch Cytochrom b5 bei der Elektronenbereitstellung in mikrosomalen Systemen beteiligt sein kann (HALL, 1986; KUSS, 1994).

#### **1.1.2.2.2. Cytochrom P450<sub>sc</sub> (side-chain-cleavage enzyme)**

P450<sub>sc</sub> ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon. Nach zwei Hydroxylierungen an C20 und C22 wird die Seitenkette zwischen diesen beiden Kohlenstoffatomen abgespalten, wodurch Pregnenolon und Isokaprinsäure entstehen. Diese drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritte laufen am selben reaktiven Zentrum des Enzymmoleküls ab. Für jeden Reaktionsschritt wird ein Elektronenpaar benötigt, das von NADPH via Adrenodoxin-Reduktase und Adrenodoxin auf P450<sub>sc</sub> übertragen wird. Die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon ist der erste und limitierende Schritt der Steroidbiosynthese und wird hormonell reguliert (MILLER, 1988; ALBRECHT und PEPE, 1990; CONLEY und MASON, 1990; MILLER, 1995; s. Abschnitte 1.1.2.1. und 1.1.2.3).

Die cDNA der bovinen P450<sub>sc</sub> kodiert für ein Protein aus 520 Aminosäuren. Davon werden im Rahmen von posttranslationalen Modifikationen die 39 N-terminalen Aminosäuren ab-

gespalten, sodaß sich das Proteingerüst der „reifen“ P450<sub>scc</sub> des Rindes aus 481 Aminosäuren zusammensetzt (NEBERT und GONZALES, 1987). Die bovine und die humane P450<sub>scc</sub> weisen einen hohen Homologiegrad auf. Sie stimmen in 82% ihrer Aminosäuren bzw. in 72% der Basenpaare überein. Bei der Western Blot-Analyse ist der Gehalt des bovinen Trophoblasten an P450<sub>scc</sub> bezogen auf die aufgetragene Proteinmenge über den Graviditätsverlauf weitgehend konstant (CONLEY et al., 1992). Immunhistologisch ist sie beim Rind in den einkernigen Hauptzellen des Trophoblasten und in den Karunkel epithelzellen, nicht jedoch in den Trophoblastriesenzellen nachweisbar (BEN-DAVID und SHEMESH, 1990). Im Unterschied zur Steroidbiosynthese in Hoden, Ovar und Nebennierenrinde, wo cAMP als Second Messenger der glandotropen Hormone LH bzw. ACTH die Expression von P450<sub>scc</sub> stimuliert, wird in der Rinderplazenta dieses Enzym durch Kalzium-Ionen stimuliert (SHEMESH et al., 1989).

#### 1.1.2.2.3. Cytochrom P450c17 $\alpha$ (17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase)

P450c17 $\alpha$  katalysiert auf dem  $\Delta$ 5-Syntheseweg sowohl die Hydroxylierung von Pregnenolon zu 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon als auch die Abspaltung der C17-ständigen Seitenkette unter Bildung von DHEA und Azetat. Auf dem  $\Delta$ 4-Syntheseweg wird parallel dazu die 17 $\alpha$ -Hydroxylierung von Progesteron katalysiert, die Lyasereaktion erfolgt jedoch in Abhängigkeit von der Spezies: während bei Schwein und Ratte C19-Steroide auch auf dem  $\Delta$ 4-Syntheseweg gebildet werden können, ist diese Umwandlung bei Primaten und Wiederkäuern kaum in nennenswertem Ausmaß nachweisbar (ESTABROOK et al., 1988; Übersicht bei CONLEY und BIRD, 1997).

Ursprünglich wurden 17 $\alpha$ -Hydroxylase- bzw. C<sub>17,20</sub>-Lyase-Aktivität unterschiedlichen Enzymproteinen zugeordnet. Inzwischen ist jedoch für den Menschen nachgewiesen, daß Hydroxylierung und Abspaltung der Seitenkette an einem aktiven Zentrum desselben Enzyms ablaufen, welches von einem einzigen Gen kodiert wird (CHUNG et al., 1987). Auch nach Expression der bovinen adrenalen P450c17 $\alpha$  in Affennierenzellen besaßen diese sowohl 17 $\alpha$ -Hydroxylase- als auch C<sub>17,20</sub>-Lyase-Aktivität (ZUBER et al., 1986; ESTABROOK et al., 1988). Versuche an Primärkulturen aus bovinen Nebennierenrindenzellen zeigten, daß bei der Umwandlung von Pregnenolon in DHEA das Zwischenprodukt 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon kaum vom Enzym freigesetzt wurde (YAMAZAKI et al., 1992).

Die menschliche P450c17 $\alpha$  ist an die Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums gebunden. Die für die von P450c17 $\alpha$  katalysierten Reaktionen benötigten Elektronen werden von NADPH über die P450-Reduktase auf P450c17 $\alpha$  übertragen. Hierbei kann das zweite Elektron alternativ von Cytochrom b<sub>5</sub> übertragen werden. Da mehrere P450-Enzyme um die von der P450-Reduktase zur Verfügung gestellten Elektronen konkurrieren, ist deren Verfügbarkeit unter Umständen limitiert. Möglicherweise hängt es von der Elektronenverfügbarkeit ab, ob das Substrat nur an C<sub>17</sub> hydroxyliert wird oder auch die Seitenkette zwischen C<sub>17</sub> und C<sub>20</sub> abgespalten wird (MILLER, 1988; CONLEY und BIRD, 1997). So macht HALL (1991)

beim Menschen die höhere P450-Reduktase-Konzentration im Hodengewebe gegenüber der Nebenniere dafür verantwortlich, daß in den Hoden vorwiegend Androgene, in der Nebennierenrinde dagegen bevorzugt Glukokortikoide synthetisiert werden.

Beim Schaf spielt die P450c17 $\alpha$  eine zentrale Rolle im Rahmen der Geburtsinduktion. Bei dieser Spezies induziert Cortisol aus der ausgereiften fetalen Nebennierenrinde in den letzten Tagen der Gravidität einem Anstieg der placentaren P450c17 $\alpha$ -Aktivität. Daraus resultiert eine verstärkte Metabolisierung von Pregnenolon auf dem  $\Delta$ 5-Syntheseweg in DHEA und weiter in Östrogene. Vor dieser Umschaltung des placentaren Steroidstoffwechsels wurde Pregnenolon dagegen bevorzugt via 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase- $\Delta$ <sub>5,4</sub>-Isomerase in Progesteron umgewandelt (THORBURN, 1991). Der präpartale Anstieg der placentaren P450c17 $\alpha$ -Aktivität geht mit einem Anstieg der P450c17 $\alpha$ -Konzentration einher (FRANCE et al., 1988; MASON et al., 1989). Auch beim Rind gibt es Hinweise auf einen unmittelbar präpartalen Anstieg der placentaren P450c17 $\alpha$ , der vermutlich analog den Verhältnissen beim Schaf durch Glukokortikoide fetalen Ursprungs induziert wird (CONLEY et al., 1992).

#### 1.1.2.2.4. 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase- $\Delta$ <sub>5,4</sub>-Isomerase (3 $\beta$ -HSD)

Dieses Enzym gehört nicht zur Cytochrom P450-Familie. Es katalysiert durch eine Dehydrogenierung am C<sub>3</sub>-Atom und die nachfolgende Isomerisierung die Umwandlung von 3 $\beta$ -Hydroxy-5-en-Steroiden in 3-Keto-4-en-Steroide. Als Substrate können hierbei Pregnenolon, 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon sowie DHEA dienen. Gebildet werden daraus jeweils Progesteron, 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron bzw. Androstendion (THOMAS et al., 1988; ALBRECHT und PEPE, 1990; LORENCE et al., 1990). Beim Menschen finden die beiden von der 3 $\beta$ -HSD katalysierten Umwandlungsschritte an zwei unterschiedlichen reaktiven Zentren eines einzigen Enzyms statt (LUU-THE et al., 1991a, 1991b). Als Coenzym wird hierbei NAD<sup>+</sup> benötigt (ISHII-OHBA et al., 1986; LUU-THE et al., 1988; THOMAS et al., 1988; ALBRECHT und PEPE, 1990; NICKSON et al., 1991). Auf subzellulärer Ebene ist die 3 $\beta$ -HSD des Menschen mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert und dort als integrales Membranprotein nachweisbar (NICKSON et al., 1991). Weiterhin wurde die 3 $\beta$ -HSD in den Mitochondrien lokalisiert (FERRE et al., 1975; RABE et al., 1982; ASIBEY-BERKO, 1986; THOMAS et al., 1989; ALBRECHT und PEPE, 1990). Dies ist jedoch nicht unumstritten (ISHIMURA et al., 1988). Inwieweit die für die 3 $\beta$ -HSD des Menschen beschriebenen Eigenschaften auf die 3 $\beta$ -HSD des Rindes übertragbar sind, ist zur Zeit noch unklar. Nach CONLEY et al. (1992) ist beim Rind die 3 $\beta$ -HSD-Aktivität mit einem einzigen Protein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa assoziiert.

#### 1.1.2.2.5. Cytochrom P450arom (Aromatase)

Die Aromatase katalysiert unter Ausbildung eines phenolischen A-Rings die Umwandlung von Androgenen in Östrogene. Als wichtigste physiologische Substrate dienen Testosteron und Androstendion, welche in Estradiol-17 $\beta$  bzw. Estron umgewandelt werden. Der sehr

komplexe und teilweise noch umstrittene irreversible Reaktionsmechanismus beinhaltet drei aufeinanderfolgende Hydroxylierungen, wobei zur Synthese von einem Mol Östrogene 3 Mol NADPH und 3 Mol O<sub>2</sub> benötigt werden (THOMPSON und SIITERI, 1974; GOTO und FISHMAN, 1977; FISHMAN und GOTO, 1981; FISHMAN und RAJU, 1981). Nach FISHMAN und GOTO (1981) kommt es bei der Aromatisierung zunächst zu 2 Hydroxylierungen am C19-Atom und einer weiteren Hydroxylierung am C2-Atom. Hierbei entstehen beispielsweise aus Androstendion als Zwischenprodukte der Reihe nach 19-Hydroxyandrostendion, 19-Oxoandrostendion und 2 $\beta$ -Hydroxy-oxo-androstendion. 2 $\beta$ -Hydroxyandrostendion ist eine sehr instabile Verbindung, aus der spontan Estron entsteht. Nach MENDELSON et al. (1990) ist der genaue Reaktionsmechanismus unklar. Sie postulieren, daß alle drei Hydroxylierungen am C19-Atom stattfinden. Demnach werden der Reihe nach eine C19-Hydroxylgruppe, eine C19-Aldehydgruppe und schließlich unter Abspaltung von Ameisensäure der phenolische A-Ring gebildet. Unklar ist ferner, welche Wasserstoffatome von den C-Atomen 1 und 2 bei der Aromatisierung abgespalten werden. Nach GOTO und FISHMAN (1977) sowie FISHMAN und RAJU (1981) werden bei der Aromatisierung von Androstendion sowohl am C1- als auch am C2-Atom der Wasserstoff in  $\beta$ -Stellung abgespalten. Im Gegensatz dazu werden nach MUTO und TAN (1986) sowie TAN und MUTO (1986) bei der Aromatisierung von Androstendion der Wasserstoff am C1-Atom in  $\alpha$ -Position und am C2-Atom in  $\beta$ -Position abgespalten. Nach COLE und ROBINSON (1991) wird der Wasserstoff am C1-Atom in  $\beta$ -Position abgespalten. Die Position des abgespaltenen Wasserstoffatoms am C2-Atom ist nach ihren Ergebnissen dagegen substratabhängig. Ungeklärt ist weiterhin, ob die einzelnen Schritte der Aromatisierung an einem einzigen reaktiven Zentrum (KELLIS und VICKERY, 1986) oder an unterschiedlichen reaktiven Zentren (FISHMAN und GOTO, 1981) der Aromatase stattfinden.

Viele Erkenntnisse über die Aromatase und den von ihr katalysierten Reaktionen stammen aus Untersuchungen an dem in der Humanplazenta exprimierten Enzym. Die Aromatase der Humanplazenta ist ein Glykoprotein, das zusammen mit dem NADPH-abhängigen Flavoprotein Cytochrom P450-Reduktase einen Komplex im endoplasmatischen Retikulum bildet (MENDELSON et al., 1990; SETHUMADHAVEN et al., 1991; SHIMOZAWA et al., 1993). Die humane und die bovine plazentare Aromatase weisen einen Homologiegrad von 84 Prozent ihrer Aminosäuren auf (HINSHELWOOD et al., 1993). Das Aromatase-Gen des Rindes umfaßt mehr als 56 Kilobasenpaare genomischer DNA und besteht aus mindestens 14 Exons. Vermutlich durch die Benutzung unterschiedlicher Promoter-Regionen und durch gewebsspezifisches alternatives Splicing werden verschiedene gewebsspezifische Transkriptvarianten gebildet (FÜRBASS et al., 1997).

### 1.1.2.3. Die Regulation der plazentaren Steroidbiosynthese beim Rind und anderen Spezies

Die Regulation der plazentaren Steroidbiosynthese ist zur Zeit bei keiner Spezies näher charakterisiert. Bisherige Untersuchungen bei verschiedenen Spezies lassen jedoch erkennen, daß sich die Regulation der Steroidbiosynthese in der Plazenta z.T. deutlich von den Regulationsmechanismen in Nebennierenrinde (NNR) und Gonaden unterscheiden. Weiterhin deuten sich erhebliche speziesspezifische Besonderheiten an (Übersicht bei STRAUSS et al., 1996). Nach MILLER (1995) ist die Plazenta wie das Gehirn ein steroidogenes Organ ohne akute Regulationsmechanismen. Bezüglich der Regulation der Steroidhormonsynthese stehen Gonaden und NNR unter der Kontrolle übergeordneter glandotroper Hormone aus der Hypophyse, welche über adenylylatzyklasegekoppelte Rezeptoren u.a. die Expression des P450<sub>scc</sub> stimulieren. Die Expression der plazentaren P450<sub>scc</sub> unterliegt jedoch zumindest teilweise anderen Regulationsmechanismen. Bei Mensch und Ratte wird die Expression der plazentaren P450<sub>scc</sub> zwar ebenfalls durch cAMP stimuliert, die nachgeschalteten intrazellulären Signale unterscheiden sich jedoch von den entsprechenden Mechanismen in Gonaden bzw. NNR. Weitere Faktoren, die beim Menschen in der Regulation der gonadalen bzw. adrenalen Steroidbiosynthese von erheblicher Bedeutung sind, werden in der Plazenta nicht exprimiert. Bei Schaf und Ziege wird die plazentare Progesteronproduktion durch Eicosanoide stimuliert, durch cAMP jedoch nicht beeinflusst (DE LA LLOSA-HERMIER et al., 1988; MILLER, 1995; STRAUSS et al., 1996). Die plazentare Steroidbiosynthese des Rindes ist ebenfalls unabhängig von LH und den zellulären cAMP-Spiegeln. Sie wird jedoch via Proteinkinase C und Kalzium stimuliert, wobei P450<sub>scc</sub> und 3 $\beta$ -HSD aktiviert werden (SHEMESH et al., 1984, 1989; SHEMESH, 1990). Bisherige Untersuchungen zur Regulation der plazentaren Steroidbiosynthese beim Rind lassen weiterhin erkennen, daß diese auf lokaler Ebene reguliert wird. AILENBERG und SHEMESH (1983) beschreiben in den Plazentomen eine hitzlabile Substanz mit einem Molekulargewicht von ca. 60000 Da, welche eine gonadotropin-ähnliche, die Steroidbiosynthese in Granulosazellen und LEYDIG-Zellen stimulierende Wirkung aufweist. Ferner wurde in Kotyledonen und Karunkeln ein Inhibitor der plazentaren Steroidbiosynthese charakterisiert. Dieser ist hitzestabil, nicht mit Äther extrahierbar, eluiert bei der Gelfiltration mit einem Molekulargewicht von 30000 bzw. 60000 Da und hemmt in vitro deutlich die basale Progesteronsekretion von Granulosazellen, Lutealzellen und Plazentazellen. Dieser Inhibitor ist in Plazentomen von 100-150 Tage tragenden Rindern, nicht jedoch von Rindern in der Geburt nachweisbar. Vermutlich wird die plazentare Steroidbiosynthese offensichtlich über weite Strecken der Gravidität durch diesen Faktor gehemmt. Möglicherweise erklärt sich der steile Anstieg v.a. der Östrogene kurz vor der Geburt u.a. durch den Entzug dieses Faktors (SHEMESH et al., 1983).

### 1.1.3. Graviditätsassoziierte Östrogenproduktion

Viele Säugerspezies weisen eine plazentare Östrogenbiosynthese auf. Unter den bei uns verbreiteten Haustierspezies stellt in dieser Hinsicht lediglich der Hund eine Ausnahme dar (HOFFMANN, 1994; HOFFMANN et al., 1994). Hinsichtlich des Ablaufes der plazentaren Östrogensynthese bestehen erhebliche speziesspezifische Unterschiede. Die verschiedenen Typen der plazentaren Östrogenbiosynthese können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Bei den zur ersten Gruppe gehörenden Spezies ist die Plazenta in der Lage, die Östrogenbiosynthese autonom zu bewerkstelligen. Ein charakteristischer Vertreter dieser Gruppe ist das Rind (HOFFMANN, 1983). Bei den zur zweiten Gruppe gehörenden Spezies ist die plazentare Enzyrnaustattung hinsichtlich der Östrogenbiosynthese unvollständig, daher werden einzelne Umwandlungsschritte in steroidogene Organe des Fetus „ausgelagert“. Der Transport der Zwischenprodukte zwischen den an der Synthesekette beteiligten Produktionsstätten findet auf dem Blutweg statt. Typische Vertreter dieser Gruppe sind das Pferd (MÖSTL, 1994) und der Mensch, für den DICZFALUSY (1964) den Begriff der fetoplazentaren Einheit prägte, da die Humanplazenta aufgrund eines  $17\alpha$ -Hydroxylase-C17, 20-Lyase-Mangels C19-Vorstufen der Östrogenbiosynthese dem fetalen Blut vorwiegend in Form von sulfokonjugiertem Dehydroepiandrosteron (DHEA) und  $16\alpha$ OH-DHEA entnimmt. Die Bildung dieser Substrate erfolgt in der fetalen Nebennierenrinde und Leber ( $16\alpha$ -Hydroxylierung). Beim Pferd ist ebenfalls eine fetoplazentare Einheit ausgebildet, wobei die C19-Präkursoren von den fetalen Gonaden bereitgestellt werden (PASHEN und ALLEN, 1979; PASHEN et al., 1982). Die biologische Bedeutung der plazentaren Östrogenbiosynthese ist noch in vieler Hinsicht offen. Entsprechende Untersuchungen liegen in erster Linie für Primaten und Labornager vor, wo in Abhängigkeit von von der jeweiligen Spezies den plazentaren Östrogene teilweise im Zusammenwirken mit anderen Faktoren folgende biologische Bedeutungen zugeordnet wurden: Regulation der plazentaren Progesteronsynthese durch Aufregulierung des LDL-Rezeptors und des P450<sub>scc</sub>, Stimulation der Cholesterinsynthese in der fetalen Leber zur Substratbereitstellung für die plazentare Steroidproduktion, Adaptation des maternalen kardiovaskulären Systems an die Bedürfnisse der Gravidität, Regulation des uteroplazentaren Blutflusses, der Neovaskularisation in der fetalen Plazenta, der myometrialen Kontraktilität sowie der Mam-mogenese (Übersicht bei PEPE und ALBRECHT, 1995). Beim Rind liegen diesbezüglich kaum Informationen vor. Bedeutungen für die plazentare Östrogenbiosynthese werden hier primär für den peripartalen Zeitraum unterstellt: Steigerung der myometrialen Kontraktilität, Vorbereitung des weichen Geburtsweges sowie die Stimulation der „Plazentareifung“ und des Nachgeburtsabganges (BIRGEL et al., 1996). Die Anwesenheit plazentarer Östrogene beschränkt sich beim Rind jedoch nicht auf das letzte Trimester der Gravidität. Bereits deutlich vor dem peripheren maternalen Östrogenanstieg um den 100. Graviditätstag sind im fetalen Kompartiment große Mengen plazentarer Östrogene nachweisbar (ELEY et al., 1979). Über biologische Funktionen plazentarer Östrogene in dem langen Zeitraum vor der Geburtsinduktion liegen beim Rind jedoch keine gesicherten Informationen vor.

Hinsichtlich der Vermittlung der Wirkung plazentarer Steroide wird die Signalübertragung über den klassischen Östrogenrezeptor favorisiert (PEPE und ALBRECHT, 1995). Untersuchungen über nichtgenomische Östrogenwirkungen sowie über das Vorkommen und die Bedeutung des Östrogenrezeptors  $\beta$  (s. Kapitel III, Abschnitt 4.2.2.2.) in der Plazenta liegen zur Zeit nicht vor.

#### **1.1.4. Progesteronquellen während der Gravidität und Progesteronwirkungen**

Bei allen untersuchten Säugerspezies sind Gestagene für die Aufrechterhaltung der Gravidität erforderlich. Da es sich in der bei weitem überwiegenden Anzahl der Arten hierbei um Progesteron handelt, soll im folgenden nur noch von diesem Gestagen die Rede sein. In der Frühphase der Gravidität stellt das Corpus luteum graviditatis bei allen Haussäugetieren die einzige quantitativ bedeutsame Progesteronquelle dar. Das Corpus luteum graviditatis bleibt bei einem Teil der Spezies wie beispielsweise dem Schwein oder der Ziege über die gesamte Graviditätsdauer essentiell für die Erhaltung der Trächtigkeit. Bei einer anderen Gruppe von Spezies - wie z.B. Mensch, Pferd oder Schaf - übernimmt die Plazenta nach einer speziesspezifischen Dauer die Funktion als Hauptgestagenquelle (HOFFMANN, 1994). Das Rind nimmt diesbezüglich eine Zwischenstellung ein, da das Corpus luteum zwar stets die überwiegende Mehrheit des im peripheren maternalen Blut zirkulierenden Progesterons synthetisiert. Bei Ausschaltung der Lutealfunktion zwischen dem 180. und 240. Graviditätstag ist die Plazenta in der Mehrzahl der Fälle zur Aufrechterhaltung der Gravidität bis hin zur physiologischen Gestationsdauer in der Lage (ESTERGREEN et al., 1967; DAY, 1977; JOHNSON et al., 1981).

Wesentliche Funktionen des Progesterons im Rahmen der Etablierung und der Erhaltung der Gravidität sind der Schluß der Zervix sowie die Ruhigstellung des Myometriums über die Unterdrückung des myometrialen Oxytocinrezeptors und die Senkung der Verfügbarkeit intrazellulärer Kalziumionen. Darüber hinaus ist Progesteron an der Ausbildung eines besonderen lokalen immunologischen Status an der fetomaternalen Grenzfläche sowie der Regulation der Mammogenese beteiligt. Bei Spezies, bei denen es im Rahmen der Plazentation zur Ausbildung einer Dezidua kommt (Deciduata), ist Progesteron an der Steuerung der als Dezidualisation bezeichneten spezifischen Umbildung des endometrialen Stromas beteiligt (PEPE und ALBRECHT, 1995). Beim Rind, bei dem über eine bestimmte Phase der Gravidität zwei Progesteronquellen – Corpus luteum graviditatis und Plazenta - parallel existieren, wurde bisher noch keine Trennung zwischen den Funktionen des Progesterons plazentaren bzw. lutealen Ursprungs vorgenommen.

### 1.1.5. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur plazentaren Steroidbiosynthese des Rindes

#### 1.1.5.1. Östrogene

Bereits ab dem 33. Graviditätstag sind in der Allantoisflüssigkeit des Rindes Östrogene nachweisbar, welche offensichtlich dem Konzeptus entstammen (ELEY et al., 1979). Der Zeitraum der ersten Nachweisbarkeit graviditätsspezifischer Östrogene im peripheren maternalen Blutplasma erstreckt sich - je nach Autor und Sensitivität der angewandten Methode - vom 50.-110. Graviditätstag. Ab dem 110. Graviditätstag ist dann ein deutlicher Konzentrationsanstieg sowohl im maternalen Plasma als auch im Kot und im Urin nachweisbar. Im Blutplasma handelt es sich hierbei überwiegend um sulfokonjugiertes Estron und in weit geringerem Ausmaß um glucuronidiertes Estradiol-17 $\alpha$ . Die Konzentrationen freier, rezeptoraktiver Östrogene nehmen dagegen erst in den letzten 20-30 Tagen ante partum, besonders deutlich in der letzten Woche vor der Geburt zu und erreichen Maximalwerte im unmittelbaren peripartalen Zeitraum, wobei freies Estron in deutlich höheren Konzentrationen vorliegt als freies Estradiol-17 $\beta$  oder Estradiol-17 $\alpha$  (ROBERTSON und KING, 1975, 1979; MÖSTL et al., 1981; HOFFMANN et al., 1997). Anhand der sowohl hinsichtlich der freien als auch der konjugierten Östrogene ausgeprägten Konzentrationsunterschiede zwischen Blutplasma aus der maternalen Arteria und Vena uterina bzw. der fetalen Arteria und Vena umbilicalis, wobei sich die höheren Konzentrationen in der Vena uterina bzw. Vena umbilicalis fanden, wurde als Syntheseort der graviditätsspezifischen Östrogene beim Rind die Plazenta identifiziert. Auch die nach experimenteller Fetektomie persistierenden hohen Östrogenspiegel im maternalen Plasma sowie der mit der Expulsion der Plazenta korrespondierende Östrogenabfall sprechen für eine Rolle der Plazenta als Quelle der graviditätsspezifischen Östrogene. Weiterhin kann daraus auf eine Unabhängigkeit der Rinderplazenta von Vorstufen aus dem fetalen Kompartiment geschlossen werden (HOFFMANN, 1983).

Auch mittels in vitro-Versuchen konnte die Fähigkeit des fetalen Trophoblasten zur Produktion von Östrogenen aus C21- bzw. C19-Vorstufen bestätigt werden (EVANS und WAGNER, 1981; LARSON et al., 1981; GROSS und WILLIAMS, 1988b; HOEDEMAKER et al., 1990). LARSON et al. (1981) gewannen Trophoblastgewebe von Rindern unmittelbar post partum. Jeweils 0.5 g Gewebe wurden mit  $^3\text{H}$ -Androstendion bzw.  $^3\text{H}$ -Pregnenolon über 8 Stunden bei 37°C in Medium 199 inkubiert. Hierbei wurde Androstendion (A) stärker in Östrogene metabolisiert als Pregnenolon (P5), wobei folgende Östrogene gebildet wurden: Estron (bis zu 44.3% aus A bzw. 32% aus P5), konjugiertes Estron (bis zu 9.5% bzw. 7.3%), Estradiol (2.8% bzw. 0.9%) und konjugiertes Estradiol (0.8% bzw. 0.6%).

EVANS und WAGNER (1981) gewannen Trophoblastgewebe von 4 zwischen dem 115. und dem 270. Graviditätstag geschlachteten Rindern sowie von 2 Rindern unmittelbar nach der Geburt. Jeweils 0.5 g wurden 2.5 bzw. 8 Stunden in Medium 199 mit  $^3\text{H}$ -Androstendion bei 37°C inkubiert. Bereits nach 2.5-stündiger Inkubationsdauer waren die Substratumwandlungen abgeschlossen, wobei Estron (21.0 $\pm$ 5.5%), Estradiol (5.3 $\pm$ 1.7%), konjugiertes Estron

( $2.3 \pm 0.5\%$ ) sowie konjugiertes Estradiol ( $0.8 \pm 0.3\%$ ) gebildet wurden. Weiterhin inkubierten sie Trophoblastgewebe von geschlachteten Rindern bzw. von unmittelbar postpartalen Rindern, bei denen durch Lutektomie am 250. bzw. am 270. Graviditätstag die Geburt induziert worden war. Die Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Androstendion sowie von  $^3\text{H}$ - $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron wurde durch die Geburtsinduktion nicht beeinflusst, der Anteil der Gesamtöstrogene stieg jedoch von  $1.0 \pm 0.7\%$  bei den geschlachteten Rindern auf  $6.1 \pm 5.3\%$  bei dem postpartal gewonnenen Gewebe signifikant an.

Dies ist in Übereinstimmung mit den von GROSS und WILLIAMS (1988b) beschriebenen Befunden. In ihren Untersuchungen wurden jeweils 0.4-0.5 g trypsinbehandeltes Trophoblastgewebe, welches von Kühen 10 Tage vor dem erwarteten Geburtstermin entstammte bzw. zum Zeitpunkt abfallender Progesteronkonzentrationen entnommen wurde, 4 Stunden lang bei  $37^\circ\text{C}$  in 5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit  $^3\text{H}$ -Androstendion bzw.  $^3\text{H}$ -Pregnenolon inkubiert. Während die Östrogenbildungsrate aus Androstendion mit herannahender Geburt nahezu unverändert blieb ( $31.0 \pm 1.9\%$  bzw.  $35.0 \pm 2.7\%$ ), stieg die Östrogenbildungsrate aus Pregnenolon von  $3.0 \pm 0.8$  auf  $23 \pm 0.9$  erheblich an. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der Östrogenanstieg unter der Geburt weniger durch einen Anstieg der Aromataseaktivität bedingt ist, sondern eher auf eine verstärkte Bereitstellung aromatisierbarer Substrate zurückzuführen ist. Im Einklang dazu stehen die Ergebnisse von SCHMITT (1994). In dessen Untersuchungen wurde Trophoblastgewebe von gezielt am 217., 248. und 277. Graviditätstag geschlachteten Tieren entnommen und mit  $^3\text{H}$ -Androstendion als Substrat in Ringer-Lösung unter Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems über 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Hierbei ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Aromataseaktivität. Das Substrat wurde am 217., 248. bzw. 277. Graviditätstag zu  $84 \pm 1\%$ ,  $91 \pm 3$  bzw.  $88 \pm 5\%$  in Östrogene umgewandelt.

TSUMAGARI et al. (1993) untersuchten den Verlauf der Aromataseaktivität in der Mikrosomenfraktion von Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe ab dem 4. Graviditätsmonat bis zur Geburt. Hierbei ergab sich im Kotyledonengewebe - bezogen auf die Proteinmenge - ein zweigipfelter Verlauf: im Probenmaterial vom 5. Graviditätsmonat sowie im unmittelbar postpartal entnommenen Gewebe war die Aromataseaktivität um den Faktor 3-4 höher als zu den Graviditätsmonaten 4 und 6-9. Im Karunkelgewebe wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten unverändert basale Aktivitäten gemessen.

Bei Rind, Schaf und Ziege kommt es unmittelbar vor der Geburt zu einem markanten Östrogenanstieg im maternalen Plasma (CHALLIS, 1971; HENRICKS et al., 1971; THORBURN et al., 1972; HOFFMANN, 1994; SCHULER et al., 1994; FORD et al., 1998). Diese Aktivierung der placentaren Östrogenproduktion am Graviditätsende war beim Schaf Gegenstand intensiver Untersuchungen, während diesbezüglich beim Rind erheblich weniger Informationen vorliegen. Für das Schaf wurde bereits sehr früh erkannt, daß der Östrogenanstieg durch Cortisol aus der fetalen Nebennierenrinde stimuliert wird (CHALLIS, 1971; LIGGINS et al., 1972; THORBURN et al., 1972; ANDERSON et al., 1975; CHALLIS et al., 1977). Während

in älteren Arbeiten der Östrogenanstieg auf eine Steigerung der Aromataseaktivität zurückgeführt wurde (MANN et al., 1975), zeigten neuere Untersuchungen, daß der unmittelbare präpartale Anstieg der Östrogene in erster Linie auf einer Aufregulation der placentaren P450c17 $\alpha$  beruht, während sich die Aromataseaktivität vergleichsweise geringfügig erhöht. Durch vergleichende Inkubation von Progesteron und Pregnenolon wurde der  $\Delta$ 5-Syntheseweg als Haupttroute der placentaren Östrogenproduktion beim Schaf identifiziert (MASON et al., 1989). Auch für das Rind konnte gezeigt werden, daß im letzten Trimester der Gravidität durch Glukokortikoidapplikation ein Anstieg der placentaren Östrogene (MÖSTL et al., 1985; WAGNER et al., 1992) bzw. ein Abort oder eine vorzeitige Geburt induziert werden kann. Die beim Rind vorliegenden in vitro-Befunde hinsichtlich der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen bzw. der Vorgänge auf der Ebene des placentaren Steroidstoffwechsels sind verglichen mit den für das Schaf vorliegenden Daten spärlich und zum Teil auch widersprüchlich. Versuche von GROSS und WILLIAMS (1988b) zeigten, daß durch vierstündige Vorinkubation von trypsinbehandeltem Trophoblastgewebe mit Dexamethason im anschließenden 4-stündigen Inkubationsansatz die Umwandlung von Pregnenolon in Östrogene signifikant gesteigert wurde, während die Umwandlung von Androstendion in Östrogene im entsprechenden Versuchsansatz nicht beeinflusst wurde. Eine Steigerung der Umwandlung von Pregnenolon in Östrogene war nicht nachweisbar, wenn statt der Vorinkubation des Trophoblastgewebes mit Dexamethason der Glukokortikoidzusatz gleichzeitig mit der Substratzugabe erfolgte. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß analog den Verhältnissen beim Schaf auch beim Rind dem präpartalen Östrogenanstieg eine Aktivitätssteigerung der P450c17 $\alpha$  zugrundeliegt und daß diese nicht aus einer direkten Wirkung des Dexamethasons resultiert, sondern über einen Induktionsprozess zustande kommen muß. HOEDEMAKER et al. (1989) konnten bei einer 4-stündigen Inkubation von Trophoblastgewebe weder mit Pregnenolon noch mit Androstendion als Substrat eine Steigerung der Östrogenbildungsrate durch die Supplementierung des Inkubationsmediums mit 70 ng/ml Cortisol erzielen. Bei einer 48-stündigen Inkubationsdauer (HOEDEMAKER et al., 1990) ergab sich dagegen eine dosisabhängige Steigerung der Östrogenbildung aus Pregnenolon durch den Cortisolzusatz zu den Inkubationsansätzen. Im Gegensatz zu GROSS und WILLIAMS (1988b) wurden in einem entsprechenden Inkubationsansatz mit Androstendion als Substrat ebenfalls dosisabhängige Steigerungen der Östrogenbildung beobachtet. Weiterhin führten HOEDEMAKER et al. (1990) Untersuchungen zur Identifizierung des Hauptsyntheseweges der placentaren Östrogenproduktion durch. Bei vergleichender Inkubation von unmittelbar postpartal gewonnenem Trophoblastgewebe mit verschiedenen Substraten wurden folgende Östrogenanteile erzielt: aus Androstendion: 23.0%, aus 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron: 1.8%, aus Progesteron: 1.8%, aus 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon: 11% und aus Pregnenolon: 10.6%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der  $\Delta$ 5-Syntheseweg gegenüber dem  $\Delta$ 4-Syntheseweg der quantitativ bedeutsamere ist.

### 1.1.5.2. Progesteron

Die mittleren Progesteronkonzentrationen im peripheren maternalen Blut steigen beim Rind mit der Anbildung des Trächtigkeitsgelbkörpers an, erreichen maximale Werte um 12-14 ng/ml im ersten Drittel der Gravidität und weisen im weiteren Verlauf der Trächtigkeit einen leichten Abfall im mittleren und letzten Drittel auf. Der steile präpartale Abfall auf Basalniveau erfolgt innerhalb der letzten 24-36 Stunden der Gravidität (HENRICKS et al., 1971; HOFFMANN et al., 1973b; SCHALLENBERGER et al., 1985; BIRGEL et al., 1996). In diesem peripheren Progesteronprofil überlagern sich Progesteron lutealen und plazentaren Ursprungs, wobei das C.l. graviditatis den bei weitem überwiegenden Anteil beisteuert (s.u.).

Die Bedeutung der Plazenta als akzessorische Progesteronquelle wurde in Experimenten zur Ausschaltung der Lutealfunktion während der Gravidität erkannt. Während die Eliminierung der Lutealfunktion vor dem ca. 150.-180. Graviditätstag stets einen Abort induziert (LAURENDALE, 1975; DAY, 1977), wird dagegen im Zeitraum zwischen dem 150./180. und dem 250. Graviditätstag im Falle einer Ovariectomie (ESTERGREEN et al., 1967; CHEW et al., 1979; HOFFMANN et al., 1979), einer Lutektomie (MAC DONALD et al., 1953) oder der Applikation wirksamer Dosen luteolytischer Substanzen (LAURENDALE, 1975; DAY, 1977; JOHNSON et al., 1981) nur bei einem geringen Anteil der Tiere die Gravidität unmittelbar beendet. Diese Ergebnisse wurden als Hinweis auf das Vorhandensein einer extraovariellen Progesteronquelle interpretiert. Der Beitrag der extraovariellen Progesteronquellen zum peripheren maternalen Plasmaspiegel ist jedoch auch in dieser Phase gering. In Untersuchungen von CHEW et al. (1979) erhielten 6 von 8 am 218. Graviditätstag beidseitig ovariectomierten Rindern die Gravidität bis mindestens zum 250. Graviditätstag aufrecht, obwohl die Plasmaspiegel in den ersten vier Tagen post operationem auf Werte unter 1 ng/ml sanken und in den folgenden vier Wochen im Bereich zwischen 1-2 ng/ml lagen.

Anhand positiver arteriovenöser Differenzen zwischen der V. und A. uterina bei Ausschaltung der Lutealfunktion am 250. Graviditätstag konnte die extraovarielle Progesteronquelle im graviden Uterus lokalisiert werden. Diese positive arteriovenöse Differenz war am 270. Graviditätstag nicht mehr nachweisbar. Dies zeigt, daß die Plazenta des Rindes am 250., jedoch nicht mehr am 270. Graviditätstag Progesteron in die Peripherie abgeben kann (PIMENTEL et al., 1986). CONLEY und FORD (1987) wiesen nach Luteolyse bei 200 Tage bzw. 240 Tage tragenden Rindern positive arteriovenöse Differenzen zwischen Karunkelvenen und -arterien nach und identifizierten damit die Plazentome als extraovarielle Progesteronquelle. Nach Schlachtung der 240 Tage tragenden Tiere und Perfusion von Karunkeln bzw. Kotyledonen mit Pregnenolon-haltigem Medium wurden im fetalen Teil der Plazentome eine signifikant höhere Progesteronbildung nachgewiesen. Inkubationen von fetalen bzw. maternalen plazentaren Gewebeverbänden erbrachten gleichgerichtete Ergebnisse. TSUMAGARI et al. (1994) fanden vom 4. Graviditätsmonat bis zur Geburt in den Kotyledonen stets erheblich höhere Progesteron-Gewebskonzentrationen als in den Karunkeln. Diese Untersuchungen zeigen somit, daß die plazentare Progesteronproduktion eher auf der fetalen als auf

der maternalen Seite erfolgt. Durch Verwendung von separierten Zellpräparationen gelang es, den Ort der plazentaren Progesteronproduktion weiter einzugrenzen. Bei der Inkubation von Karunkelzellen bzw. uninukleären Trophoblastzellen ergaben sich vergleichsweise niedrige Umwandlungen für die Metabolisierung von Pregnenolon in Progesteron. Anreicherungen von Trophoblastriesenzellen waren in dieser Hinsicht erheblich aktiver (GROSS und WILLIAMS, 1988b; REIMERS et al., 1985; ULLMANN und REIMERS, 1989). Diese Untersuchungen lassen in der Rinderplazenta die Trophoblastriesenzellen als Hauptprogesteronproduzenten erkennen.

Die quantitative Erfassung der plazentaren Progesteronproduktion über den Verlauf der Gravidität ist beim Rind durch die Überlagerung mit dem lutealen Progesteron schwierig. Die Untersuchungen zur Induzierbarkeit eines Abortes durch Ausschaltung der Lutealfunktion lassen vermuten, daß im 6. bis 7. Graviditätsmonat ein erheblicher Anstieg der plazentaren Progesteronproduktion erfolgt und diese ab dem 8. Monat bis zur Geburt hin deutlich abnimmt. Nach TSUMAGARI et al. (1994) steigen in den Kotyledonen die Gewebekonzentrationen von Progesteron im 7. Graviditätsmonat erheblich an, bleiben jedoch bis zum Ende der Gravidität auf gleichbleibend hohem Niveau. Unter der Geburt kommt es zwar zu einem deutlichen Abfall, es werden jedoch lokal immer noch erhebliche Progesteronkonzentrationen gemessen. Der exakte zeitliche Verlauf und die Bedeutung des präpartalen Abfalls der plazentaren Progesteronproduktion für die Geburtsinduktion sind für das Rind zur Zeit noch weitgehend unklar. Beim Schaf - mit der Plazenta als einziger bedeutender Progesteronquelle in der Spätphase der Gravidität - stellt das Sistieren der plazentaren Progesteronproduktion einen entscheidenden Schritt in der Reaktionskette der geburtsauslösenden Mechanismen dar. Bei dieser Spezies kommt es in der Spätgravidität durch die Ausreifung der fetalen Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zu einer gesteigerten Cortisolproduktion. Cortisol fetalen Ursprungs induziert in der Plazenta die Aufregulierung der P450c17 $\alpha$ , wodurch es zu einer deutlichen Steigerung der plazentaren Östrogenproduktion kommt, welche mit einem Abfall der plazentaren Progesteronproduktion einhergeht. Der Progesteronabfall resultiert hierbei nicht aus einer direkten Umwandlung von Progesteron in Östrogene, vielmehr wird der gemeinsame Präkursor Pregnenolon auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg in Östrogene umgewandelt, wodurch der Progesteronsynthese das Substrat entzogen wird. Einerseits werden damit durch den Progesteronabfall die graviditätserhaltenden Wirkungen des Progesterons aufgehoben, andererseits durch den Östrogenanstieg die plazentare PGF2 $\alpha$ -Produktion stimuliert, wodurch es zur Aktivierung des Myometriums kommt (ANDERSON et al., 1975; LIGGINS et al., 1976; ANDERSON et al., 1978a, 1978b; FLINT et al., 1978, 1979; RICKETTS et al., 1980; FRANCE et al., 1988; MASON et al., 1989; THORBURN, 1991). Für das Rind sind diese Abläufe bis jetzt nur teilweise belegt, eine ähnliche Ereigniskette ist jedoch sehr wahrscheinlich. So wurde nachgewiesen, daß Glukokortikoide im geburtsnahen Zeitraum die plazentare Östrogensynthese stimulieren (MÖSTL et al., 1985; WAGNER et al., 1986, 1992) und die Geburt induzieren können (HOFFMANN et al., 1973b; EVANS und WAGNER, 1976;

JOHNSON et al., 1981). Beim Vergleich der geburtsinduzierenden Mechanismen zwischen Rind und Schaf ist jedoch zu berücksichtigen, daß beim Rind im Gegensatz zum Schaf das Corpus luteum bis unmittelbar vor die Geburt die Hauptprogesteronquelle darstellt (Übersicht bei HOFFMANN, 1994).

## **1.2. Eigene Untersuchungen**

### **1.2.1. Untersuchungsziele**

Obwohl das Auftreten graviditätsspezifischer Östrogene im peripheren maternalen Blut bei vielen Säugerspezies seit langem bekannt ist, liegen beim Rind kaum gesicherte Informationen über deren biologische Bedeutung sowie über den detaillierten Ablauf der zugrundeliegenden Synthesekette vor. Die Fähigkeit der Rinder-Kotyledonen zur Bildung von Östrogenen aus Pregnenolon wurde bereits in verschiedenen *in vitro*-Systemen nachgewiesen (EVANS und WAGNER, 1981; LARSON et al., 1981; GROSS und WILLIAMS, 1988b). Schwerpunktmäßig zielten diese Untersuchungen jedoch auf die Östrogenbildung ab, die auftretenden Zwischenprodukte wurden nicht bzw. nur unvollständig erfaßt. In der eigenen Arbeit sollten die möglichen Synthesewege, d.h. der  $\Delta 4$ - bzw. der  $\Delta 5$ -Syntheseweg, in ihre einzelnen Schritte zerlegt und diese gesondert untersucht werden. Dabei wurde durch den Einsatz geeigneter HPLC-Verfahren bei der Probenanalyse eine möglichst vollständige Erfassung aller Metaboliten angestrebt. In einem ersten Schritt dieser Studien charakterisierte SCHMITT (1994) die Umwandlung von Androstendion in Östrogene.

Der *in vitro*-Ansatz wurde bewußt gewählt, da bei *in vivo*-Methoden, wie z.B. Messungen von Hormonkonzentrationen im peripheren maternalen Plasma oder im Blut von uterinen Gefäßen, durch Überlagerungen mit peripheren Umwandlungsprozessen, Plasmabindungen oder Ausscheidungsprozessen Veränderungen im plazentaren Steroidstoffwechsel mehr oder weniger stark maskiert werden können. Als Untersuchungszeitpunkte wurden der 220. und der 270. Graviditätstag sowie der Zeitpunkt der termingerechten Geburt ausgewählt. Mit der Auswahl des 220. Graviditätstages wurde die Charakterisierung des plazentaren Steroidstoffwechsels zu einem Zeitpunkt beabsichtigt, an dem - wie frühere *in vivo*-Experimente vermuten lassen - ein erheblicher Anteil der plazentaren Steroidproduktion in die Synthese von Progesteron mündet (s. Abschnitt 1.1.5.2.). Am 270. Graviditätstag steht dagegen nach peripheren Hormonprofilen eindeutig die Östrogenproduktion im Vordergrund (s. Abschnitt 1.1.5.1.). Von einem Vergleich zwischen den am 270. Graviditätstag geschlachteten Tieren und den Kühen zum Zeitpunkt der Geburt wurden Erkenntnisse über geburtsbedingte Veränderungen im plazentaren Steroidstoffwechsel erhofft.

### **1.2.2. Material und Methoden**

#### **1.2.2.1. Tiermaterial und Probenentnahme**

Für die Versuche zur Etablierung des *in vitro*-Inkubationssystems sowie zur Charakterisierung des plazentaren Steroidstoffwechsels zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt wurden von Patientinnen der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Giessen im Rahmen von Schnittentbindungen einzelne Plazentome entnommen. Voraussetzung für die Einbeziehung in die Untersuchungen war der Ablauf einer physiologischen Graviditätsdauer und die Entwicklung eines klinisch gesunden, vitalen Kalbes. Zur Gewinnung von Probenmaterial am 220. bzw. 270. Graviditätstag

wurden Tiere mit bekanntem Besamungsdatum geschlachtet und jeweils 20-30 Plazentome unmittelbar nach der Betäubung der Tiere mittels Bolzenschußapparat und Eröffnung der A. carotis und V. jugularis entnommen. Die Plazentome wurden sofort nach der Entfernung aus dem Uterus in eisgekühlten PBS-Puffer verbracht und innerhalb von 30 Minuten in das Labor transportiert, wo unverzüglich mit der Aufbereitung des Probenmaterials begonnen wurde.

Von den am 220. bzw. 270. Graviditätstag geschlachteten Tieren wurden unmittelbar vor der Betäubung Blutproben aus der A. bzw. V. coccygea zur Bestimmung von Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma gewonnen. Die Probenentnahme bei den zugehörigen Feten bzw. Kälbern erfolgte aus den Nabelgefäßen (Tag 220) bzw. aus der V. jugularis (Tag 270).

### **1.2.2.2. Präparation und Homogenisierung des Gewebes**

Alle Präparationsschritte wurden, soweit möglich, unter einer Sterilwerkbank (LaminAir, Haereus) unter Kühlung des Probenmaterials, der Gerätschaften und Lösungen auf 0-4°C durchgeführt. Die Plazentome wurden zunächst mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen, bis kein anhaftendes Blut mehr zu erkennen war. Anschließend wurden sie halbiert und die Kolyedonen mit einer Pinzette durch vorsichtigen Zug von den Karunkeln getrennt. Mittels einer Skalpellklinge wurden die Chorionzotten von den bindegewebigen Chorionplatten der Kolyedonen abgeschabt. Ca. 10 g des so erhaltenen Gewebebreis wurden jeweils in einem vierfachen Volumen Ringerlösung DAB7 suspendiert und bei 450 g und 0°C für 3 Minuten zentrifugiert. Dadurch lagerten sich die im Epithelbrei enthaltenen Erythrozyten bevorzugt an der Oberfläche des Sediments ab, wo sie zusammen mit dem Überstand abgesaugt wurden. Dieser Waschvorgang wurde sooft wiederholt, bis nach dem Zentrifugieren keine Erythrozytenablagerungen mehr erkennbar waren und der Überstand klar blieb. Der gewaschene Gewebebrei wurde gewogen und in Ringer-Lösung mit einem 2.5%igen Zusatz eines 1 M HEPES-Puffers (v/v) suspendiert. Für die in den Abschnitten 1.2.2.3.8.1. und 1.2.2.4. beschriebenen Versuche wurde das Verhältnis zwischen Gewebebrei und Suspensionsmedium so gewählt, daß nach der Homogenisation in 1 ml Homogenat 500 mg Frischgewebe enthalten waren. Für die in Abschnitt 1.2.2.3.8.2. beschriebenen Experimente wurde das Verhältnis auf 250 mg Gewebe pro 1 ml Homogenat eingestellt. Anschließend erfolgte die Aufschließung des Gewebes mittels eines Homogenisators (Ultra-Turrax). Hierbei wurde die Gewebesuspension dreimal 10 Sekunden mit einminütigen Pausen unter Eiskühlung zerkleinert.

Der Proteingehalt der von den sechs geschlachteten Rindern gewonnenen Homogenate wurde mittels ProteinAssay Kit II (Bio-Rad) bestimmt. Homogenate mit einer Gewebemenge von 250 mg in 1 ml Homogenat enthielten  $8.47 \pm 1.14$  mg/ml Protein. Homogenate mit 500 mg Gewebebrei in 1 ml Homogenat wiesen eine Proteinkonzentration von  $16.44 \pm 1.27$  mg/ml auf.

### 1.2.2.3. Untersuchungen nach Zugabe exogener Substrate

#### 1.2.2.3.1. Herstellung der $^3\text{H}$ -Substratlösungen

Aus den methanolischen Stammlösungen der jeweiligen  $^3\text{H}$ -markierten Steroide wurden Arbeitsverdünnungen in Ringerlösung DAB7 mit einem Zusatz von 0.1% bovinem Serumalbumin hergestellt. Die Aktivität der Arbeitsverdünnungen wurde auf 50000 cpm/100  $\mu\text{l}$  ( $\hat{=}$  1515 Bq/100  $\mu\text{l}$ ) eingestellt. In Tabelle 1 sind die Art der Markierungen, spezifischen Aktivitäten und die in die Versuchsansätze eingebrachten Substratmengen aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über Markierungen, spezifische Aktivitäten und die 50000 cpm entsprechenden Mengen der verwendeten  $^3\text{H}$ -markierten Substrate.

Substrat	Markierung	Spez. Aktivität [TBq/mmol]	pmol/50000 cpm
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$	2.16	0.70
Progesteron	1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$	4.10	0.37
Pregnenolon	7- $^3\text{H}$	0.87	1.74
Pregnenolon *	4, 7- $^3\text{H}$	0.37	4.10
DHEA	1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$	3.28	0.46

\* zweifach markiertes  $^3\text{H}$ -Pregnenolon wurde nur bei dem in Abschnitt 1.2.2.3.8.1. beschriebenen Versuch zum Einfluß der Cofaktorsupplementierung des Inkubationsmediums verwendet

#### 1.2.2.3.2. Inkubationsmedium

Als Inkubationsmedium diente Ringer-Lösung DAB7 (B. Braun, D-34212 Melsungen) mit einem 2.5%igen Zusatz eines 1 molaren HEPES-Puffers (Sigma Chemicals, D82041 Deisenhofen), welche mit einem NADPH- sowie einem  $\text{NAD}^+$ -regenerierenden System supplementiert wurde. Das NADPH-regenerierende System bestand - bezogen auf 1 ml Inkubationsmedium - aus 6 U Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, 8.52 nmol Glukose-6-phosphat (Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim) und 0.78 nmol  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  (Fluka Biochemicals, D-89231 Neu-Ulm). Das  $\text{NAD}^+$ -regenerierende System setzte sich aus 120 nmol  $\text{NAD}^+$ , 1.8 U Laktatdehydrogenase (beide Sigma Chemicals, D-82041 Deisenhofen) und 4.8 mmol Pyruvat (Merck, D-64293 Darmstadt) pro ml Inkubationsmedium zusammen. Für die in Abschnitt 1.2.2.3.8.2. beschriebenen Versuche wurde dem Inkubationsmedium weiterhin 0.1 Prozent BSA zugegeben, um einem Anhaften der Steroide an den Glasoberflächen der Reaktionsgefäße entgegenzuwirken.

Ein Teil der Experimente wurde nach Zugabe erhöhter Substratmengen zu den Inkubationsansätzen durchgeführt. Die Erhöhung der Substratmenge wurde bewerkstelligt, indem zusätzlich zu den  $^3\text{H}$ -markierten Substraten das Inkubationsmedium mit einer entsprechenden Konzentration

ration an nichtmarkiertem Substrat supplementiert wurde. Der korrekte Substratgehalt der Medien wurde radioimmunologisch überprüft.

### 1.2.2.3.3. Durchführung der Inkubationen

Die Inkubationsansätze bestanden jeweils aus 1 ml Medium, 100 µl Substratlösung und 200 µl Gewebehomogenat. In den in Abschnitt 1.2.2.3.8.1. beschriebenen Versuchen wurden die einzelnen Komponenten in dieser Reihenfolge in die für die Inkubation genutzten 15 ml-Extraktionsröhrchen einpipettiert. Durch die Zugabe des Homogenates wurden die Reaktionen gestartet. Die Inkubation erfolgte in einem Wärmeschüttelbad bei 37°C. In den in Abschnitt 1.2.2.3.8.2. dargestellten Experimenten wurde aus technischen Gründen die Reihenfolge des Einpipettierens geändert: zunächst wurden in die im Eiswasserbad gekühlten Inkubationsröhrchen das Gewebehomogenat und die jeweilige <sup>3</sup>H-Substratlösung gegeben. Wie Vorversuche ergaben, finden unter diesen Bedingungen auch über einen längeren Zeitraum kaum Umwandlungen statt (HARTUNG, 1995). Zum Inkubationsstart wurden dann die Probenröhrchen gleichzeitig in ein 37°C warmes Wasserbad verbracht und das Cofaktor-haltige Inkubationsmedium zugegeben. Ziel dieser Änderungen im Versuchsprotokoll war es, auch bei großen Probenzahlen die zeitliche Verzögerung des Inkubationsstarts zwischen den einzelnen Probenansätzen sowie den Cofaktor-Verbrauch vor dem eigentlichen Inkubationsstart zu minimieren. Nach Ablauf der maximal 20-minütigen Inkubation wurden die Inkubationen durch Verbringen der Ansätze in ein Ethylalkohol-Trockeneisbad (-53°C) abgestoppt und bis zum Beginn der Analyse bei -20°C gelagert. In den Experimenten wurden als negative Kontrollen Medien- bzw. Gewebeleerwerte mitgeführt und 20 Minuten inkubiert. Die Medienleerwerte (MLW) bestanden aus Cofaktor-haltigem Medium und dem jeweiligen <sup>3</sup>H-markierten Substrat. Den Gewebeleerwerten (GLW) wurden darüber hinaus 200 µl hitzeinaktiviertes (100°C, 45 Minuten) Homogenat zugesetzt. Die Inkubationen erfolgten im Einfach- oder Doppelansatz (Abschnitt 1.2.2.3.8.1.) bzw. im Vierfachansatz (Abschnitt 1.2.2.3.8.2.).

### 1.2.2.3.4. Extraktion

Die tiefgefrorenen homogenathaltigen Inkubationsansätze wurden mit je 3 ml Toluol, die Medienleerwerte zur Verhinderung der dort verstärkt auftretenden Emulsionsbildungen mit jeweils 3.5 ml Toluol überschichtet und im Rotationsmischer bei Raumtemperatur 15 Minuten über Kopf rotiert. Nach kurzer Zentrifugation (3 min. bei 2500 g) wurde die wässrige Phase im Ethylalkohol-Trockeneisbad gefroren und der Toluolüberstand in Extraktionsröhrchen dekantiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde dreimal wiederholt. Der gesammelte Toluolextrakt wurde bei 40°C niedertrocknet (HBI Vortex-Evaporator). Die wässrige Phase wurde nach Abschluß der Extraktion wieder bei -20°C eingefroren und für stichprobenartig durchgeführte Bilanzuntersuchungen aufbewahrt. Der niedertrocknete Extrakt wurde in 1.6 ml Methanol rückgelöst und mit 2.4 ml Aqua dest. gemischt (entspricht einer 40%igen methano-

lischen Lösung). Diese Präparation wird im folgenden als Primärextrakt bezeichnet. Die Extraktionsausbeute lag bei  $91.0 \pm 3.2\%$  ( $n=19$ ).

### 1.2.2.3.5. Chromatographische Vorreinigung

Zur Entfernung extrem hydrophober Inhaltsstoffe wurden die Primärextrakte chromatographisch vorgereinigt. Dazu wurden mit Octadecylgruppen beschichtetes Silicagel enthaltende Kartuschen (Bakerbond spe-Trennsäulen C18) in Verbindung mit dem Baker spe-10\* Column Processing System (Baker Inc., Groß-Gerau) verwendet. Die Kartuschen wurden mit 1 ml Methanol vorgereinigt bzw. aktiviert und anschließend mit 3 ml 40%igem Methanol äquilibriert. Der Primärextrakt wurde auf die Kartusche aufgetragen und das resultierende Eluat (EI) stichprobenweise für Bilanzmessungen aufgefangen. Die auf der Kartusche adsorbierten Steroide wurden mit 1.5 ml 95%igem Methanol eluiert (EII). Anschließend wurden die Kartuschen mit 2 ml Methanol nachgespült (EIII). Auch hiervon wurden Stichproben für Bilanzmessungen gesammelt. EI und EIII wurden im Vortex-Evaporator, EII im Vakuumtrockenschrank bei jeweils  $40^{\circ}\text{C}$  niedertrocknet. Das niedertrocknete Eluat II wurde in  $220 \mu\text{l}$  20% Methanol rückgelöst und bis zur HPLC-Trennung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Bestimmung der bei der chromatographischen Vorreinigung auftretenden Aufbereitungsverluste wurde die  $^3\text{H}$ -Aktivität der Eluate I und III nach Niedertrocknen und Zugabe von Szintillatorflüssigkeit bestimmt. Weiterhin wurden zu Kontrollzwecken die  $^3\text{H}$ -Aktivität in einigen der Röhren, die ursprünglich den Primärextrakt enthielten, gemessen. Die  $^3\text{H}$ -Aktivitäten der entsprechenden Eluate II wurden nach HPLC-Trennung als Summe der Aktivitäten der zugehörigen Fraktionen berechnet. Die Wiederfindungsbilanz für diese Aufbereitungsschritte ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Bilanz der Wiederfindung für die Substrate  $^3\text{H}$ -17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron ( $^3\text{H}$ -17 $\alpha\text{OH-P4}$ ),  $^3\text{H}$ -Progesteron ( $^3\text{H-P4}$ ) und  $^3\text{H}$ -Pregnenolon ( $^3\text{H-P5}$ ) über die chromatographische Vorreinigung: prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

	Substrat und Verteilung der $^3\text{H}$ -Aktivität		
	$^3\text{H}$ -14 $\alpha\text{OH-P4}$ ( $n=6$ )	$^3\text{H-P4}$ ( $n=12$ )	$^3\text{H-P5}$ ( $n=99$ )
<b>% cpm im leeren Behältnis (Primärextrakt)</b>	$1.0 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.3$	$1.3 \pm 0.2$
<b>% cpm in Eluat I</b>	$1.3 \pm 0.8$	$1.4 \pm 0.9$	$2.6 \pm 2.3$
<b>% cpm in Eluat II</b>	$97.5 \pm 0.7$	$97.3 \pm 1.3$	$95.9 \pm 2.4$
<b>% cpm in Eluat III</b>	$0.3 \pm 0.0$	$0.4 \pm 0.1$	$0.4 \pm 0.2$

### 1.2.2.3.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die in den aufbereiteten Proben (EII) enthaltenen Steroide wurden mittels HPLC getrennt. Die verwendete HPLC-Anlage setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Degaser ERC-3612, Erma Inc., Japan
- Gradient Former 425, Kontron Instruments, Eching
- Zweikolbenpumpe HPLC Pump 429, Kontron Instruments, Eching
- HPLC-Autosampler 360, Kontron Instruments, Eching
- Vorfilter: REPL 0.5  $\mu\text{m}$  x 3 mm, Rheodyne Inc., California, USA
- Vorsäule: Lichrospher RP18-Säule, 30 x 3 mm, E. Merck, Darmstadt
- Hauptsäule: Lichrosorb RP18-Glaskartusche, 150 x 3 mm, E. Merck, Darmstadt
- Säulenmantel: Eigenbau mit angeschlossenem Wärmeumwälzbad
- Fraktionssammler Fraction Collector Frac-100, Pharmacia, Freiburg

Die Anlage wurde über einen PC mittels eines an der seriellen Schnittstelle angeschlossenen Multiports (Kontron Instruments, Eching) gesteuert.

Die Chromatographie erfolgte unter isothermen Bedingungen bei 40°C mit einer konstanten Flußrate von 0.5 ml/min. Zunächst wurde das Trennsystem über 10 min. mit einem Gemisch aus Methanol und Aqua dest. (1:1; v/v) konditioniert. Diese mobile Phase wurde bis zur 39. Minute nach Probeninjektion beibehalten. Von der 39. bis zur 70. Minute der Trennung wurde ein Methanol-Wasser-Gemisch (13:7; v/v) eingesetzt. Abschließend wurde die Säule zur Entfernung apolarer Kontaminationen 10 Minuten mit reinem Methanol gespült. Die Sammlung des Eluates erfolgte vom Zeitpunkt der Probeninjektion bis zur 70. Minute danach. Zur Erfassung der Reaktionsprodukte wurde zunächst mindestens ein Eluat der Mehrfachbestimmungen einer 5 und einer 20 Minuten lang inkubierten Probe in einminütigen Fraktionen gesammelt und die Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität festgestellt. Anhand der ermittelten Retentionszeiten erfolgte die Identifizierung der Peaks durch Vergleich mit den Retentionszeiten  $^3\text{H}$ -markierter Standardsubstanzen. Für die verbleibenden Proben des jeweiligen Inkubationsansatzes wurde die Anlage so programmiert, daß jeweils die kompletten Peaks in einer Fraktion gesammelt wurden.

Bei allen Chromatographien von Standardsubstanzen sowie bei Inkubationsansätzen unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat konnte dieses als interner Standard herangezogen und die Retentionszeiten der erfassten Steroide bezogen auf die Retentionszeit des Pregnenolon (relative Retentionszeit = 1.0) ausgedrückt werden. Die Retentionszeiten wurden auf diese Weise täglich überprüft. Die Ergebnisse dieser Kontrollen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Abbildung 2 zeigt das Chromatogramm einer Trennung  $^3\text{H}$ -markierter Standardsubstanzen. Hieraus ist zu erkennen, daß sich die Elutionsprofile von Dehydroepiandrosteron (DHEA) und 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon (OH-P5) erheblich überschneiden. Daher wurden diese beiden Steroide bei der Analyse unter der Bezeichnung DHEA/OH-P5 gemeinsam erfasst.

Tabelle 3: Mittlere relative Retentionszeit ( $\bar{x}$  = arithmetrischer Mittelwert; SD = Standardabweichung) von Estron (E1), Androstendion (A), 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (OH-P4), Dehydroepiandrosteron (DHEA), 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon (OH-P5) und Progesteron (P4) in der angewandten HPLC-Trennmethode. Die Retentionszeit von Pregnenolon wurde gleich 1.0 gesetzt.

Säule	n	relative Retentionszeit ( $\bar{x} \pm SD$ )					
		E1	A	OH-P4	DHEA	OH-P5	P4
1	5	0.42 $\pm$ 0.00	0.49 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.00		0.88 $\pm$ 0.00
2	10	0.43 $\pm$ 0.00	0.51 $\pm$ 0.00	0.61 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.01		0.88 $\pm$ 0.00
3	27	0.41 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01		0.90 $\pm$ 0.01
4	11	0.42 $\pm$ 0.00	0.52 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.00		0.89 $\pm$ 0.00
5	22	0.41 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.01	0.88 $\pm$ 0.01
<b>total</b>	75	0.42 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.01		0.89 $\pm$ 0.01

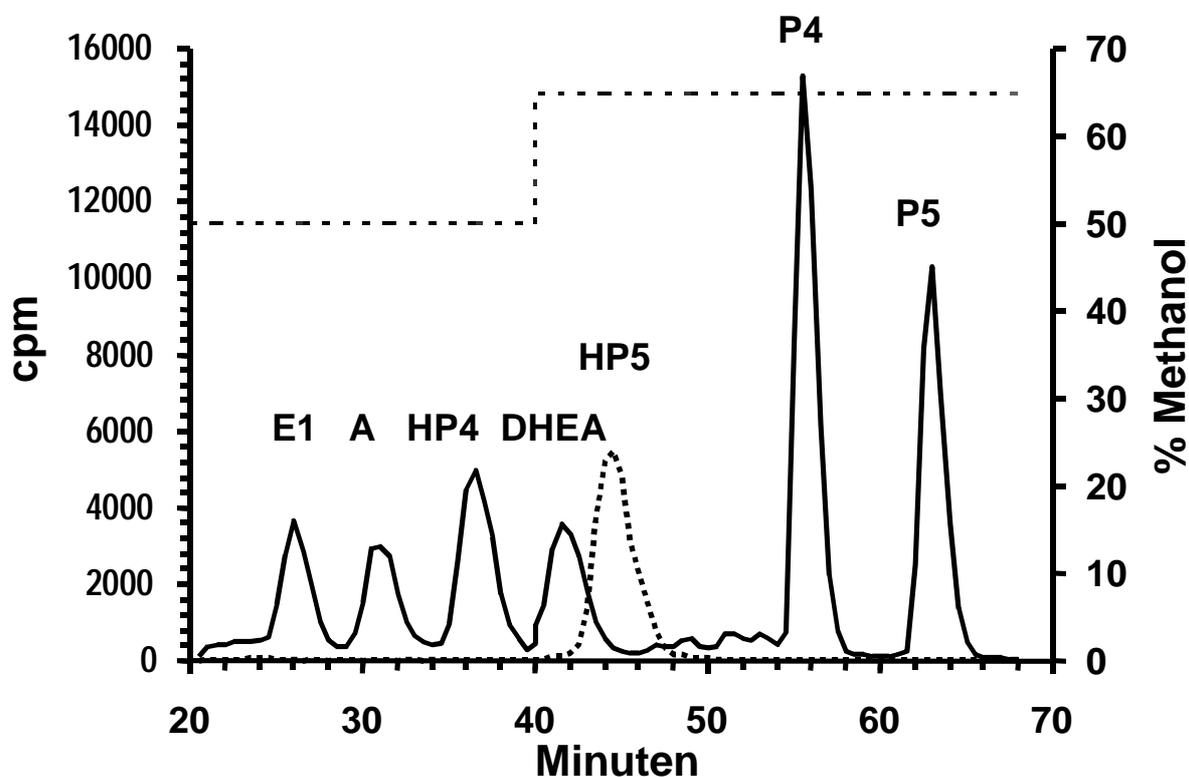


Abb. 2: Trennprofil der angewandten HPLC-Methode bei der Chromatographie  $^3\text{H}$ -markierter Standardsubstanzen.  $^3\text{H}$ -17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon wurde einzeln, die übrigen Steroide wurden als Gemisch chromatographiert.

Trennbedingungen:

Vorsäule: Lichrospher RP18, 30 x 3 mm, E. Merck, Darmstadt

Säule: Lichrosorb RP18, 150 x 3 mm, E. Merck, Darmstadt

Flußrate: 0.5 ml/min.

Temperatur: 40°C

mobile Phase: 0.-39. min.: Methanol/H<sub>2</sub>O=1:1 (v/v);

40.-70. min.: Methanol/H<sub>2</sub>O=13:7 (v/v); Stufengradient.

### 1.2.2.3.7. Erfassung der $^3\text{H}$ -Impulse in den HPLC-Fractionen und Berechnung der Substratumwandlung

Bei fraktionierter Sammlung in 0.5 ml Eluat-Portionen wurden diese in 5 ml-Vials (Zinsser minis 2000) aufgefangen und die darin enthaltene  $^3\text{H}$ -Aktivität nach Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen. Wurden die Peaks komplett als jeweils eine Fraktion gesammelt (s. Abschnitt 1.2.2.3.6.), ergaben sich dadurch deutlich größere Eluat-Portionen. Alle Fraktionen mit einem Volumen von mehr als 0.5 ml wurden in Glasvials aufgefangen und vor der Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit niedertrocknet.

Zur Auswertung der HPLC-Chromatogramme wurde zunächst die gesamte eluierte  $^3\text{H}$ -Aktivität bestimmt, die sich aus der insgesamt erfaßten  $^3\text{H}$ -Aktivität abzüglich des gerätebedingten, technischen Backgrounds von 20 cpm für jede der 0.5 ml umfassenden Fraktionen ergab. Bei der Chromatographie der Gewebeleerwerte zeigte sich, daß bedingt durch Verunreinigungen der Standardsubstanzen über das gesamte Chromatogramm verteilt außerhalb der den Standardsubstanzen entsprechenden Fraktionen  $^3\text{H}$ -Aktivitäten oberhalb des technischen Backgrounds gemessen wurden. Daher erfolgte zusätzlich die Bestimmung des substratspezifischen Backgrounds. Dazu wurde nach Korrektur mit dem technischen Background die nicht auf den jeweiligen Substratpeak fallende  $^3\text{H}$ -Aktivität des Gesamteluats erfasst und die mittlere, auf eine 0.5 ml-Fraktion entfallende  $^3\text{H}$ -Aktivität berechnet. Von der den einzelnen Peaks entsprechenden  $^3\text{H}$ -Aktivität wurde dann das Produkt aus diesem Mittelwert  $\times$  Anzahl der entsprechenden Fraktionen subtrahiert, sodaß die im Ergebnisteil dargestellten Meßwerte um den substratspezifischen Background korrigierte Ergebnisse darstellen.

Bei den in Abschnitt 1.2.2.3.8.1. beschriebenen Versuchen wurde nach Ermittlung der auf die einzelnen Peaks entfallenden  $^3\text{H}$ -Aktivität nach Abzug des technischen Backgrounds (Szintillationszähler) und eines substratspezifischen Backgrounds (Verunreinigungen der  $^3\text{H}$ -markierten Substrate) die auf die einzelnen identifizierten Steroide entfallenen prozentualen Anteile berechnet. Bei Doppelbestimmungen wurde der arithmetische Mittelwert beider Meßwerte gebildet.

Bei den in Abschnitt 1.2.2.3.8.2. beschriebenen Experimenten wurden von den vier inkubierten Parallelansätzen zunächst zwei Proben wie oben beschrieben analysiert. Wichen die dabei gemessenen Aktivitäten von Metaboliten mit einem Anteil von mehr als 15% der Gesamtaktivität mehr als 10% vom jeweiligen Mittelwert ab, so wurde zur Erhöhung der Präzision eine dritte Probe ausgewertet. Alle ausgewerteten Proben gingen in die Berechnung der jeweiligen Mittelwerte ein. Aus den so errechneten Mittelwerten der Parallelinkubationen der einzelnen Tiere wurden die arithmetischen Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der jeweiligen Versuchsgruppen berechnet.

Da sich die Verunreinigungen der  $^3\text{H}$ -markierten Substrate bei der Chromatographie teilweise ungleichmäßig über die Chromatogramme verteilten, wurden zur Peak-Identifizierung aus den ermittelten substratspezifischen Background-Werten (in cpm/0.5 ml-Fraktion) jeweils der geometrische Mittelwert und der Streufaktor berechnet. Das Produkt aus geometrischem Mittelwert und Streufaktor wurde für die einzelnen Peaks der Chromatogramme mit der

Sammelzeitspanne multipliziert. Die Peaks wurden als „positiv“, d.h. einen Metaboliten enthaltend, eingestuft, wenn die entsprechende  $^3\text{H}$ -Aktivität über dem oben definierten Limit lag. Daraus ergab sich, daß bei Verwendung von  $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat alle Peaks mit einem  $^3\text{H}$ -Anteil größer als 0.72% als „echte“ Metaboliten erkannt wurden. Für die Substrate  $^3\text{H}$ -Progesteron und  $^3\text{H}$ -17 $\alpha$ -Progesteron lagen die entsprechenden Grenzwerte bei 2.16% bzw. 2.34%.

Zur statistischen Prüfung auf Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bzw. zwischen den verschiedenen Inkubationszeitpunkten innerhalb eines Versuchs wurde der t-Test für unverbundene bzw. verbundene Stichproben angewandt (SACHS, 1984).

### 1.2.2.3.8. Versuchsaufbau

#### 1.2.2.3.8.1. Methodische Untersuchungen zum Einfluß der Cofaktorsupplementierung des Inkubationsmediums bzw. der Substratmenge auf die Substratumwandlung

##### *1) Untersuchungen zur Etablierung eines geeigneten Inkubationsmediums - Bedeutung des Zusatzes der Cofaktoren NADPH und $\text{NAD}^+$*

SCHMITT (1994) hatte bei der Etablierung seines Inkubationssystems zur Darstellung der Aromataseaktivität verschiedene Medien getestet und dabei die höchste Östrogenbildung bei der Verwendung von Ringer-Lösung unter Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems erhalten. Um im Hinblick auf große Probenreihen vom Brutschrank unabhängig zu werden, wurden diesem Medium in den eigenen Untersuchungen 2.5 Volumenprozent eines 1 M HEPES-Puffers zugesetzt (REIMERS et al., 1985). Da mit diesem Inkubationsmedium in hier nicht weiter dargelegten Voruntersuchungen die Darstellung der  $3\beta$ -HSD-Aktivität nicht reproduzierbar war (ADIANI, 1995), sollte der Einfluß einer  $\text{NAD}^+$ -Supplementierung des Inkubationsmediums überprüft werden. Auf die Funktion von  $\text{NAD}^+$  als Coenzym der  $3\beta$ -HSD hatten unter anderem BERNIER et al. (1984), BRANDT und LEVY (1989) sowie COOKE (1989) hingewiesen. Zur Überprüfung der Frage, ob in den eigenen Versuchsansätzen die Verfügbarkeit von  $\text{NAD}^+$  für die Darstellung der  $3\beta$ -HSD-Aktivität ein limitierender Faktor ist, wurde neben dem bisher eingesetzten NADPH-regenerierenden System ein  $\text{NAD}^+$ -regenerierendes System in aufsteigenden Mengen von 0.5, 1, 2 und 4 Einheiten pro ml zum Inkubationsmedium gegeben, wobei als eine Einheit  $\text{NAD}^+$ -regenerierendes System definiert wurde:

- 120 nmol  $\text{NAD}^+$
- 1.8 U Laktatdehydrogenase
- 4.8  $\mu\text{mol}$  Pyruvat

Das Probenmaterial entstammte einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt. Als Substrate wurden pro Ansatz 4.1 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon bzw. 0.46 pmol  $^3\text{H}$ -DHEA eingesetzt. Von den Versuchsansätzen unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat wurden jeweils zwei Parallelproben mit einer Inkubationsdauer von 5 bzw. 20 Minuten analysiert. Von den parallel inkubierten Proben mit  $^3\text{H}$ -DHEA als Substrat wurden die 2 bzw. 5 min. inku-

bierten Proben im Doppelansatz ausgewertet, die Ergebnisse der 20 minütigen Inkubationen liegen als Einzelbestimmungen vor.

### *II) Untersuchungen zum Einfluß der Menge des Substrats auf dessen Metabolisierung*

Zur Abschätzung, inwieweit die Menge des exogenen Substrats das Ergebnis der Inkubation beeinflusst, wurden in parallelen Versuchsansätzen aufsteigende Substratmengen eingesetzt. Dieser Versuch wurde mit Pregnenolon bzw. DHEA als Substrat durchgeführt. Die Erhöhung der Substratkonzentration wurde bewerkstelligt, indem neben der Zugabe einer konstanten Menge des  $^3\text{H}$ -markierten Substrats (1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon bzw. 0.46 pmol  $^3\text{H}$ -DHEA) 1, 10 bzw. 1000 pmol des jeweiligen nichtmarkierten Substrats mit dem Inkubationsmedium in die Inkubationsansätze eingebracht wurden. Das Probenmaterial entstammte einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt. Die Inkubationszeiten betragen 5 und 20 Minuten (Pregnenolon) bzw. 1, 2, 5, und 20 Minuten (DHEA). Die Auswertung erfolgte im Doppelansatz.

### **1.2.2.3.8.2. Untersuchungen zur Metabolisierung von Pregnenolon, Progesteron und $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron in Abhängigkeit vom Graviditätszeitpunkt**

#### *I) Metabolisierung von Pregnenolon*

a) Am 220. bzw. 270. Graviditätstag sowie unmittelbar post partum gewonnenes Kotyledonen-Homogenat (jeweils drei Tiere pro Gruppe) wurde mit 1.74 pmol/Ansatz  $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat inkubiert.

b) Um die relativen Kapazitäten der an der Umwandlung von Pregnenolon beteiligten Enzymsysteme in Abhängigkeit vom Untersuchungsstadium abzuschätzen, wurden am 220. und 270. Graviditätstag (jeweils drei Tiere pro Gruppe) Inkubationen mit erhöhten Substratmengen durchgeführt. Als Substrat wurden pro Ansatz 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon plus 100 pmol nichtmarkiertes Pregnenolon bzw. 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon plus 1 nmol nichtmarkiertes Pregnenolon eingesetzt.

c) Um die Metabolisierung von Pregnenolon auf dem  $\Delta^5$ -Syntheseweg zu untersuchen, wurden am 220. (n=3) bzw. 270. Graviditätstag (n=2) gewonnene Gewebekomponenten mit jeweils 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon und einem Zusatz von 20 nmol pro Ansatz des kompetitiven  $3\beta$ -HSD-Hemmers Trilostan<sup>2</sup> inkubiert.

#### *II) Metabolisierung von Progesteron*

Am 220. bzw. 270. Graviditätstag sowie unmittelbar post partum gewonnenes Gewebekomponenten (jeweils drei Tiere pro Gruppe) wurde mit 0.37 pmol/Ansatz  $^3\text{H}$ -Progesteron als Substrat inkubiert.

---

<sup>2</sup> Der Firma Sanofi Winthrop, Fawdon upon Tyne, UK sei für die Bereitstellung dieser Substanz herzlich gedankt.

### ***III) Metabolisierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron***

Am 220. bzw. 270. Graviditätstag gewonnenes Gewebehomogenat (jeweils drei Tiere pro Gruppe) wurde mit 0.70 pmol/Ansatz  $^3\text{H}$ -17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron als Substrat inkubiert.

#### **1.2.2.4. Begleitende Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf endogener Steroide in den Inkubationsansätzen**

Die Bestimmung des Konzentrationsverlaufes endogener, mit dem Probenmaterial in die Versuchsansätze eingebrachter Steroide diene der Beantwortung folgender Fragen:

- a) vor welchem Hintergrund an endogenen Steroiden spielen sich die Umwandlungen der exogenen Substrate ab ? - und
- b) ergeben sich hinsichtlich des Verlaufs der endogenen Hormonspiegel gleichgerichtete Veränderungen zu den Umwandlungen der jeweiligen exogenen Substrate, d.h. gehen diese in den Pool der endogenen Steroide ein?

Mittels HPLC-RIA wurden die Konzentrationsverläufe des endogenen Pregnenolons, Progesterons und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterons erfaßt.

##### **1.2.2.4.1. Inkubationsansätze**

Von den je drei 220 bzw. 270 Tage trächtigen Versuchstieren wurden nach dem in Abschnitt 1.2.2.2. beschriebenen Verfahren Kotyledonen-Homogenate mit einem Gewebegehalt von 500 mg/ml hergestellt. Zur Inkubation wurde das im Abschnitt 1.2.2.3.8.2. benutzte, in den Abschnitten 1.2.2.3.2. und 1.2.2.3.3. beschriebene Inkubationsmedium bzw. -system verwendet. Im Unterschied dazu wurden den Inkubationsansätzen jedoch keinerlei exogene steroidale Substrate zugegeben. Die Inkubationszeiten betragen 0, 5, 10 und 20 Minuten. Alle Proben und Kontrollen (Mediumleerwerte) wurden in sechsfachem Ansatz inkubiert.

##### **1.2.2.4.2. Probenaufbereitung**

Die Proben wurden zunächst wie in den Abschnitten 1.2.2.3.4. bis 1.2.2.3.6. beschrieben aufbereitet, mittels HPLC aufgetrennt und das den zu bestimmenden Steroiden Pregnenolon, Progesteron und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron entsprechende Eluat jeweils als kompletter Peak gesammelt. Die sich anschließenden radioimmunologischen Bestimmungen der Steroidkonzentrationen erfolgten nach den im Abschnitt 1.2.2.4.3. beschriebenen Verfahren. Zur Bilanzierung der methodebedingten Verluste über den gesamten Analyseprozeß wurden für jeden Analyten je zwei Kontrollpunkte mit definiertem Steroidgehalt in cofaktorfrem Inkubationsmedium hergestellt. Diese wurden wie Proben aufbereitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Wiederfindungsversuche sind in Tabelle 4 dargestellt.

##### **1.2.2.4.3. Radioimmunologische Bestimmungen**

Die Progesteronbestimmungen wurden nach dem von HOFFMANN et al. (1973a) beschriebenen Gleichgewichtstest durchgeführt. Anstelle von Plasmaextrakten wurden in der vorlie-

genden Arbeit HPLC-Eluate niedertrocknet, welche dann in 200 µl BSA-Phosphatpuffer pH 7.2 rückgelöst wurden. Hiervon wurden in parallelen Ansätzen zweimal jeweils 100 µl in den RIA eingesetzt.

Die Pregnenolonbestimmung wurde analog zur Bestimmung von Progesteron durchgeführt. Das Antiserum (GI KOK X) war gegen Pregnenolon-3-Hemisuccinat-BSA gerichtet. Die Kreuzreaktivität lag für Progesteron bei 5.5%, für 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon bei 1.3% und für 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron bei 1.0%. Die Kreuzreaktivität gegenüber Cortisol, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Estron betrug weniger als 1%.

Die radioimmunologische Messung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron erfolgte ebenfalls analog zum Verfahren der Progesteronbestimmung. Das verwendete Antiserum<sup>3</sup> war gegen 4-Pregnen-17 $\alpha$ -ol-3,20-dion-3-Carboxymethyloxim-BSA gerichtet. Als Kreuzreaktivitäten dieses Antiserums wurden folgende Werte ermittelt: Progesteron: 4%, Pregnenolon: 0.12%, Androstendion bzw. Testosteron: 0.02%, Cortisol: 0.01%, Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron, Estradiol-17 $\beta$ , Estradiol-17 $\alpha$ , Estron: < 0.01%.

Die Zuverlässigkeit der drei Nachweisverfahren ergibt sich aus den in Tabelle 4 dargestellten Qualitätskriterien.

Tabelle 4: Wiederfindung von Pregnenolon, Progesteron und 17 $\alpha$ OH-Progesteron nach Probenaufbereitung und HPLC-RIA ( $\bar{x} \pm SD$ ).

Vorgabe <sup>1</sup>	n	Wiederfindung		
		in pg/ml	CV <sup>2</sup>	in % der Vorgabe
<b>Pregnenolon</b>				
803.6	8	501.6 $\pm$ 46.2	9.2	62.6 $\pm$ 5.7
3462.9	8	2410.0 $\pm$ 113.0	4.7	69.9 $\pm$ 3.4
<b>Progesteron</b>				
350.1	6	227.7 $\pm$ 29.4	12.9	65.2 $\pm$ 8.5
3535.3	8	2149.7 $\pm$ 99.0	4.6	60.8 $\pm$ 2.8
<b>17<math>\alpha</math>OH-Progesteron</b>				
203.9	8	114.4 $\pm$ 13.0	11.4	56.1 $\pm$ 6.4
1575.1	7	980.5 $\pm$ 68.4	7.0	62.4 $\pm$ 4.3

- 1) Die Konzentrationen ergeben sich aus der direkten radioimmunologischen Bestimmung der Kontrollpunkte (n=5) und repräsentieren den Mittelwert der gemessenen Konzentrationen.
- 2) Intra-assay-Variationskoeffizient; die Inter-assay-Variationskoeffizienten wurden aufgrund der kleinen Stichprobenzahlen nicht berechnet.

<sup>3</sup> Das Antiserum wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.H.D. Meyer, Institut für Physiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, Freising-Weihenstephan überlassen.

#### **1.2.2.4.4. Probenauswertung**

Von den inkubierten Sechsfach-Ansätzen wurden mindestens drei Proben über die HPLC aufgetrennt und die Konzentrationen an Pregnenolon, Progesteron und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron jeweils im Doppelansatz bestimmt. In die Auswertung wurden alle Ergebnisse einbezogen, bei denen die jeweils einer HPLC-Trennung entstammenden Doppelbestimmungen weniger als 10% voneinander abwichen und die innerhalb der Standardkurven der jeweiligen RIAs lagen. Bei Nichterfüllung dieser Vorgaben wurden weitere Inkubationsansätze aufbereitet und gemessen, bis mindestens drei Meßwerte pro Hormon, Inkubationszeit und Tier vorlagen. Aus technischen Gründen sind für  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron in vier Fällen nur zwei und in einem Fall nur ein Meßwert vorhanden.

#### **1.2.2.5. Bestimmung von Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma**

Zur Bestimmung von Progesteron, Cortisol und Estronsulfat im fetalen bzw. maternalen Blutplasma kamen im eigenen Labor etablierte und validierte radioimmunologische Testverfahren (HOFFMANN et al., 1973a; RICHERT-HANAUER et al., 1988; HOFFMANN et al., 1992, 1996) zum Einsatz.

### 1.2.2.6. Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Pufferlösungen

#### 1.2.2.6.1. Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen A-9647
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe	Boehringer Mannheim 737232
Glukose-6-Phosphat Dinatrium-Salz	Boehringer Mannheim 127027
HEPES-Puffer 1M	Sigma, Deisenhofen H-0887
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	Sigma, Deisenhofen H5752
D-Laktat-Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sigma, Deisenhofen L-2395
Methanol für die Chromatographie	Merck, Darmstadt 6007
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt 6009
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin Dinukleotid	Sigma, Deisenhofen N-1511
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	Fluka, Buchs, Schweiz 93220
Pregnenolon	Paesel, Frankfurt/M. 28-812-660
Progesteron	Paesel, Frankfurt/M. Q2600
Protein-Assay-Kit II	Bio-Rad, München 5000002
Pyruvat	Merck, Darmstadt 6619
Ringer-Lösung DAB7	Albrecht, Aulendorf 119192
Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300	Zinsser, Frankfurt/M. 1008300
Toluol p.a.	Merck, Darmstadt 8325
Trilostan (2 $\alpha$ -Cyano-4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -epoxy-17 $\beta$ -hydroxyandrostan-3-on)	Sanofi Winthrop, Fawdon Newcastle upon Tyne, UK
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt, 15333

#### 1.2.2.6.2. <sup>3</sup>H-markierte Steroide

[1, 2, 6, 7- <sup>3</sup> H]-Androst-4-en-3,17-dion	DuPont de Nemours, Dreieich, NET 469
[1, 2, 6, 7- <sup>3</sup> H]-Dehydroepiandrosteron	Amersham, Braunschweig, TRK 511
[2, 4, 6, 7- <sup>3</sup> H]-Estron	Amersham, Braunschweig, TRK 321
<sup>3</sup> H-17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon	DRG Instruments, Marburg, RL 189026
<sup>3</sup> H-17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	Amersham, Braunschweig, TRK 611
[7- <sup>3</sup> H]-Pregnenolon	DuPont de Nemours, Dreieich, NET 039
[4, 7- <sup>3</sup> H]-Pregnenolon	Amersham, Braunschweig, TRK 157
[1, 2, 6, 7- <sup>3</sup> H]-Progesteron	DuPont de Nemours, Dreieich, NET 381

**1.2.2.6.3. Materialien und Geräte**

Baker spe-10* Column Processing System	Baker Inc., Groß-Gerau
Bakerbond spe-Trennsäulen C <sub>18</sub> , 1 ml	Baker Inc., Groß Gerau
Degaser ERS-3612	ERC, Alteglofsheim
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Fraction Collector Frac 100	Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg
Gradient Former 425	Kontron Instruments, Eching
HBI Vortex-Evaporator	Haake Buchler, Saddle Brook, N.J., USA
HPLC-Autosampler 360	Kontron Instruments, Eching
HPLC Pump 420	Kontron Instruments, Eching
LiChrospher RP18 Glaskartuschen 30-3	Merck, Darmstadt
LiChrosorb RP18 Glaskartuschen 150-3	Merck, Darmstadt
Minifuge RF	Haereus, Osterode
Rotationsmischer REAX-2	Heidolph, Kelkheim
Sterilwerkbank LaminAir HA 2448 GS	Haereus, Karlsruhe
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
Vakuumpumpe N726.3 FT18	Neuberger, Freiburg-Munzingen
Vakuumtrockenschrank	Haereus, Karlsruhe
Varifuge K	Haereus, Osterode
Vorfilter REPL Filter 0.5 µm x 3 mm	Latek, Eppelheim
Wärmeschüttelbad Typ 3047	Köttermann, Hänigsen
Wärmeumwälzbad Haake Fe-2	Haake Meßtechnik, Karlsruhe
Wheaton Minis Vitro 180	Zinsser, Frankfurt
Zinsser minis 2000	Zinsser, Frankfurt

**1.2.2.6.4. Puffer**

PBS-Puffer pH 7.45:	NaCl	8.00 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.44 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
	Aqua dest. ad 1l	
Phosphatpuffer pH 7.2:	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.357 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.686 g
	NaN <sub>3</sub>	0.325 g
	Aqua dest. ad 1l	
BSA-Phosphatpuffer:	1 l Phosphatpuffer pH 7.2 + 1 g BSA	

### 1.2.3. Ergebnisse

#### 1.2.3.1. Steroidhormonkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere

Die Konzentrationen an Progesteron, Cortisol und Estronsulfat im peripheren Plasma der am 220. bzw. 270. Graviditätstag geschlachteten Kühe (n= 3 Tiere/Gruppe) und der zugehörigen Feten bzw. Kälber sind in den Tabellen 5 bzw. 6 dargestellt. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, liegen die Progesteronkonzentrationen im maternalen Plasma der am Tag 220 bzw. Tag 270 geschlachteten Tiere im gleichen Bereich. Der präpartale Progesteronabfall ist noch bei keinem der am 270. Graviditätstag geschlachteten Tiere nachweisbar. Die fetalen Progesteronkonzentrationen (s. Tabelle 6) liegen im Bereich der Nachweisgrenze bzw. darunter. Die maternalen Plasmacortisolwerte weisen deutliche individuelle Schwankungen auf. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Versuchsgruppen waren nicht festzustellen. Im Plasma der 270 Tage alten Feten wurden jedoch signifikant höhere Cortisolkonzentrationen gemessen als bei den 220 Tage alten Feten ( $p < 0.05$ ). Estronsulfat liegt sowohl im maternalen ( $p < 0.05$ ) als auch im fetalen Plasma ( $p < 0.05$ ) am Tag 270 in signifikant höheren Konzentrationen vor als am Tag 220. Die gemessenen Steroidhormonkonzentrationen im Blut der Muttertiere und der Feten bzw. Kälber sprechen dafür, daß die für den 220. und 270. Graviditätstag erarbeiteten Ergebnisse an Tieren mit intakten Graviditäten gewonnen wurden.

Tabelle 5: Konzentrationen an Progesteron, Cortisol und Estronsulfat im peripheren Plasma der am 220. bzw. 270. Graviditätstag geschlachteten Kühe (n=3 Tiere/Gruppe).

<b>Graviditätsdauer:</b>	<b>220 Tage</b>			<b>270 Tage</b>		
<b>Kuh:</b>	K220-1	K220-2	K220-3	K270-1	K270-2	K270-3
<b>Progesteron [ng/ml]:</b>	9.5	9.1	7.0	6.1	5.1	6.8
<b>Cortisol [ng/ml]:</b>	20.7	54.6	35.6	25.0	20.3	40.2
<b>Estronsulfat [ng/ml]:</b>	2.6	1.8	0.4	5.5	12.3	15.6

Tabelle 6: Konzentrationen an Progesteron, Cortisol und Estronsulfat im Plasma der Feten der am 220. bzw. 270. Graviditätstag geschlachteten Kühe (n=3 Tiere/Gruppe).

<b>Graviditätsdauer:</b>	<b>220 Tage</b>			<b>270 Tage</b>		
<b>Fetus/Kalb</b>	F220-1	F220-2	F220-3	F270-1	F270-2	F270-3
<b>Progesteron [ng/ml]:</b>	< 0.2	< 0.2	0.8	< 0.2	< 0.2	0.2
<b>Cortisol [ng/ml]:</b>	1.2	3.2	1.6	18.0	14.2	54.0
<b>Estronsulfat [ng/ml]:</b>	9.7	4.9	4.0	18.4	81.0	64.3

### 1.2.3.2. Ergebnisse der Inkubationsversuche

#### 1.2.3.2.1. Einfluß der Cofaktor-Supplementierung bzw. der Substratmenge auf das Inkubationsergebnis

##### *I) Einfluß der Cofaktor-Supplementierung*

Die Bedeutung der Supplementierung des Inkubationsmediums mit NADPH bzw.  $\text{NAD}^+$  (s. Abschnitt 1.2.2.3.2.) für die Umwandlung von  $^3\text{H}$ -DHEA bzw.  $^3\text{H}$ -Pregnenolon wurde an Probenmaterial eines Geburtstieres untersucht (s. Tabellen 7 bzw. 8). Ohne Cofaktorzusatz wurde  $^3\text{H}$ -DHEA kaum umgewandelt. Nach 20-minütiger Inkubationsdauer lagen noch über 70% der ursprünglich zugegebenen Substratmenge vor. Als Umwandlungsprodukte erschienen neben Androstendion und Estron zwei weitere, nicht näher charakterisierte Metaboliten, die als  $\text{U}_1$  bzw.  $\text{U}_2$  bezeichnet wurden. Aus der Tatsache, daß sie bei der HPLC-Trennung der Proben gegen Ende der Chromatogramme auftraten, kann geschlossen werden, daß es sich um sehr apolare Substanzen handelt. Extraktionsversuche (Phenolatbildung) ergaben, daß sie nicht den phenolischen Steroiden angehören.  $^3\text{H}$ -Pregnenolon wurde ohne Cofaktorzusatz nur ca. zur Hälfte und nahezu ausschließlich in Metaboliten des  $\Delta 5$ -Syntheseweges metabolisiert, wobei Östrogene nur in Spuren gebildet wurden. Sowohl hinsichtlich der Umwandlung von  $^3\text{H}$ -DHEA (s. Tabelle 7) als auch bezüglich der Metabolisierung von  $^3\text{H}$ -Pregnenolon (s. Tabelle 8) ergab sich durch den Zusatz des  $\text{NAD}^+$ -regenerierenden Systems zum Inkubationsmedium eine erhebliche Steigerung der  $3\beta$ -HSD-Aktivität. Aus Pregnenolon wurden neben den Metaboliten des  $\Delta 5$ -Syntheseweges dadurch vermehrt Produkte des  $\Delta 4$ -Syntheseweges gebildet. Der Einfluß des NADPH-regenerierenden Systems zeigte sich im Versuchsansatz mit  $^3\text{H}$ -DHEA als Substrat in einer Aktivitätssteigerung der Aromatase, d.h. in einer erhöhten Bildung von Östrogenen. In den Versuchsansätzen unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat war unter dem Einfluß des NADPH-regenerierenden Systems in Abwesenheit des  $\text{NAD}^+$ -regenerierenden Systems eine verstärkte Bildung von  $^3\text{H}$ -DHEA/ $^3\text{H}$ - $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon zu beobachten, während bei Anwesenheit des  $\text{NAD}^+$ -regenerierenden Systems die NADPH-Supplementierung neben einer Steigerung der Östrogenbildung zu einer Verschiebung im Verhältnis Progesteron/ $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron zugunsten des letzteren führte. Offensichtlich stimulierte der NADPH-Zusatz zum Testsystem nicht nur die Aktivität der Aromatase, sondern auf dem  $\Delta 4$ - und  $\Delta 5$ -Syntheseweg auch die P450c17 $\alpha$ -Aktivität. Somit sind im in vitro-Versuchsansatz die Aktivitäten der an der Umwandlung von DHEA bzw. Pregnenolon in Östrogene beteiligten Enzyme durch die Verfügbarkeit der jeweiligen Cofaktoren limitiert. Dadurch sind Substratabbau und das Verhältnis der Metaboliten untereinander vom Verhältnis der beiden Cofaktoren abhängig. Aufgrund der in diesem Versuch erzielten Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten den Versuchsansätzen jeweils eine Einheit des NADPH- und eine Einheit des  $\text{NAD}^+$ -regenerierenden Systems zugesetzt.

Tabelle 7: Einfluß der Supplementierung des Inkubationsmediums mit einem NADPH-regenerierenden System und aufsteigenden Konzentrationen eines NAD<sup>+</sup>-regenerierenden Systems auf die Metabolisierung von 0.46 pmol <sup>3</sup>H-DHEA sowie die Bildung (in % der zugegebenen Substratmenge) von Estron (E1), Androstendion (A) sowie zweier nicht näher charakterisierter Metaboliten U<sub>1</sub> und U<sub>2</sub> (2 bzw. 5 Minuten inkubierte Proben: Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; 20 Minuten inkubierte Proben: Einfachbestimmungen). Das Probenmaterial entstammte einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt.

			prozentuale Verteilung der <sup>3</sup> H-Aktivität				
NADPH <sup>1)</sup>	NAD <sup>2)</sup>	t <sup>3)</sup>	DHEA	A	E1	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>
-	0	2	91.5	5.5	0.7	0.3	2.5
-	0	5	84.4	10.5	1.2	0.7	3.3
-	0	20	71.9	13.9	3.6	3.7	6.9
-	0.5	2	12.9	54.3	27.0	2.9	3.1
-	0.5	5	4.2	40.4	47.8	3.7	4.0
-	0.5	20	2.7	12.8	75.0	6.1	3.4
-	1	2	2.9	51.7	39.9	3.0	2.6
-	1	5	1.9	21.1	70.1	4.1	2.2
-	1	20	0.0	4.9	90.9	2.5	1.7
-	2	2	3.2	40.0	52.3	2.8	1.7
-	2	5	2.5	12.9	79.3	3.1	2.3
-	2	20	3.0	4.7	87.2	3.1	1.9
-	4	2	1.1	47.9	46.4	2.3	2.4
-	4	5	0.7	15.3	79.5	2.8	1.6
-	4	20	0.4	4.0	91.4	3.0	1.3
+	0	2	90.2	5.3	2.1	0.1	2.5
+	0	5	85.4	7.0	3.5	0.5	3.6
+	0	20	71.5	13.3	5.2	3.1	6.9
+	0.5	2	2.0	34.8	58.3	2.6	2.4
+	0.5	5	1.2	18.5	75.8	3.3	1.2
+	0.5	20	0.0	3.8	88.4	2.3	5.6
+	1	2	1.5	26.1	66.6	2.4	3.6
+	1	5	0.4	5.1	88.9	1.7	4.0
+	1	20	0.0	3.2	91.7	1.4	3.6
+	2	2	1.3	17.5	72.4	1.9	7.1
+	2	5	0.5	3.0	90.2	2.2	4.3
+	2	20	0.3	5.1	89.8	1.7	3.1
+	4	2	0.2	17.0	78.4	1.7	2.9
+	4	5	0.3	2.8	90.7	2.6	3.6
+	4	20	0.0	3.7	91.7	2.1	2.6

1) = Zusatz des NADPH-reg. Systems    2) = Zugegebene Einheiten des NAD<sup>+</sup>-reg. Systems  
 3) = Inkubationsdauer in Minuten

Tabelle 8: Einfluß der Supplementierung des Inkubationsmediums mit einem NADPH-regenerierenden System und aufsteigenden Konzentrationen eines NAD<sup>+</sup>-regenerierenden Systems auf die Metabolisierung von 4.1 pmol <sup>3</sup>H-Pregnenolon (P5) sowie die Bildung (in % der zugegebenen Substratmenge) von Estron (E1), Androstendion (A), 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (OH-P4), DHEA plus 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/OH-P5) und Progesteron (P4) (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen). Das Probenmaterial entstammte einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt.

			prozentuale Verteilung der <sup>3</sup> H-Aktivität					
NADPH <sup>1)</sup>	NAD <sup>2)</sup>	t <sup>3)</sup>	E1	A	OH-P4	DHEA /OH-P5	P4	P5
-	0	5	< 1.0	< 1.0	1.0	45.2	3.3	47.4
-	0	20	< 1.0	< 1.0	1.3	46.3	4.3	45.3
-	0.5	5	6.6	6.0	23.4	28.8	16.4	12.1
-	0.5	20	13.4	2.3	31.3	22.2	16.4	7.7
-	1	5	14.6	7.9	32.1	17.6	15.7	5.3
-	1	20	20.5	1.9	40.5	10.3	15.2	4.1
-	2	5	21.7	3.6	38.1	9.9	16.1	5.1
-	2	20	26.1	1.4	44.8	7.7	10.5	4.4
-	4	5	16.7	3.1	42.8	8.0	21.1	3.5
-	4	20	21.1	1.4	49.6	8.6	13.4	2.4
+	0	5	< 1.0	< 1.0	1.4	77.4	1.8	16.5
+	0	20	< 1.0	1.4	1.7	73.8	2.4	15.5
+	0.5	5	28.5	4.5	21.4	28.7	4.8	5.5
+	0.5	20	35.8	2.6	24.4	22.0	4.6	4.7
+	1	5	36.3	3.3	26.7	16.9	5.3	5.4
+	1	20	38.9	1.2	29.8	11.5	5.3	6.1
+	2	5	32.6	2.2	28.2	9.1	4.2	4.8
+	2	20	41.1	2.1	35.8	9.2	3.1	3.5
+	4	5	35.0	1.7	40.1	8.9	5.5	3.0
+	4	20	37.1	1.7	42.5	7.7	2.8	3.4

1) = Zusatz des NADPH-reg. Systems    2) = Zugegebene Einheiten des NAD<sup>+</sup>-reg. Systems  
 3) = Inkubationsdauer in Minuten

## *II) Einfluß der Substratmenge*

Die Untersuchungen zum Einfluß der Substratmenge auf das Inkubationsergebnis wurden an Probenmaterial durchgeführt, welches einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt entstammte (s. Tabellen 9 und 10). Als Substrat waren den Inkubationen in parallelen Ansätzen zusätzlich zu den  $^3\text{H}$ -markierten Steroiden ( $0.46 \text{ pmol } ^3\text{H-DHEA}$  bzw.  $1.74 \text{ pmol } ^3\text{H-Pregnenolon}$ ) 1, 10, bzw. 1000 pmol des jeweiligen nichtmarkierten Substrates zugegeben worden. Die Erhöhung der Substratmenge führte zu einer Verzögerung des Substratabbaus, wobei jedoch sowohl im Falle des DHEA als auch des Pregnenolons nach Ablauf der 20-minütigen Inkubationsdauer das Substrat vollständig abgebaut war. Bei Zugabe der höchsten Substratmenge kommt es gegenüber dem Einsatz der beiden niedrigeren Substratmengen zu deutlichen Verschiebungen in den Verhältnissen der Metaboliten untereinander. Dies zeigt, daß sich im angewandten *in vitro*-Testsystem die einzelnen Umwandlungsschritte hinsichtlich ihrer Kapazitäten offensichtlich erheblich unterscheiden. Eine relativ hohe Umwandlungskapazität besitzen hierbei die beiden von der  $3\beta$ -HSD katalysierten Umwandlungsschritte von Pregnenolon in Progesteron bzw. von DHEA in Androstendion, da auch bei der höchsten Substratkonzentration die beiden Substrate annähernd vollständig abgebaut sind. Als limitierender Umwandlungsschritt erweist sich bei der Verwendung von DHEA als Substrat die von der Aromatase katalysierte Umwandlung von Androstendion in Estron. Diese Ergebnisse zeigen, daß im eigenen *in vitro*-System die Verhältnisse der Metaboliten untereinander erheblich vom Verhältnis der Substratmenge zu den Kapazitäten der einzelnen beteiligten Umwandlungsschritte beeinflußt werden und sich zur Darstellung der Östrogenbildung eher die beiden niedrigeren der getesteten Substratmengen eignen.

Tabelle 9: Metabolisierung von DHEA nach Vorlage in aufsteigenden Konzentrationen durch homogenisiertes Trophoblastgewebe. Das Probenmaterial entstammte einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt.

A) Prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat (DHEA) und die Metaboliten Androstendion (A), Estron (E1) sowie zwei weitere, nicht näher charakterisierte Metaboliten  $U_1$  und  $U_2$ .

Vorlage Substrat (pmol)		Prozentuale Verteilung der $^3\text{H}$ -Aktivität (n=2)					
$^3\text{H}$ -DHEA	DHEA	t (min.)	DHEA	A	E1	$U_1$	$U_2$
0.46	1	1	53.2	43.1	3.7	< 1.0	< 1.0
		5	2.8	4.0	85.4	1.9	5.8
		10	2.9	4.1	86.4	1.7	5.1
		20	1.4	4.0	89.1	1.5	4.1
0.46	10	1	65.7	32.4	1.8	< 1.0	< 1.0
		5	3.3	5.9	85.4	5.0	< 1.0
		10	1.8	4.2	90.4	3.7	< 1.0
		20	2.1	4.3	90.4	3.1	< 1.0
0.46	1000	1	90.2	9.3	< 1.0	< 1.0	< 1.0
		5	48.2	46.8	2.6	< 1.0	1.6
		10	24.8	68.3	4.1	1.2	1.6
		20	3.3	87.7	5.3	2.2	1.4

B) Absolute Mengen [pmol pro Ansatz] der gebildeten Metaboliten Androstendion (A), Estron (E1) sowie zwei weiterer, nicht näher charakterisierter Metaboliten  $U_1$  und  $U_2$ .

Vorlage Substrat (pmol)		Gebildete Metaboliten in pmol/Inkubationsansatz (n=2)				
$^3\text{H}$ -DHEA	DHEA	t (min.)	A	E1	$U_1$	$U_2$
0.46	1	1	0.63	0.05	< 0.01	< 0.01
		5	0.06	1.25	0.03	0.08
		10	0.06	1.26	0.02	0.07
		20	0.06	1.30	0.02	0.06
0.46	10	1	3.39	0.29	< 0.10	< 0.10
		5	0.62	8.93	0.52	< 0.10
		10	0.44	9.46	0.39	< 0.10
		20	0.45	9.46	0.32	< 0.10
0.46	1000	1	93.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0
		5	468.2	26.0	< 10.0	16.0
		10	683.3	41.0	12.0	16.0
		20	877.4	53.0	22.0	14.0

Tabelle 10: Metabolisierung von Pregnenolon (P5) nach Vorlage in aufsteigenden Konzentrationen durch homogenisiertes Trophoblastgewebe. Das Probenmaterial entstammte einer Kuh zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt.

A) Prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat (Pregnenolon) sowie die Metaboliten Estron (E1), Androstendion (A),  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (OH-P4), DHEA plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/OH-P5) und Progesteron (P4) nach 5- bzw. 20-minütiger Inkubationsdauer (t).

Vorlage Substrat (pmol)		Prozentuale Verteilung der $^3\text{H}$ -Aktivität (n=1)						
$^3\text{H-P5}$	P5	t (min.)	E1	A	OH-P4	DHEA OH-P5	P4	P5
1.74	1	5	22.0	< 1.0	53.9	11.0	8.9	4.6
		20	22.5	< 1.0	51.2	8.0	3.5	5.8
1.74	10	5	20.9	< 1.0	54.2	11.2	9.7	5.4
		20	23.4	< 1.0	52.7	9.1	5.6	6.8
1.74	1000	5	1.4	1.8	33.2	9.0	50.4	6.4
		20	6.7	< 1.0	61.1	9.0	19.8	6.5

B) Absolute Mengen [pmol pro Ansatz] der gebildeten Metaboliten Estron (E1), Androstendion (A),  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (OH-P4), DHEA plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/OH-P5) und Progesteron (P4) nach 5- bzw. 20-minütiger Inkubationsdauer (t).

Vorlage Substrat (pmol)		Gebildete Metaboliten in pmol/Inkubationsansatz (n=1)					
$^3\text{H-P5}$	P5	t (min.)	E1	A	OH-P4	DHEA OH-P5	P4
1.74	1	5	0.60	< 0.03	1.48	0.30	0.24
		20	0.62	< 0.03	1.40	0.22	0.10
1.74	10	5	2.45	< 0.12	6.36	1.31	1.14
		20	2.75	< 0.12	6.19	1.07	0.66
1.74	1000	5	14.0	18.0	332.6	90.2	504.9
		20	67.1	< 10.0	612.1	90.2	198.3

### 1.2.3.2.2. Metabolisierung von Pregnenolon an verschiedenen Graviditätszeitpunkten

Wurde den Inkubationsansätzen als exogenes Substrat  $1.74 \text{ pmol } ^3\text{H-Pregnenolon}$  zugesetzt, war dieses an allen untersuchten Graviditätsstadien innerhalb von 5 Minuten zu mehr als 90% metabolisiert (s. Abbildung 3). An den Graviditätstagen 220 und 270 entstanden aus Pregnenolon vorwiegend Progesteron (bis zu  $42.5 \pm 3.9\%$  bzw.  $53.8 \pm 2.2\%$ ) und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (bis zu  $37.9 \pm 4.6\%$  bzw.  $32.0 \pm 1.8\%$ ). Dabei zeigte der gebildete Anteil an Progesteron nach einem anfänglichen steilen Anstieg einen leichten kontinuierlichen Abfall. Die Bildung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron stieg dagegen über den gesamten Inkubationszeitraum stetig an. Die Anteile an DHEA/ $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon erreichten zwischen 2 und 5 Minuten Inkubationszeit Maximalwerte von  $13.6 \pm 3.7\%$  (Tag 220) bzw.  $10.3 \pm 2.5\%$  (Tag 270), wobei sich die Anteile nach 5 Minuten signifikant von denen nach 10 bzw. 20 Minuten unterschieden ( $p < 0.05$ ). Androstendion wurde am Tag 220 bis zu  $4.9 \pm 1.2\%$ , am Tag 270 bis zu  $1.3 \pm 0.5\%$  gebildet. Der Anteil an Estron stieg über die gesamte Inkubationsdauer leicht an und erreichte maximal  $5.2 \pm 2.7\%$  (Tag 220) bzw.  $6.2 \pm 0.7\%$  (Tag 270). Zum Zeitpunkt der Geburt betrug der Anteil von Estron nach 20-minütiger Inkubationsdauer  $61.0 \pm 4.7\%$  und war damit im Vergleich zum 220. bzw. 270. Graviditätstag hochsignifikant höher ( $p < 0.001$ ), wobei nach bereits nach 5-minütiger Inkubationsdauer die Umwandlungen weitgehend abgeschlossen waren. Progesteron erreichte in den Proben der Geburtsgruppe nach 2-minütiger Inkubationsdauer einen Anteil von  $3.8 \pm 1.2\%$  und fiel im weiteren Verlauf der Inkubation auf Werte unter 2% ab. Die Anteile für  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron lagen nach anfänglichem steilem Anstieg konstant um 15%. Die zum Zeitpunkt der Geburt gebildeten Mengen an Progesteron und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron unterschieden sich hochsignifikant von denen am Tag 220 ( $p < 0.01$ ) und Tag 270 ( $p < 0.001$ ), die Unterschiede zwischen Tag 220 und Tag 270 waren jedoch nicht signifikant. Zum Zeitpunkt der Geburt wurden für DHEA/ $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon und Androstendion nach 2-minütiger Inkubationszeit die höchsten Anteile mit  $26.7 \pm 11.2\%$  bzw.  $17.7 \pm 4.3\%$  gemessen. Der anschließende Abfall war mit dem Anstieg des Estrons korreliert ( $r = -0.994$  bzw.  $-0.998$ ).

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, daß es zwischen dem 270. Graviditätstag und der Geburt zu einer dramatischen Umstellung im plazentaren Steroidstoffwechsel kommt. Vor dieser Umstellung dominieren unter den Reaktionsprodukten eindeutig Progesteron und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron. Unter der Geburt stellt Estron eindeutig den Hauptmetaboliten dar.

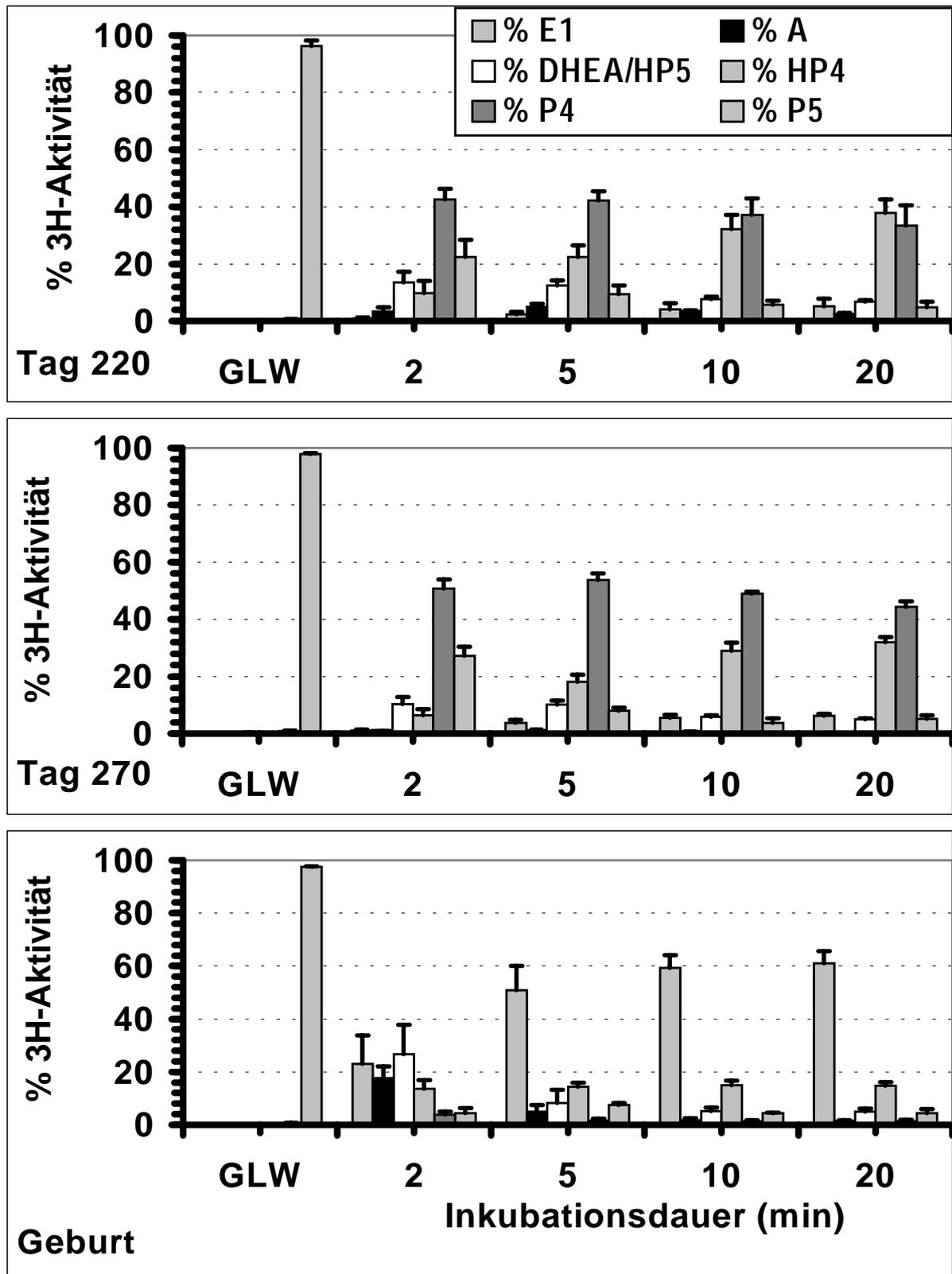


Abb. 3: Metabolisierung von 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon (P5) an den Tagen 220 bzw. 270 der Trächtigkeit sowie unter der Geburt ( $n = 3$  Tiere pro Gruppe). Dargestellt ist die Bildung von Estron (E1), Androstendion (A), Dehydroepiandrosteron plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/HP5),  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4) und Progesteron (P4) als prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat und die einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ( $\bar{x} + \text{SD}$ ).

Inkubationen mit erhöhtem Substratangebot [1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon + 100 pmol Pregnenolon; (s. Abbildung 4) bzw. 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon + 1 nmol Pregnenolon (s. Abbildung 5)] wurden an den Graviditätstagen 220 und 270 durchgeführt. Die Erhöhung des Substratangebots resultierte in Abhängigkeit von der Substratmenge in einer mäßigen Verzögerung des Substratabbaus sowie in einer Verschiebung der Anteile der Metaboliten Progesteron und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron zugunsten des Progesterons. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die Kapazität der Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron erheblich höher ist als die der Umwandlung von Progesteron in  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron.

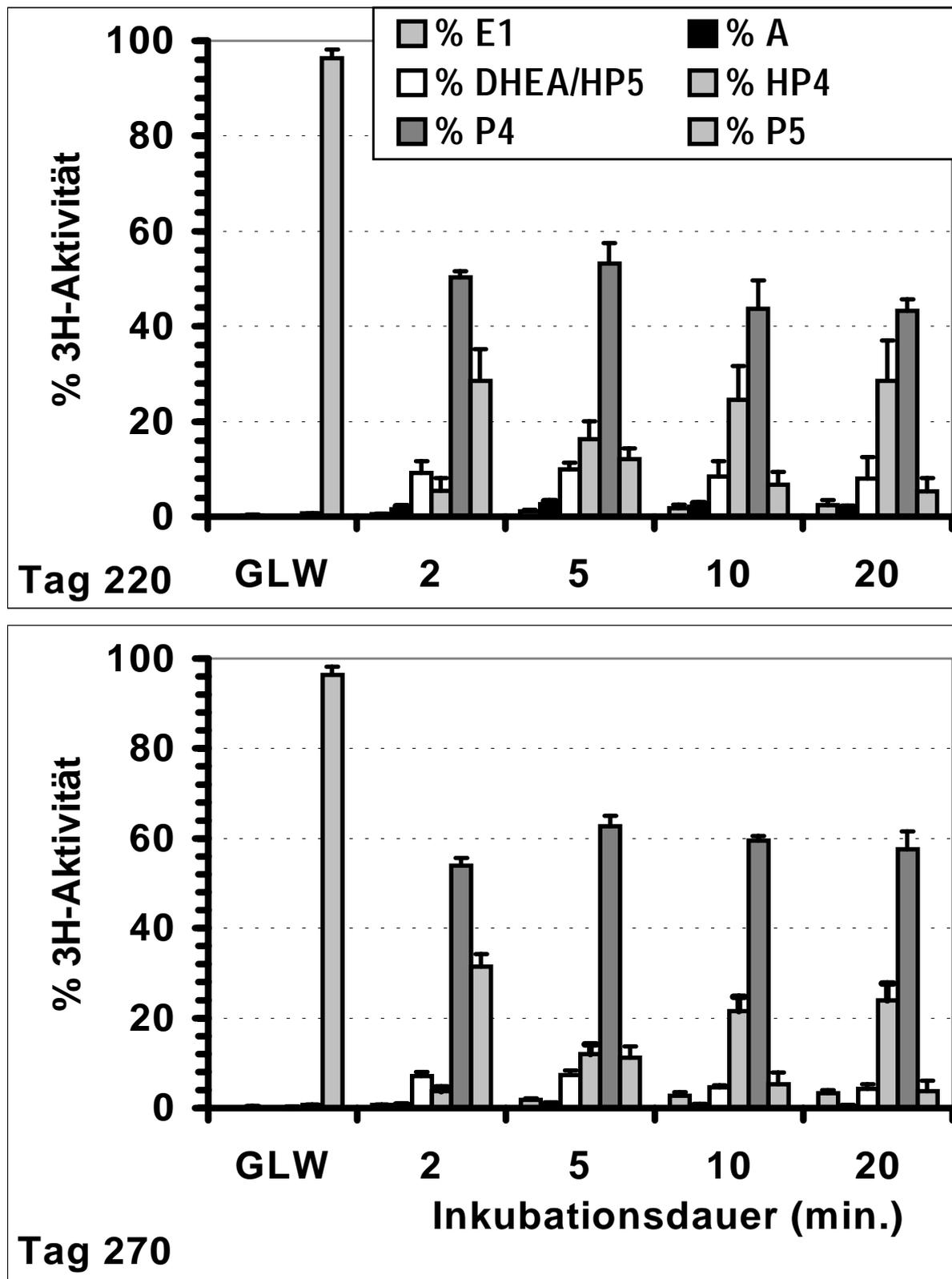


Abb. 4: Metabolisierung von 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon + 100 pmol Pregnenolon (P5) an den Tagen 220 bzw. 270 der Trächtigkeit ( $n = 3$  Tiere pro Gruppe). Dargestellt ist die Bildung von Estron (E1), Androstendion (A), Dehydroepiandrosteron plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/HP5),  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4) und Progesteron (P4) als prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat und die einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ( $\bar{x} + \text{SD}$ ).

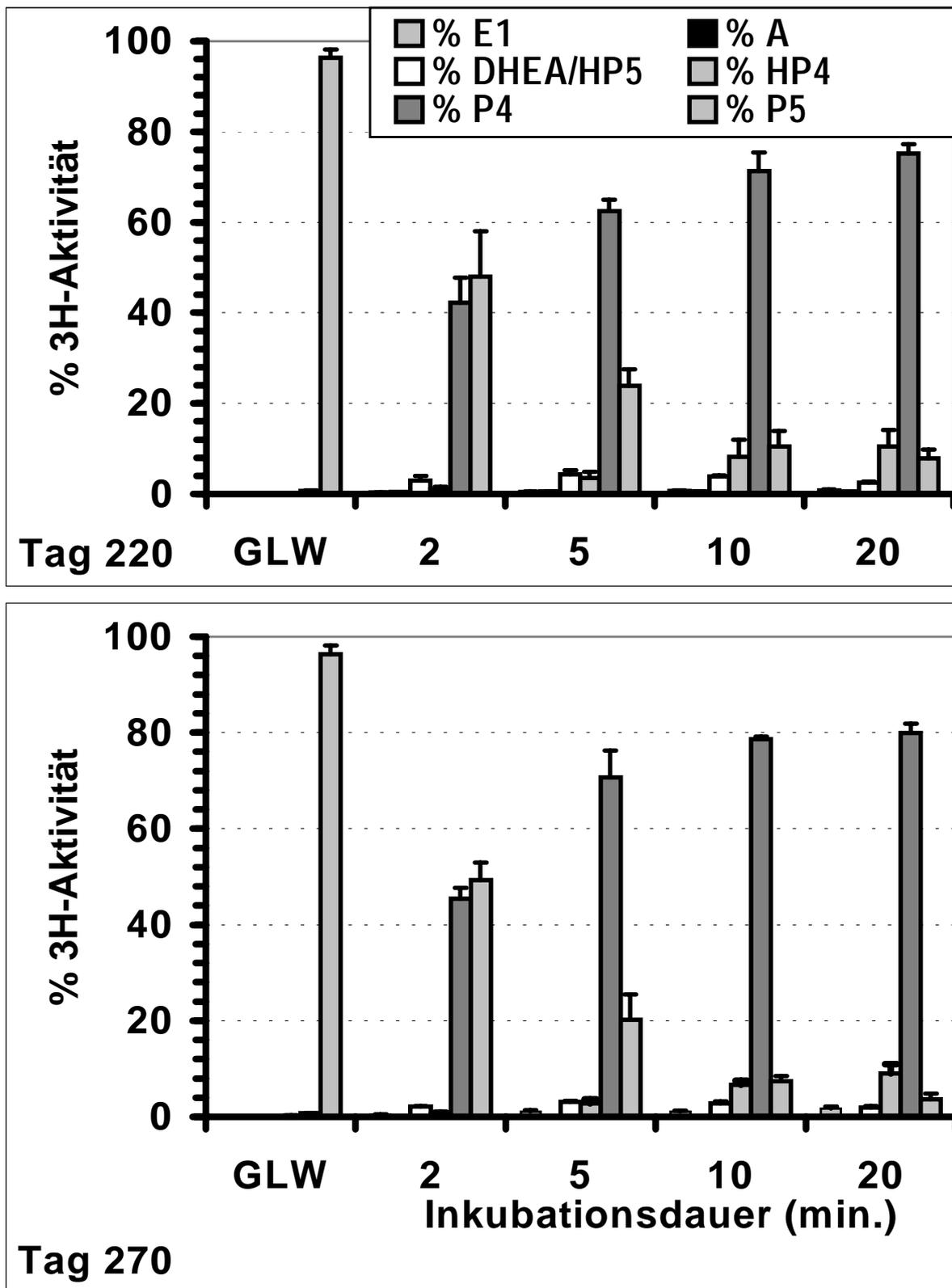


Abb. 5: Metabolisierung von 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon + 1 nmol Pregnenolon (P5) an den Tagen 220 bzw. 270 der Trächtigkeit ( $n = 3$  Tiere pro Gruppe). Dargestellt ist die Bildung von Estron (E1), Androstendion (A), Dehydroepiandrosteron plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/HP5),  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4) und Progesteron (P4) als prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat und die einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ( $\bar{x} + \text{SD}$ ).

### 1.2.3.2.3. Darstellung der Bedeutung des $\Delta 4$ - bzw. des $\Delta 5$ -Synthesewegs für die plazentare Östrogensynthese des Rindes

#### A) *Selektive Darstellung des $\Delta 5$ -Synthesewegs durch Inkubation von $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat bei Hemmung der $3\beta$ -HSD durch Trilostan.*

Zur Charakterisierung der Metabolisierung von Pregnenolon auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg wurden am 220. (n= 3 Tiere) und 270. Graviditätstag (n= 2 Tiere) Inkubationen mit 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat und einem Zusatz von 20 nmol Trilostan zur kompetitiven Hemmung der  $3\beta$ -HSD durchgeführt (s. Abbildung 6). Sowohl am 220. als auch am 270. Graviditätstag traten bei Inkubationen mit 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon plus 20 nmol Trilostan als Metaboliten ausschließlich DHEA plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon in Erscheinung. Der Pregnenolonabbau war an beiden Graviditätstagen mit der Bildung von DHEA/ $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon mit  $r = -1$  korreliert. Nach 20-minütiger Inkubationsdauer schwankt der Anteil des gebildeten DHEA/ $17\alpha$ -Hydroxypregnenolons zwischen ca. 50-80%. Die Anteile aller anderen erfaßten Steroide betragen jeweils weniger als 1% der Gesamtaktivität und lagen damit unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Ergebnisse zeigen, daß bei Hemmung der  $3\beta$ -HSD aus Pregnenolon auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg außer DHEA und  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon keine weiteren Metaboliten gebildet werden.

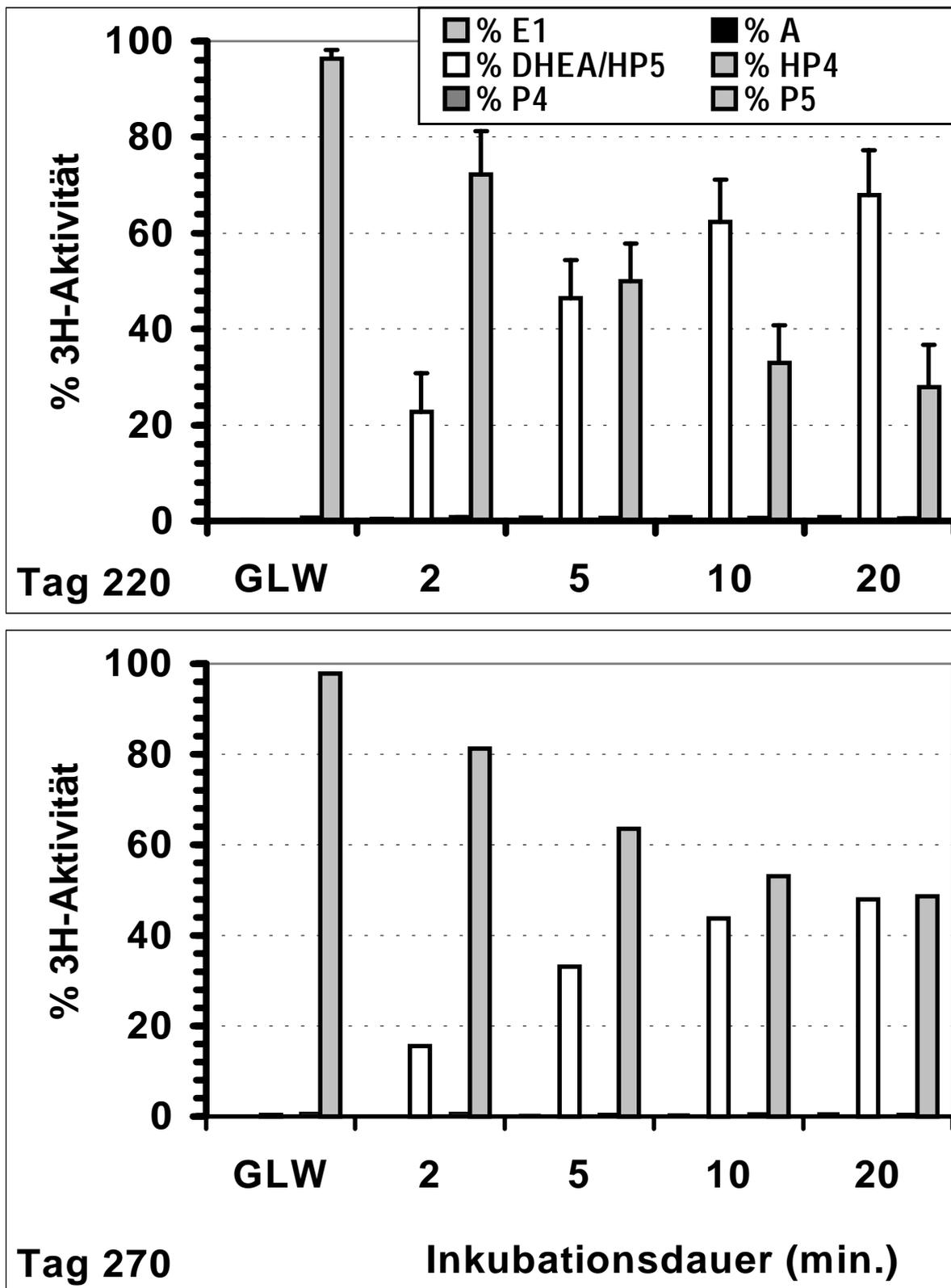


Abb. 6: Metabolisierung von 1.74 pmol  $^3\text{H}$ -Pregnenolon (P5) am 220. (n=3) bzw. 270. Gravitätstag (n=2) bei Zugabe von 20 nmol Triloston pro Probe. Dargestellt ist der Substratabbau sowie die Bildung von Progesteron (P4),  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4), Dehydroepiandrosteron plus  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon (DHEA/HP%), Androstendion (A) und Estron (E1) als prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat und die einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Angaben als  $\bar{x} + \text{SD}$  (Tag 220) bzw.  $\bar{x}$  (Tag 270).

**B) Selektive Darstellung des  $\Delta^4$ -Synthesewegs durch Inkubation von  $^3\text{H}$ -Progesteron bzw.  $^3\text{H}$ - $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron als Substrat.**

Bei den Inkubationen unter Verwendung von  $0.37 \text{ pmol } ^3\text{H}\text{-Progesteron}$  als Substrat wurde dieses zu allen untersuchten Graviditätszeitpunkten hauptsächlich in  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron umgewandelt (s. Abbildung 7). Dies wird besonders durch die negativen Korrelationen zwischen den auf Progesteron bzw.  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron entfallenden  $^3\text{H}$ -Aktivitäten deutlich ( $r = -0.998, -0.996$  und  $-0.996$ ). Die Ergebnisse der Tage 220 und 270 waren signifikant unterschiedlich ( $p < 0.05$ ). Diese beiden Gruppen unterschieden sich hochsignifikant von der Gruppe der Tiere *intra partum* ( $p < 0.001$ ). So lagen nach 20-minütiger Inkubationsdauer am Tag 220 noch 57.0%, am Tag 270 noch 72.0%, zum Zeitpunkt der Geburt jedoch lediglich 6.3% des angebotenen Progesterons vor. An den Graviditätstagen 220 bzw. 270 stieg der prozentuale Anteil für  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron kontinuierlich über die Inkubationszeit an und erreichte nach 20 Minuten mit 27.5% (Tag 220) bzw. 15.3% (Tag 270) Maximalwerte. Zum Zeitpunkt der Geburt dagegen waren die Umsetzungen bereits nach 5 Minuten weitgehend abgeschlossen, wobei aus Progesteron zu 70.3%  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron gebildet wurde. Die Bildung von Androstendion war an den Tagen 220 und 270 praktisch nicht nachweisbar. Zum Zeitpunkt der Geburt lag dessen Anteil bei maximal 2.4%. Estron lag mit Spitzenwerten von 3.4% an den Tagen 220 und 270 gerade oberhalb der Nachweisgrenze. Zum Zeitpunkt der Geburt wurden innerhalb von 20 Minuten 6.1% Estron gebildet. Insgesamt entfielen  $91.3 \pm 4.3\%$  der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf die Ausgangssubstanz und die identifizierten Metaboliten. Diese Ergebnisse zeigen, daß zu allen Untersuchungszeitpunkten von P450c $17\alpha$  der Rinderplazenta auf dem  $\Delta^4$ -Syntheseweg nur der erste der beiden möglichen sukzessiven Reaktionsschritte, die  $17\alpha$ -Hydroxylierung, in nennenswertem Umfang katalysiert wird, was auch durch die Untersuchungen bei Verwendung von  $0.70 \text{ pmol } 17\alpha\text{-Hydroxyprogesteron}$  als Substrat bestätigt wird (s. Abbildung 8). Die nachfolgende Abspaltung der Seitenkette unterbleibt dagegen fast vollständig. Somit spielt Progesteron als Substrat der plazentaren Östrogenbiosynthese des Rindes quantitativ keine Rolle, was die Bedeutung des  $\Delta^5$ -Syntheseweges bestätigt.

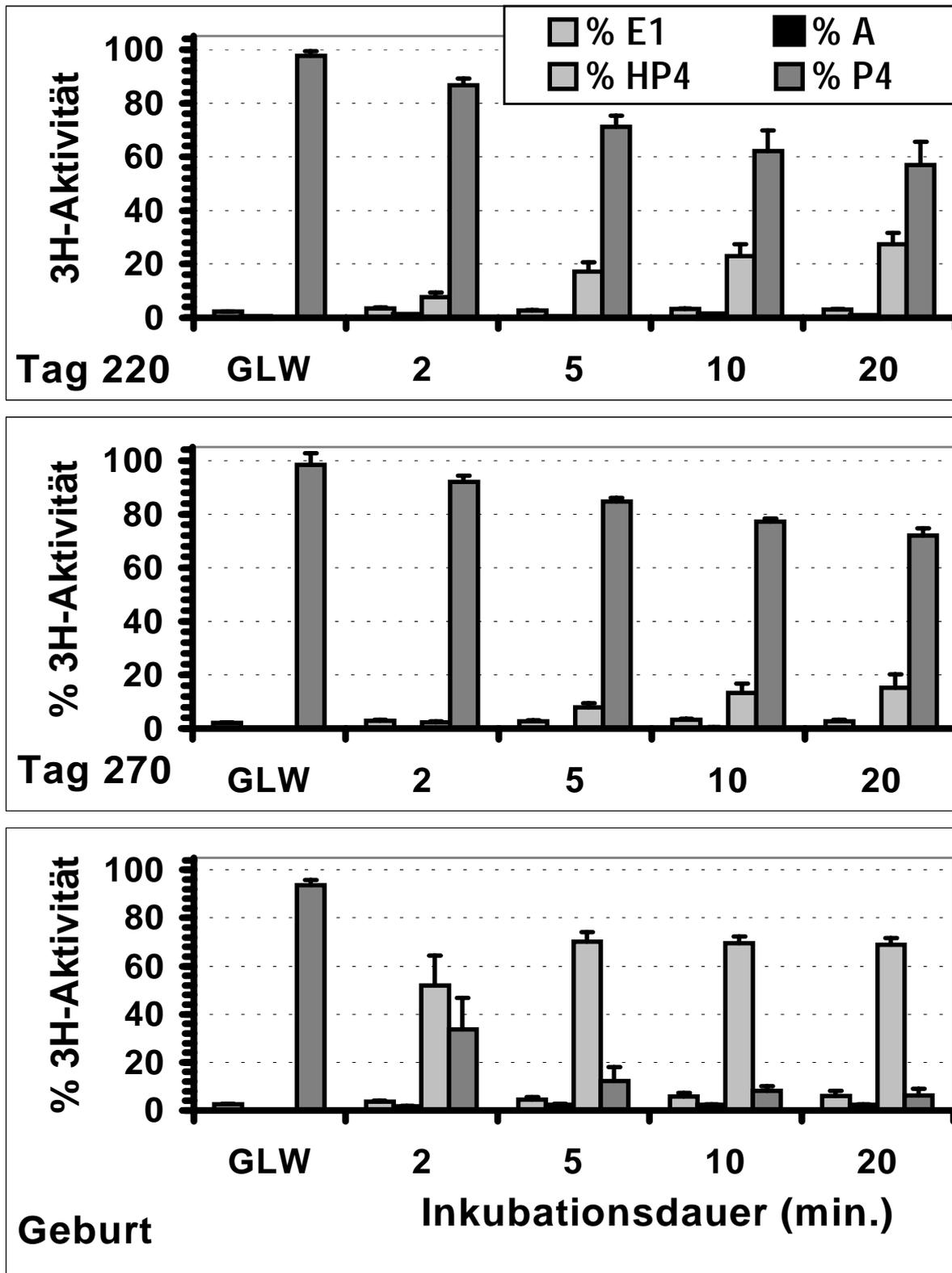


Abb. 7: Metabolisierung von 0.37 pmol <sup>3</sup>H-Progesteron (P4) an den Tagen 220 bzw. 270 der Trächtigkeit sowie unter der Geburt (n= 3 Tiere pro Gruppe). Dargestellt ist der Substratabbau sowie die Bildung von Estron (E1), Androstendion (A) und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4) als prozentuale Verteilung der <sup>3</sup>H-Aktivität auf das Substrat und die einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Angaben als  $\bar{x}$  + SD).

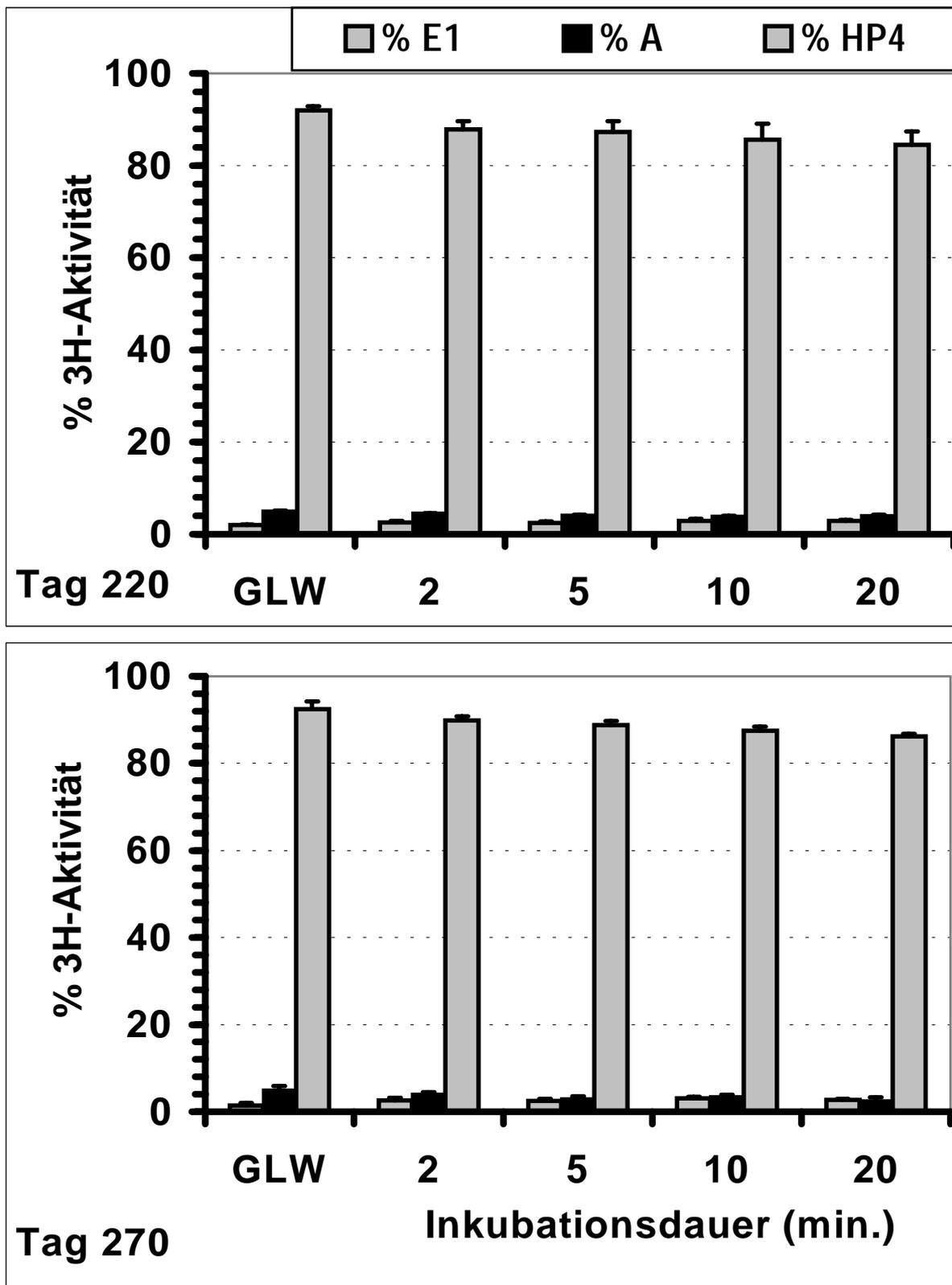


Abb. 8: Metabolisierung von 0.70 pmol  $^3\text{H}$ -17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4) an den Tagen 220 bzw. 270 der Trächtigkeit ( $n=3$  Tiere pro Gruppe). Dargestellt ist die Bildung von Estron (E1) und Androstendion (A) als prozentuale Verteilung der  $^3\text{H}$ -Aktivität auf das Substrat und die einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ( $\bar{x} + \text{SD}$ ).

### 1.2.3.3. Konzentrationsverlauf endogener Steroide bei Inkubationen an den Graviditätstagen 220 bzw. 270

Die Konzentrationsverläufe endogener Steroide bei Inkubationen ohne exogene Substratzugabe sind in Abbildung 9 dargestellt. An beiden untersuchten Graviditätstagen wurde Pregnenolon, ausgehend von 4.42 ng/100 mg Gewebe (Tag 220) bzw. 4.30 ng/100 mg Gewebe (Tag 270), abgebaut, wobei nach 10 Minuten mit 1.04 ng/100 mg Gewebe bzw. 0.86 ng/100 mg Gewebe ein Plateau erreicht wurde. Die Konzentration an  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron erhöhte sich im Verlauf der Inkubation kontinuierlich von 0.46 ng/100 mg Gewebe auf 3.27 ng/100 mg Gewebe (Tag 220) bzw. von 0.55 ng/100 mg Gewebe auf 2.31 ng/100 mg Gewebe (Tag 270). Während am 220. Graviditätstag die Progesteronkonzentrationen keine signifikanten Veränderungen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer aufwiesen und im Mittel zwischen 3.44 ng und 4.65 ng/100 mg Gewebe lagen, kam es am 270. Graviditätstag zu einem Anstieg über die Inkubationszeit, wobei die nach 5 Minuten gemessene Konzentration von 4.03 ng/100 mg Gewebe mit  $p < 0.01$  bereits über dem Ausgangswert von 2.89 ng/100 mg Gewebe, aber noch mit  $p < 0.05$  unter dem 20-Minuten-Wert von 5.06 ng/100 mg Gewebe lag. Diese Ergebnisse zeigen, daß die im Probenmaterial vorhandenen endogenen Steroide gleichgerichteten Umwandlungen unterliegen wie die exogen zugeführten Substrate.

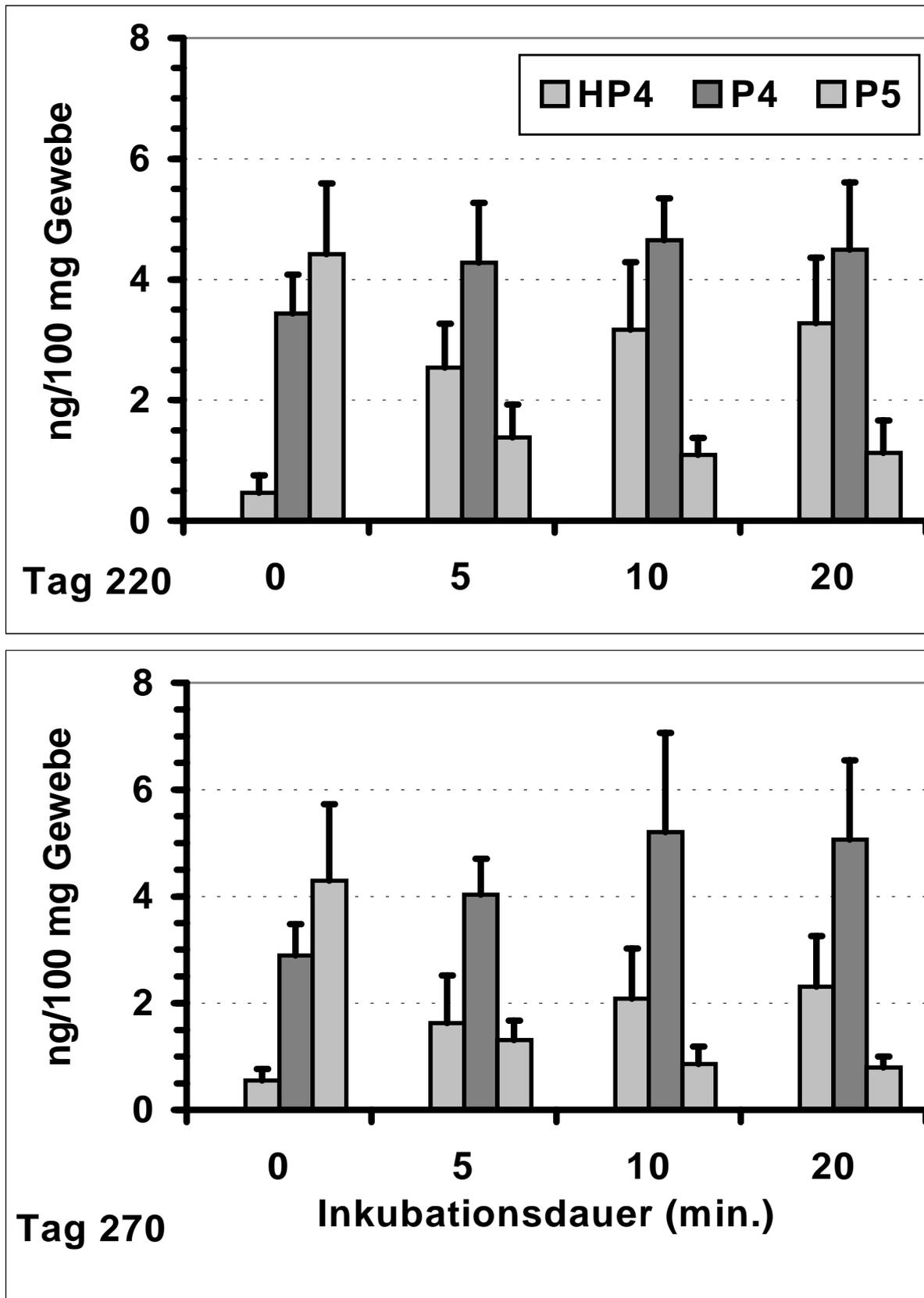


Abb. 9: Verlauf der Konzentrationen an endogenem  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (HP4), Progesteron (P4) und Pregnenolon (P5) während der Inkubation an den Graviditätstagen 220 bzw. 270 ( $n=3$  Tiere pro Gruppe;  $\bar{x} + SD$  in ng/100 mg Gewebe).

### **1.3. Diskussion**

#### **1.3.1. Diskussion der Methodik**

##### **1.3.1.1. Quantifizierung der anteilmäßigen Verteilung von Substrat und Metaboliten mittels HPLC**

Die Identifizierung der erfaßten Steroide nach HPLC-Trennung basierte auf der exakten Übereinstimmung der Retentionszeiten der jeweiligen Analyten mit denen entsprechender <sup>3</sup>H-markierter Standardsubstanzen. Bei der Berechnung der Anteile der einzelnen erfaßten Steroide wurde unterstellt, daß die im Chromatogramm identifizierten Peaks jeweils nur eine Substanz repräsentierten. Da die angewandte HPLC-Methode eine getrennte Quantifizierung von 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon und DHEA aufgrund partiell überlappender Peaks nicht erlaubte, wurden beide Steroide gemeinsam erfaßt.

Aufgrund der Chromatographie <sup>3</sup>H-markierter Standards war bekannt, daß Estradiol-17 $\beta$  im verwendeten Chromatographiesystem unmittelbar vor und zu einem erheblichen Teil überlappend mit Androstendion eluiert. In Parallelversuchen unter Verwendung eines alternativen Trennsystems, bestehend aus derselben stationären Phase und Acetonitril/H<sub>2</sub>O 3:7 (v/v) als mobiler Phase, in dem es zur vollständigen Auftrennung von Estradiol-17 $\alpha$ , Estradiol-17 $\beta$ , Androstendion und Estron kommt (s. Kapitel III), konnten jedoch weder Estradiol-17 $\alpha$  noch Estradiol-17 $\beta$  als Metaboliten nachgewiesen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß mit dem angewandten HPLC-Verfahren alle quantitativ bedeutsamen Metaboliten erkannt wurden.

Zur Berechnung der prozentualen Substratumwandlung wurde die Summe der Impulse pro Zeiteinheit (in cpm) aller Fraktionen eines HPLC-Eluats nach Korrektur um den technischen Background erfaßt und als Gesamtradioaktivität bezeichnet. Da in Abhängigkeit vom Substrat zusätzlich noch ein substratspezifischer Background zu berücksichtigen war (s. Abschnitt 1.2.2.3.7.) und diese in Abzug gebrachten Korrekturwerte gemittelte Werte darstellten, kam es in vereinzelt Fällen zu geringfügigen Überschätzungen des Backgroundabzugs. Aus dem angewandten weiteren Berechnungsverfahren resultierte daraus in Einzelfällen, daß die Summe der den identifizierten Peaks zugrundeliegenden prozentualen <sup>3</sup>H-Aktivität den Wert 100 geringfügig überstieg. Insgesamt ergaben sich für die auf die identifizierten Peaks fallende <sup>3</sup>H-Aktivität anteilmäßige Werte zwischen 91.5 $\pm$ 3.6% und 100.6 $\pm$ 2.9%, so daß davon auszugehen ist, daß keine oder nur in sehr geringem Maß weitere Metaboliten gebildet wurden.

##### **1.3.1.2. Bestimmung endogener Steroidkonzentrationen mittels HPLC-RIA**

Da der radioimmunologischen Bestimmung der endogenen Steroidkonzentrationen im Gewebe eine Auftrennung der Analyten mittels HPLC vorgeschaltet war, können Interferenzen aufgrund von Kreuzreaktivitäten der in den Radioimmunoassays verwandten Antisera ausgeschlossen werden. Die durch die größere Zahl der Aufbereitungsschritte beeinträchtigte Wiederfindung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, Progesteron und Pregnenolon lag zwischen

56.1±6.4% und 69.9±3.4% und war damit aber immer noch ausreichend hoch, um deutlich im Meßbereich der Methodik liegende Werte zu erhalten.

### 1.3.1.3. Inkubationssystem

In den vorliegenden Untersuchungen wurden anders als in früheren Untersuchungen, in denen Zellverbände als Probenmaterial eingebracht wurden (SCHMITT, 1994), Gesamtzellhomogenate inkubiert. Durch dieses Vorgehen konnte die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse erheblich verbessert werden. Weiterhin ermöglichte die Verwendung von homogenisiertem Gewebe eine schnellere und einfachere Handhabung des Probenmaterials. Da sich die Proteinkonzentrationen der getesteten Homogenate kaum unterschieden, konnte weiter auf eine Korrektur der Meßwerte auf den Proteingehalt der Homogenate verzichtet werden. Durch die Homogenisierung des Probenmaterials können die beobachteten Umwandlungen nicht mehr ohne weiteres den Leistungen vitaler Zellen gleichgesetzt werden, da sich durch die Zerstörung der Zellstrukturen die Möglichkeiten von Umsetzungen ergeben, die in vitalen Zellen durch die Kompartimentierung auf subzellulärer Ebene verhindert oder eingeschränkt werden. Es ist jedoch fraglich, inwieweit die bei der Inkubation von Zellverbänden beobachteten Umwandlungen tatsächlich der Aktivität vitaler Zellen entsprechen, da bei diesem *in vitro*-Modell einerseits ebenfalls mit Substratumwandlungen durch Enzyme, welche aus beschädigten Zellen austreten, gerechnet werden muß und andererseits die Substrataufnahme nicht den *in vivo*-Bedingungen entspricht. In den meisten steroidogenen Zellen wird Cholesterin in Form von Lipoproteinen über feine Kapillaren unmittelbar an die Zellen herangeführt und über spezifische Rezeptoren und Transportmechanismen aktiv in die Zellen aufgenommen. Auch innerhalb der Zelle unterliegt das aufgenommene Cholesterin komplexen Transport- und Verteilungsmechanismen (vergl. Abschnitt 1.1.2.1.). Somit ist es denkbar, daß bei der Supplementierung der Inkubationsmedien mit Zwischenstufen der Östrogensynthese trotz der allgemein guten Diffusionseigenschaften freier Steroide Probleme durch Diffusionsbarrieren entstehen können. In Vorversuchen zur Utilisierung von DHEA durch Trophoblastzellverbände konnten jedenfalls reproduzierbare und in physiologischer Hinsicht interpretierbare Ergebnisse erst nach Homogenisierung des Probenmaterials erzielt werden (ADIANI, 1995).

Die vorliegenden Untersuchungen haben in Übereinstimmung mit SCHMITT (1994) bestätigt, daß lange Inkubationszeiten und Vorinkubationen, wie vielfach in der Literatur beschrieben (EVANS und WAGNER, 1981; LARSON et al., 1981; GROSS und WILLIAMS, 1988b; HOEDEMEAKER et al., 1989; HOEDEMAKER et al., 1990; HOFFMANN et al., 1991) teilweise zu verfälschten und kaum im Sinne physiologischer Vorgänge interpretierbaren Ergebnissen führen. Erst durch die kurzen Inkubationszeiten und die niedrigen Substratmengen pro Ansatz konnte die Dynamik der enzymatischen Umwandlungsprozesse dargestellt werden, wobei vergleichsweise hohe prozentuale Umwandlungen erreicht wurden. Dies war jedoch erst dann der Fall, wenn – wie in Abschnitt 1.2.3.2.1. dargestellt – das Inkubationsmedium durch die Supplementierung essentieller Cofaktoren entsprechend optimiert wurde.

Beim Übergang von den methodischen Experimenten (s. Abschnitt 1.2.3.2.1.) zu den Versuchen bezüglich der Metabolisierung von C<sub>21</sub>-Steroiden in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium sowie unter der Geburt (Abschnitte 1.2.3.2.2. und 1.2.3.2.3.) wurde der Gewebegehalt des Gesamtzellhomogenates von 100 mg auf 50 mg bei gleichbleibendem Homogenatvolumen von 200 µl pro Inkubationsansatz reduziert. Trotz Reduktion der Gewebemenge pro inkubierter Probe stieg die Bildung von <sup>3</sup>H-Estron aus <sup>3</sup>H-Pregnenolon der zum Geburtszeitpunkt gewonnenen Homogenate durchschnittlich auf annähernd das Doppelte an. Vermutlich wurden in diesen Experimenten durch den BSA-Zusatz zum Medium die Steroide besser in Lösung gehalten und dadurch deren Adsorption an die Glasoberfläche der Inkubationsgefäße reduziert.

#### **1.3.1.4. Supplementierung des Inkubationsmediums mit Cofaktoren**

Vorversuche zur Etablierung des Inkubationsmediums ließen erkennen, daß im verwendeten Gewebehomogenat die Cofaktoren NADPH und NAD<sup>+</sup> nicht in ausreichenden endogenen Mengen vorhanden sind, um die abhängigen steroidumwandelnden Enzyme maximal zu stimulieren. Die ohne Cofaktor-Zusatz erzielten Umwandlungen waren meist sehr niedrig und kaum reproduzierbar. Der Aspekt der Cofaktor-Verfügbarkeit blieb in den meisten in vitro-Untersuchungen zur placentaren Steroidbiosynthese des Rindes bisher unberücksichtigt (EVANS und WAGNER, 1981; GROSS und WILLIAMS, 1988b; HOEDEMAKER et al., 1989; HOEDEMAKER et al., 1990; HOFFMANN et al., 1991; TSUMAGARI et al., 1993). Unbeschadet der Frage nach der Bedeutung der Verfügbarkeit dieser Cofaktoren als Regelfaktoren in der in vivo-Steroidbiosynthese, wozu bisher praktisch keine konkreten Informationen vorliegen, ist daher davon auszugehen, daß mit vorliegenden Untersuchungen erstmals ein weitgehend komplettes Bild der placentaren Steroidbiosynthese beim Rind erhalten wurde.

#### **1.3.2. Diskussion der Ergebnisse**

Die Ergebnisse der eigenen Versuche zeigen, daß der bovine Trophoblast alle zur Synthese von Östrogenen aus Pregnenolon erforderlichen Enzymsysteme besitzt. Damit werden frühere, aber weniger gut abgesicherte in vitro-Befunde von EVANS und WAGNER (1981), LARSON et al. (1981), GROSS und WILLIAMS (1988b), HOEDEMAKER et al. (1990) sowie die in vivo-Befunde von HOFFMANN (1983) bestätigt. Somit liegt beim Rind eine fetomaternalen Einheit, vergleichbar den Verhältnissen bei Pferd oder Mensch, nicht vor. Über Art und Herkunft des ursprünglichen Substrates, mit welchem die placentare Steroidsynthese des Rindes beginnt, können jedoch keine Angaben gemacht werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß beim Rind während der Gravidität sowie unter der Geburt der  $\Delta^5$ -Syntheseweg den Hauptweg der placentaren Östrogenbiosynthese darstellt. Dieser Tatsache liegt die nahezu vollständige Insuffizienz von P450c17 $\alpha$  hinsichtlich der Umwandlung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron in aromatisierbare Androgene zugrunde.

Da  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron – wie in Vorversuchen gezeigt wurde – selbst unter der Geburt kaum metabolisiert wurde (HARTUNG, 1995), stellt dieses somit unter quantitativen Gesichtspunkten das Endprodukt des  $\Delta 4$ -Synthesewegs im Trophoblasten des Rindes dar. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zur follikulären Östrogensynthese des Rindes (LACROIX et al., 1974) sowie mit den Studien von ESTABROOK et al. (1988) an Affennierenzellen nach Transfektion mit dem Gen der bovinen adrenalen P450c17 $\alpha$ . Offensichtlich hemmt die  $\Delta 4$ -Doppelbindung die Abspaltung der Seitenkette auf dem  $\Delta 4$ -Syntheseweg (ESTABROOK et al., 1988). Auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg kann Pregnenolon dagegen, wie die Experimente unter Verwendung von unter der Geburt entnommenem Probenmaterial zeigen, unter Beteiligung von P450c17 $\alpha$ , 3 $\beta$ -HSD und Aromatase rasch und mit hoher Ausbeute in Östrogene umgewandelt werden. Somit reiht sich das Rind in eine Gruppe mit den Primaten und dem Schaf ein, welche im Gegensatz zum Schwein und der Ratte kaum Androstendion auf dem  $\Delta 4$ -Syntheseweg produzieren können (CONLEY und BIRD, 1997). Aufgrund der eigenen Ergebnisse können im untersuchten Zeitraum bezüglich der plazentaren Steroidbiosynthese des Rindes zwei klar voneinander abgegrenzte Phasen unterschieden werden:

a) eine lange Phase, die vermutlich bereits weit vor dem 220. Graviditätstag beginnt und zwischen dem 270. Graviditätstag und der Geburt relativ abrupt endet. Diese Phase ist dadurch gekennzeichnet, daß Pregnenolon überwiegend in den  $\Delta 4$ -Syntheseweg eingeschleust und in Progesteron umgewandelt wird. Die Östrogensynthese verläuft hierbei – bezogen auf die Gewebemenge – auf relativ konstantem, niedrigem Niveau, sodaß der peripher meßbare allmähliche Östrogenanstieg in der 2. Graviditätshälfte offensichtlich vorwiegend das Wachstum des Trophoblasten widerspiegelt.

b) eine anschließende kurze, peripartale Phase, die vermutlich nicht mehr als die letzte Graviditätswoche inklusive Geburt umfaßt und mit der Ausstoßung der Plazenta endet. In dieser Phase wird Pregnenolon auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg bevorzugt in Östrogene umgewandelt. Sie korreliert daher offensichtlich mit dem wenige Tage vor der Geburt einsetzenden steilen Peak der freien Östrogene im maternalen Plasma.

Der Übergang zwischen beiden Phasen ist charakterisiert durch eine Umschaltung der plazentaren Steroidproduktion von einer vorwiegenden Progesteronproduktion auf die bevorzugte Produktion von Östrogenen. Durch die verstärkte Metabolisierung von Pregnenolon auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg wird der plazentaren Progesteronproduktion vermutlich ein erheblicher Teil des Substrats entzogen. Weiterhin sprechen die in Abschnitt 1.2.3.2.3. erhaltenen Ergebnisse dafür, daß dem Abfall des plazentaren Progesterons auch die verstärkte Umwandlung von Progesteron in  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron zugrunde liegt. Die drastische Steigerung der  $17\alpha$ -Hydroxylierung von Progesteron unter der Geburt zeigt, daß das präpartale Umschalten der plazentaren Steroidsynthese analog den Verhältnissen beim Schaf in erster Linie aus einer deutlichen Steigerung der P450c17 $\alpha$ -Aktivität resultiert.

Obwohl mit der Aufregulation der P450c17 $\alpha$  zweifellos der Hauptmechanismus der präpartalen Umstellungen im plazentaren Steroidmetabolismus erkannt wurde, gibt es dennoch erhebliche Unklarheiten über die zwischen den beiden Phasen unterschiedlichen Regelzustande. Für die Synthese von strogenen aus Pregnenolon werden die Aktivitäten von P450c17 $\alpha$ , 3 $\beta$ -HSD und Aromatase benötigt. Für die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron ist lediglich die Aktivität der 3 $\beta$ -HSD erforderlich. Nach CONLEY und BIRD (1997) wird der Fluß von Pregnenolon durch den  $\Delta$ 4- bzw.  $\Delta$ 5-Syntheseweg bestimmt durch die Konkurrenz von P450c17 $\alpha$  und 3 $\beta$ -HSD um Pregnenolon und die relative Effizienz der 17 $\alpha$ -Hydroxylaseaktivitat bzw. Lyaseaktivitat der P450c17 $\alpha$  gegenüber  $\Delta$ 4- bzw.  $\Delta$ 5-Steroiden. In diesem Zusammenhang stellt sich zu den eigenen Ergebnisse die Frage, wie v.a. in der zweiten Phase angesichts der hohen 3 $\beta$ -HSD-Aktivität verhindert wird, daß der Großteil des Pregnenolons weiterhin in den  $\Delta$ 4-Syntheseweg einmündet und damit für die Östrogensynthese nahezu komplett verlorenght? Ein vollständiges Herunterregeln der 3 $\beta$ -HSD wäre dafür keine Lösung, da dieses Enzym für die Umwandlung von DHEA in Androstendion weiterhin benötigt wird. Für die Beantwortung diese Frage bieten sich zwei verschiedene Modelle an, die sich jedoch gegenseitig nicht ausschließen und möglicherweise beide Gültigkeit besitzen:

*1. Im Trophoblasten des Rindes vorkommende Zellpopulationen besitzen eine unterschiedliche steroidogene Kompetenz.*

Die Erzeugung unterschiedlicher Steroid-Spektren in verschiedenen steroidogenen Organen kann durch unterschiedliche relative Aktivitäten steroidogener Enzyme erzielt werden. Den höchsten Grad an Unabhängigkeit in der Regulation der Steroidbiosynthese bietet jedoch die Kompartimentierung von Schlüsselenzymen in unterschiedlichen Geweben eines Organs (CONLEY und BIRD, 1997). Dieses Prinzip ist beispielsweise in der folliculären Östrogensynthese des Rindes verwirklicht, an der zwei Kompartimente mit unterschiedlicher Ausstattung an steroidogenen Enzymen - Theka interna und Granulosazellen - beteiligt sind (CONLEY et al., 1995). Eine unterschiedliche steroidogene Kompetenz der Trophoblastzellpopulationen wurde bereits von BEN-DAVID und SHEMESH (1990) postuliert, da in ihren immunhistologischen Untersuchungen P450scc in den uninukleären Trophoblastzellen, nicht jedoch in den Trophoblastriesenzellen nachweisbar war. Weitere Hinweise auf eine Kompartimentierung der plazentaren Steroidsynthese des Rindes auf zellulärer Ebene ergeben sich aus den Arbeiten von REIMERS et al. (1985) sowie MATAMOROS et al. (1994), nach denen offensichtlich die Estronproduktion bevorzugt in den uninukleären Trophoblastzellen lokalisiert ist, während die binuklearen Zellen (Trophoblastriesenzellen) berwiegend Progesteron produzieren. Die Bestätigung dies Modells könnte anhand qualitativer und quantitativer Untersuchungen zur Expression steroidogener Enzyme in den unterschiedlichen Trophoblastzellpopulationen erfolgen.

2. *Das Einschleusen des Substrates Pregnenolon in den  $\Delta 4$ - bzw.  $\Delta 5$ -Syntheseweg und damit in Richtung Progesteron- bzw. Östrogenproduktion wird über die unterschiedliche Affinität des Substrates Pregnenolon zur  $3\beta$ -HSD bzw.  $P450c17\alpha$  reguliert.*

Während das oben dargelegte Modell Erklärungsmöglichkeiten für mehrere Beobachtungen hinsichtlich des plazentaren Steroidstoffwechsels bietet, läßt es jedoch offen, wie angesichts der auch unter der Geburt offensichtlich abundanten  $3\beta$ -HSD-Aktivität (s. Abschnitt 1.2.3.2.1.) ein Abfließen des für die Progesteron- bzw. Östrogensynthese gemeinsamen Substrates Pregnenolon in Richtung  $\Delta 4$ -Syntheseweg verhindert wird. Wie in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist Pregnenolon, welches via  $3\beta$ -HSD in Progesteron umgewandelt wurde, beim Rind für die plazentare Östrogensynthese praktisch verloren, da der  $\Delta 4$ -Syntheseweg auf der Stufe des  $17\alpha$ -Hydroxyprogesterons blockiert ist. Eine Kompartimentierung auf zellulärer Ebene erscheint unter der Geburt fraglich, da zu diesem Zeitpunkt aufgrund des Verschwindens der Trophoblastriesenzellen weitgehend eine einzige, zumindest morphologisch einheitliche Zellpopulation - die uninukleären Trophoblastzellen - die Steroid-synthese bewerkstelligt. Eine mögliche Erklärung bietet hierfür die Beobachtung, daß bei der Inkubation von Kotyledonen-Homogenat eines Geburtstieres mit Pregnenolon die Erhöhung des Substratangebotes zu einer verstärkten Progesteronproduktion führt, während bei niedriger Substratmenge anteilmäßig mehr Östrogene gebildet werden (s. Abschnitt 1.2.3.2.1.). Offensichtlich „bevorzugt“ Pregnenolon die Umwandlung durch  $P450c17\alpha$  der Metabolisierung via  $3\beta$ -HSD. Biochemisch gesehen ließe sich dieses Phänomen durch eine höhere Affinität zwischen Pregnenolon und  $P450c17\alpha$  als zwischen Pregnenolon und  $3\beta$ -HSD erklären. Demnach würde erst nach weitgehender Absättigung der vergleichsweise niedrigen  $P450c17\alpha$ -Aktivität die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron in erheblichem Ausmaß stattfinden. Ist Pregnenolon auf dem  $\Delta 5$ -Syntheseweg in DHEA umgewandelt, bleibt als einziger bedeutender Weg der weiteren Umwandlung die Metabolisierung in Androstendion und damit die Einmündung in die Östrogensynthese. Diese geht aus den Inkubationen unter Verwendung von Pregnenolon als Substrat nach Hemmung der  $3\beta$ -HSD hervor (s. Abschnitt 1.2.3.2.3.), in denen außer DHEA/ $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon keine weiteren Metaboliten gefunden wurden. Zur Absicherung dieses Modells sind jedoch entsprechende enzymologische Untersuchungen erforderlich.

Obwohl die in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen wesentliche Informationen über den Ablauf und die Regulation der plazentaren Steroidbiosynthese erbrachten, lassen sie hinsichtlich der Funktion der plazentaren Steroide viele Fragen offen. Insbesondere die funktionelle Bedeutung der plazentaren Steroidbiosynthese in der langen, zumindest weite Bereiche der zweiten Graviditätshälfte umfassenden ersten Phase, wird bisher noch kaum verstanden. Am ehesten interpretierbar sind die Gegebenheiten in der zweiten, unmittelbaren peripartalen Phase. Dort können die Produktion hoher Konzentrationen freier und damit biologisch aktiver Östrogene sowie der Abfall des plazentaren Progesterons mit geburtsbedingten Vorgängen in Verbindung gebracht werden. Bedeutungen plazentarer Östrogene für die prä-

partale Anbildung der Milchdrüse, die Myometriumsaktivität und die Vorbereitung der weichen Geburtswege wurden beim Rind und anderen Spezies vielfach überwiegend aufgrund klinischer Beobachtungen postuliert, jedoch auf molekularer Ebene bisher erst teilweise geklärt. Insgesamt ergeben sich hinsichtlich der beobachteten peripartalen Veränderungen im plazentaren Steroidstoffwechsel viele Analogien zum Schaf. Bei dieser Spezies wurde gezeigt, daß aus den reifen fetalen Nebennieren ausgeschüttetes Cortisol die Expression der plazentaren P450c17 $\alpha$  stimuliert, woraus ein Abfall der plazentaren Progesteronproduktion und ein korrespondierender Anstieg der plazentaren Östrogensynthese resultiert (ANDERSON et al., 1975; LIGGINS et al., 1976; ANDERSON et al., 1978a, 1978b; FLINT et al., 1978; 1979; RICKETTS et al., 1980; FRANCE et al., 1988; MASON et al., 1989; THORBURN, 1991). Diese als „Plazentolyse“ bezeichneten Veränderungen im plazentaren Steroidstoffwechsel konnten in den eigenen Untersuchungen für das Rind bestätigt werden. Während jedoch beim Schaf der Abfall des plazentaren Progesterons zum Versiegen der Hauptprogesteronquelle und damit zur Aufhebung des Progesteronblocks führt, besitzt das Rind bis zum Ende der Gravidität eine zweite, quantitativ weit bedeutsamere Progesteronquelle, das Corpus luteum graviditatis, dessen funktionelle Ausschaltung, die Luteolyse, primäre Voraussetzung für die Aufhebung des Progesteronblocks an Myometrium und Zervix ist. Somit stellen sich die Fragen nach der zeitlichen bzw. einer eventuellen kausalen Beziehung zwischen der Luteolyse und der Plazentolyse. Diese Beziehungen sind zur Zeit noch weitgehend unklar. Die Plazentolyse kann in der Spätphase der Gravidität durch exogene Glukokortikoide induziert werden und führt ebenso zur Beendigung der Gravidität wie eine selektive Ausschaltung der Lutealfunktion. Der bei beiden Behandlungen zu beobachtende erhöhte Anteil an retinierten Plazenten (KARG et al., 1971; MUSAH et al., 1987) gibt Anlaß zu Zweifeln, inwieweit die beiden Strategien der Geburtsinduktion beim Rind tatsächlich die einer physiologischen Geburt zugrundeliegenden Regelvorgänge vollständig initiieren. Andererseits spricht die Tatsache, daß im Falle eines Ausbleibens des fetalen adrenalen Cortisolanstiegs die Geburt und damit auch die Luteolyse offensichtlich nicht auf natürlichem Wege in Gang kommt (HAFNER et al., 1991) dafür, daß unter physiologischen Bedingungen die Plazentolyse in die Induktion der Luteolyse involviert ist. Möglicherweise dient beim Rind die Plazentolyse der Bereitstellung eines luteolytischen Signals aus dem graviden Uterus. Die Art des luteolytischen Signals ist jedoch zur Zeit noch unklar. Umfangreichere Untersuchungen zu dieser Fragestellung liegen für die Ziege vor (FORD et al., 1998), die - wie das Rind - in der Spätgravidität zwei Gestagenquellen, Corpus luteum und Plazenta, aufweist und bei der dieselben präpartalen Veränderungen der plazentaren Steroidsynthese, induziert durch einen Cortisolanstieg im Fetus, nachgewiesen wurden. Bei der Ziege kann wie beim Rind durch die Verabreichung von Prostaglandinen die Geburt eingeleitet werden (CURRIE und THORBURN, 1973). Die Ergebnisse der Studien von FORD et al. (1998) sprechen jedoch gegen eine Rolle eines plazentaren PGF $2\alpha$ -Anstiegs bzw. eines Entzugs des möglicherweise luteotropen plazentaren PGE als ursprüngliche luteolytische Signale, da zum Zeitpunkt des Einsetzens der Luteolyse, er-

kennbar an einem signifikanten Abfall der Progesteronkonzentrationen 3-4 Tage ante partum, auch in der Vena uteroovarica keine Veränderungen der PGF $2\alpha$ - bzw. PGE-Konzentrationen festzustellen waren. Erst der letzte, steile Abfall der Progesteronkonzentrationen 24 Stunden ante partum geht mit dem geburtsassoziierten PGF $2\alpha$ -Anstieg einher. Nach Meinung der Autoren ist eine Bedeutung von PGF $2\alpha$  als Signal zur Lyse des Corpus luteum graviditatis jedoch nicht vollständig auszuschließen, da dieses auch lokal im Ovar, induziert durch ein anderes cortisolabhängiges Signal, gebildet werden könnte. Weiterhin könnte auch eine pulsatile Ausschüttung - wie am Ende des Zyklus beim Schaf nachgewiesen - bisher bei der präpartalen Ziege aufgrund der weiten Probenentnahmeintervalle unentdeckt geblieben sein.

Die Ergebnisse der Bestimmungen endogener Steroide zeigen, daß die Spiegel von endogenem Pregnenolon, Progesteron und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron gleichartigen Veränderungen unterworfen sind wie die entsprechenden  $^3\text{H}$ -markierten exogenen Substrate. Dies bedeutet, daß die exogenen Substrate in den Pool der endogenen Steroide eingehen. Die gemessenen Konzentrationen an endogenem Progesteron zeigen, daß dieses lokal in bedeutend höheren Konzentrationen vorliegt als im peripheren Plasma. Möglicherweise liegt darin die biologische Bedeutung der plazentaren Progesteronbiosynthese. Die Tatsache, daß bei Abwesenheit von lutealem Progesteron plazentares Progesteron im Zeitraum zwischen dem ca. 180.-240. Graviditätstag in der Mehrzahl der Fälle die Gravidität aufrecht erhalten kann, während in der folgenden Spätgravidität wieder vermehrt ein Abbruch der Gravidität beobachtet wurde (MAC DONALD et al., 1953; ESTERGREEN et al., 1967; LAURENDALE, 1975; DAY, 1977; CHEW et al., 1979; HOFFMANN et al., 1979; JOHNSON et al., 1981), läßt zunächst vermuten, daß es zwischen dem ca. 240. Graviditätstag und der Geburt zu einer erheblichen Reduktion der plazentaren Progesteronproduktion kommt. Die eigenen Ergebnisse lassen jedoch keinen Abfall der plazentaren Progesteronproduktion am Tag 270 gegenüber dem 220. Graviditätstag erkennen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von TSUMAGARI et al. (1994). Die verstärkte Abhängigkeit der Aufrechterhaltung der Gravidität von lutealem Progesteron in der Spätphase der Gravidität ist somit offensichtlich - bildhaft ausgedrückt - auf eine nach dem 240. Graviditätstag eintretende „Destabilisierung“ der Gravidität und einem damit verbundenen erhöhten Progesteronbedarf zurückzuführen (CHEW et al., 1979). Dies könnte durch den Anstieg biologisch aktiver Östrogene oder eine gesteigerte Metabolisierung von Progesteron im graviden Uterus bedingt sein. Die Beobachtung, daß der gravide Uterus am 250., nicht jedoch am 270. Graviditätstag zum peripheren maternalen Progesteronspiegel beiträgt (PIMENTEL et al., 1986) paßt zur letzteren Vermutung.

Mit dem etablierten in vitro-Inkubationssystem konnten somit physiologisch relevante Informationen erarbeitet werden. Ein echter Widerspruch zu in vivo-Beobachtungen ergaben sich lediglich hinsichtlich der Produktion konjugierter Östrogene. Während im peripheren maternalen Plasma sulfokonjugierte Östrogene mit Ausnahme der allerletzten Graviditätstage bei weitem überwiegen (HOFFMANN et al., 1997), konnten als östrogene Metaboliten im eige-

nen in vitro-Testsystem in signifikanten Mengen ausschließlich freies Estron nachgewiesen werden. Diesem Widerspruch soll im Kapitel II nachgegangen werden.

Zusammenfassend konnten durch die in diesem Abschnitt durchgeführten in vitro-Untersuchungen die plazentare Östrogenbiosynthese des Rindes in den Kotyledonen ausgehend von Pregnenolon nachgewiesen und eindeutig der  $\Delta^5$ -Syntheseweg als der Hauptsyntheseweg identifiziert werden. Weiterhin wurde die für das Schaf beschriebene, durch einen Anstieg der plazentaren P450c17 $\alpha$  vermittelte präpartale Umschaltung des plazentaren Steroidstoffwechsels von einer vorwiegenden Progesteronproduktion auf eine bevorzugte Synthese von Östrogenen für das Rind bestätigt.

#### 1.4. Literaturverzeichnis

- ADIANI S (1995). Etablierung eines In vitro-Testsystems zur gleichzeitigen Darstellung der Aktivität von 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Aromatase in der Plazenta des Rindes. Diss. med. vet., Giessen.
- AILENBERG M, SHEMESH M (1983). Partial purification of a chorionic gonadotropin-like protein from bovine cotyledons. *Biol. Reprod.* 28, 517-522
- ALBRECHT ED, PEPE GJ (1990). Placental steroid hormone synthesis in primate pregnancy. *Endocrine Reviews* 11, 124-150
- ANDERSON ABM, FLINT APF, TURNBULL AC (1975). Mechanism of action of glucocorticoids in induction of ovine parturition: effect on placental steroid metabolism. *J. Endocr.* 66, 61-70
- ANDERSON NG, CURET LB, COLAS AE (1978a). Changes in C19-steroid metabolism by ovine placentas during cortisol administration. *Biol. Reprod.* 18, 643-651
- ANDERSON NG, CURET LB, COLAS AE (1978b). Changes in C21-steroid metabolism by ovine placentas during cortisol administration. *Biol. Reprod.* 18, 652-657
- ARAKANE F, KING SR, DU Y, KALLEN CB, WALSH LP, WATARI H, STOCCO DM, STRAUSS JF (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272, 32656-32662
- ASIBEY-BERKO E, THOMAS JL, STRICKLER RC (1986). 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human placental microsomes and mitochondria: co-solubilization of androstene and pregnene activities. *Steroids* 47, 351-363
- ATKINSON BA, KING GJ, AMOROSO EC (1984). Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 30, 763-774
- BEN-DAVID E, SHEMESH M (1990). Ultrastructural localization of cytochrome P-450<sub>scc</sub> in the bovine placentome using a protein A gold technique. *Biol. Reprod.* 42, 131-138
- BENIRSCHKE K, KAUFMANN P (1995). Pathology of the human placenta. 3. Ausgabe. Springer-Verlag New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest, 1-871
- BERNIER M, GIBB W, SAEZ JM, COLLU R, CUCHARME J-R (1984). The 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity of cultured porcine Leydig cells in primary culture. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62, 1300-1303
- BIRGEL EH, ZERBE H, GRUNERT E (1996). Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen. *Prakt. Tierarzt* 77, 627-630
- BJÖRKMAN NH (1954). Morphological and histochemical studies on the bovine placentome. *Acta Anat.* 22 (Suppl.), 1-99
- BJÖRKMAN NH (1968). Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *J. Ultrastructure Research* 24, 249-258
- BJÖRKMAN NH (1969). Light and electron microscopic studies on cellular alteration in the bovine placentome. *Anat. Rec.* 163, 17-30
- BLACK SD (1987). P-450 cytochromes: structure and function. in: A. Meister (Hrsg.), *Advances in Enzymology* 60, 35-87
- BRANDT M, LEVY MA (1989). 3 $\beta$ -Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenases/3-keto-delta-5-steroid isomerase from bovine adrenals: Mechanism of inhibition by 3-oxo-4-aza steroids and kinetic mechanism of the dehydrogenase. *Biochemistry* 28, 140-148
- CASIDA LE, WARWICK EJ (1945). The necessity of the corpus luteum for maintenance of pregnancy in the ewe. *J. Anim. Sci* 4, 34-36

- CHALLIS JRG (1971). Sharp increase in free circulating oestrogens immediately before parturition in sheep. *Nature* 229, 208
- CHALLIS JRG, KENDALL JZ, ROBINSON JS, THORBURN GD (1977). The regulation of corticosteroids during late pregnancy and their role in parturition. *Biol. Reprod.* 16, 57-69
- CHEW B, ERB RE, FESSLER JF, CALLAHAN CJ, MALVEN, PV (1979). Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens and calving traits. *J. Dairy Sci.* 62, 557-566
- CHUNG B, PICADO-LEONARD J, HANIU M, BIENKOWSKI M, HALL PF, SHIVELY JE, MILLER WL (1987). Cytochrome P450c17 (steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicate the same gene is expressed in both tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 407-411
- COLE PA, ROBINSON CH (1991). Mechanistic studies on a placental aromatase model reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8130-8136
- CONLEY AJ, FORD SP (1987). Effect of prostaglandin F $_{2\alpha}$  induced luteolysis on in vivo and in vitro progesterone production by individual placentomes of cows. *J. Anim. Sci.* 65, 500-507
- CONLEY AJ, MASON JI (1990). Placental steroid hormones. *Ballière's Clin. Endocrinol. Metab.* 4, 249-272
- CONLEY AJ, BIRD IM (1997). The role of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the  $\Delta$ 5 and  $\Delta$ 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol. Reprod.* 56, 789-799
- CONLEY AJ, HEAD JR, STIRLING DT, MASON JI (1992). Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. *Endocrinology* 130, 2641-2650
- CONLEY AJ, KAMINSKI MA, DUBOWSKY SA, JABLONKA-SHARIFF A, REDMER DA, REYNOLDS LP (1995). Immunohistochemical localization of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\alpha$ -hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep and cows. *Biol. Reprod.* 52, 1081-1094
- COON MJ, DING XX, PERNECKY SJ, VAZ AD (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6, 669-673
- COOKE GM (1989). Identification and mechanism of action of phospholipids capable of modulating rat testicular microsomal 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in vitro. *Biol. Reprod.* 41, 438-445
- CURRIE WB, THORBURN GD (1973). Induction of premature parturition in goats by prostaglandin F $_{2\alpha}$  administered into the uterine vein. *Prostaglandins* 4, 201-214
- DAY AM (1977). Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle. *N. Z. Vet. J.* 25, 139-144
- DE LA LLOSA-HERMIER MP, ZONGAZO M-A, MARTAL J, HERMIER C (1988). Lack of short-term modulation of in vitro placental progesterone secretion in sheep. *Placenta* 9, 623-631
- DENAMUR R, MARTINET J (1955). Effects de l'ovariectomie chez la brebis pendant la gestation. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 149, 2105-2107
- DICZFALUSY E (1964). Endocrine functions of the human fetoplacental unit. *Fed. Proc.* 23, 45-58
- EDWARDS RJ, MURRAY BP, SINGLETON AM, BOBIS AR (1991). Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmatic reticulum. *Biochemistry* 30, 71-76
- ELEY RM, THATCHER WW, BAZER FW (1979). Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development. *J. Reprod. Fert.* 55, 181-190
- ESTABROOK RW, MASON JI, MARTIN-WIXTROM C, ZUBER M, WATERMAN MR (1988). Some enzymatic vagaries of a bovine adrenal microsomal cytochrome P-450 introduced and expressed in transformed monkey kidney cells. In: King TE, Mason HS, Morrison M (Hrsg.), *Oxida-*

- ses and related redox systems: Progress in clinical and biological research 274, Alan R. Liss Inc. New York, pp535-540
- ESTERGREEN VL, FROST OL, GOMES WR, ERB RE, BULLARD JF (1967). Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 50, 1293-1295
- EVANS G, WAGNER WC (1976). Bovine plasma oestrogens, progesterone and glucocorticoids during dexamethasone induced parturition. *Acta Endocr.* 81, 385-397
- EVANS G, WAGNER WC (1981). In vitro oestrogen synthesis by bovine placenta during pregnancy and induced parturition. *Acta Endocr.* 98, 119-125
- FERRE F, BREUILLER M, CEDARD L (1975). Human placental delta5-3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity (delta5-3 $\beta$  HSDH): intracellular distribution, kinetic properties, retroinhibition and influence of membrane delipidation. *Steroids* 26, 551-570
- FISHMAN J, GOTO J (1981). Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J. Biol. Chem.* 256, 4466-4471
- FISHMAN J, RAJU MS (1981). Mechanism of estrogen biosynthesis. Stereochemistry of C-1 hydrogen elimination in the aromatization of 2 $\beta$ -hydroxy-19-oxoandrostenedione. *J. Biol. Chem.* 256, 4472-4477
- FLINT APF, KINGSTON EJ, ROBINSON JS, THORBURN GD (1978). Initiation of parturition in the goat: evidence for control by foetal glucocorticoid through activation of placental C21-steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase. *J. Endocr.* 78, 367-378
- FLINT APF, RICKETTS AP, CRAIG VA (1979). The control of placental steroid synthesis at parturition in domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2, 239-251
- FORD MM, YOUNG IR, CADDY DJ, THORBURN GD (1998). Fetal and maternal endocrine changes approaching parturition in the goat: lack of evidence for prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub>  as signals for luteolysis. *Biol. Reprod.* 58, 1065-1070
- FRANCE JT, MAGNESS RR, MURRY BA, ROSENFELD CR, MASON JI (1988). The regulation of ovine placental steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase and aromatase by glucocorticoid. *Molec. Endocrin.* 2, 193-199
- FÜRBASS R, KALBE C, VANSELOW J (1997). Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. *Endocrinology* 138, 2813-2819
- GOTO J, FISHMAN J (1977). Participation of a nonenzymatic transformation in the biosynthesis of estrogens from androgens. *Science* 195, 80-81
- GROSS TS, WILLIAMS WF (1988a). Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. *Biol. Reprod.* 38, 1027-1034
- GROSS TS, WILLIAMS WF (1988b). In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition. *J. Reprod. Fert.* 83, 565-573
- GROSS TS, WILLIAMS WF, RUSSEK-COHEN E (1991). Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta* 12, 27-35
- HAFNER A, WANKE R, SCHMIDT P, HANICHEN T, BISE K (1991). Hypopituitarism as the possible cause of prolonged gestation in cattle. *Tierärztl. Prax.* 19, , 258-262
- HALL PF (1986). Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids* 48, 133-196
- HALL PF (1991). Cytochrome P-450 C21sc: one enzyme with two actions: hydroxylase and lyase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 527-532
- HALL PF, ALMAHBOBI G (1997). Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microscopy Research and Technique* 36, 463-479

- HARTUNG BF (1995). In vitro-Nachweis des Syntheseweges von Östrogenen aus C21-Steroiden in der Rinderplazenta unter Berücksichtigung verschiedener Graviditätsstadien. Diss. med. vet., Gießen
- HENRICKS DM, DICKEY JF, HILL JR, JOHNSTON WE (1971). Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows. *Endocrinology* 90, 1336-1342
- HINSHELWOOD MM, CORBIN CJ, TSANG PC, SIMPSON ER (1993). Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 133, 1971-1977
- HOEDEMAKER M, WESTON PG, MARQUES AP, WAGNER WC (1989). Steroid synthesis by the fetal part of the bovine placenta of late pregnancy in vitro: effect of a low dose of dexamethasone in vivo. *Theriogenology* 32 (4), 653-666
- HOEDEMAKER M, WESTON PG, WAGNER WC (1990). Influence of cortisol and different steroidogenic pathways on estrogen synthesis by the bovine placenta. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1012-1015
- HOFFMAN LH, WOODING FBP (1993). Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J. Exp. Zool.* 266, 559-577
- HOFFMANN B (1983). Untersuchungen zur Steroidhormonsynthese in der Plazenta des Rindes. *Wien. tierärztl. Mschr.* 70, 224-228
- HOFFMANN B (1994). Gravidität, Geburt, Puerperium. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie - 3. Auflage*, F. Döcke (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, 509-541
- HOFFMANN B, KYREIN HJ, ENDER ML (1973a). An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Horm. Res.* 4, 302-310
- HOFFMANN B, SCHAMS D, GIMENEZ T, ENDER ML, HERRMANN C, KARG H (1973b). Changes of progesterone, total oestrogens, corticosteroids, prolactin and LH in bovine peripheral plasma around parturition with special reference to effect of exogenous corticoids and a prolactin inhibitor respectively. *Acta Endocrinol.* 73, 385-395
- HOFFMANN B, WAGNER WC, HIXON JE, BAHR J (1979). Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 2, 253-266
- HOFFMANN B, EGGERS ER, WAGNER WC, ELLENDORFF F (1991). In vitro studies on the steroid biosynthesis by the placenta of the cow between days 200 and 250 of gestation. *Reprod. Dom. Anim.* 26, 251-259
- HOFFMANN B, HÖVELER R, HASAN SH, FAILING K (1992). Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J. Reprod. Fert.* 96, 837-845
- HOFFMANN B, HÖVELER R, NOHR B, HASAN SH (1994). Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 185-189
- HOFFMANN B, GENTZ F, FAILING K (1996). Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG-concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 717-723
- HOFFMANN B, GOES DE PINHO T, SCHULER G (1997). Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105, 296-303
- HRADECKY P, MOSSMAN HW, STOTT GG (1988). Comparative development of ruminant placentomes. *Theriogenology* 29, 715-729
- ISHII-OHBA H, SAIKI N, INANO H, TAMAOKI B-I (1986). Purification and characterization of rat adrenal 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase with steroid 5-ene-4-ene-isomerase. *J. Steroid Biochem.* 24, 753-760

- ISHIMURA K, YOSHINAGA-HIRABAYASHI T, FUJITA H, ISHII-OHBA H, INANO H, TAMAKI B (1988). Light and electron microscopic immunocytochemistry on the localization of 3 $\beta$ -hydroxy-steroid dehydrogenase/isomerase in the bovine adrenal cortical cells. *Histochemistry* 89, 35-39
- JEFCOATE CR, McNAMARA BC, ARTEMENKO I, YAMAZAKI T (1992). Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43, 751-767
- JOHNSON WH, MANNS JG, ADAMS WM, MAPLETOFT RJ (1981). Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. *Can. Vet. J.* 22, 288-290
- KARG H, BÖHM S, GÜNZLER O, MÜLLER S (1971). Erfahrungen über die Geburtseinleitung beim Rind mit Glukokortikoiden. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 78, 35-39
- KELLIS JT, VICKERY LE (1987). Purification and characterization of human placental aromatase cytochrom P-450. *J. Biol. Chem.* 262, 4413-4420
- KING GJ, ATKINSON BA, ROBERTSON HA (1979). Development of the bovine placentome during the second month of gestation. *J. Reprod. Fert.* 55, 173-180.
- KING GJ, ATKINSON BA, ROBERTSON HA (1980). Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. *J. Reprod. Fert.* 59, 95-100
- KITAGAWA T, SAKAMOTO H, SUGIYAMA T, YAMANO T (1982). Formation of the semiquinone form in the anaerobic reduction of adrenodoxin reductase by NADPH. *J. Biol. Chem.* 257, 12057-12080
- KLISCH K, PFARRER C, SCHULER G, HOFFMANN B, LEISER R (1999a). Tripolar acytokinetic mitosis and formation of fetomaternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multicellular cells. *Anat. Embryol.* 200, 229-237
- KLISCH K, PFARRER C, SCHULER G, HOFFMANN B, LEISER R (1999b). DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta* 20, 451-458
- KUSS E (1994). The fetoplacental unit of primates. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 135-165
- LACROIX E, EECHAUTE W, LEUSEN I (1974). The biosynthesis of oestrogen by cow follicles. *Steroids* 23, 337-356
- LARSON K, WAGNER WC, SACHS N (1981). Oestrogen synthesis by bovine foetal placenta at normal parturition. *Acta Endocr.* 98, 112-118
- LAURENDALE JW (1975). The use of prostaglandins in cattle. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15, 419-425
- LEISER R (1975). Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind. *Anat. Histol. Embryol.* 4, 63-86
- LEISER R, KAUFMANN P (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.* 203, 122-134
- LEISER R, KREBS C, EBERT B, DANTZER V (1996). Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and human. *Microsc. Res. Techn.* 38, 76-87
- LEISER R, KREBS C, KLISCH K, EBERT B, DANTZER V, SCHULER G, HOFFMANN B (1997). Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. *J. Anat.* 191, 517-527
- LIGGINS GC, GRIEVES SA, KENDALL JZ, KNOX BS (1972). The physiological roles of progesterone, oestradiol-17 $\beta$  and prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  in the control of ovine parturition. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 16, 85-103
- LIGGINS GC, FAIRCLOUGH RJ, GRIEVES SA, FORSTER CS, KNOX BS (1976). Parturition in the sheep. in: *The Fetus and Birth, A Ciba Foundation Symposium* 47, 5-30

- LORENCE MC, MURRY BA, TRANT JM, MASON JI (1990). Human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology* 126, 2493-2498
- LUO L, HAOLIN C, STOCCO DM, ZIRKIN BR (1998). Leydig cell protein synthesis and steroidogenesis in response to acute stimulation by luteinizing hormone in rats. *Biol. Reprod.* 59, 263-270
- LUU-THE V, COTÉ J, LABRIE F (1988). Purification and characterization of human placenta 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase delta5-delta4-isomerase. *Clin. Invest. Med.* 11, C200
- LUU THE V, TAKAHASHI M, DE-LAUNOIT Y, DUMONT M, LACHANCE Y, LABRIE F (1991a). Evidence for distinct dehydrogenase and isomerase sites within a single 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase. *Biochemistry* 30, 8861-8865
- LUU THE V, TAKAHASHI M, LABRIE F (1991b). Differential inhibition of dehydrogenase and 5-ene $\rightarrow$ 4-ene isomerase activities of purified 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Evidence for two distinct sites. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40, 545-548
- MANN MR, CURET LB, COLAS AE (1975). Aromatizing activity of placental microsomal fractions from ewes in late gestation. *J. Endocr.* 65, 117-125
- MASON JI, FRANCE JT, MAGNESS RR, MURRY BA, ROSENFELD CR (1989). Ovine placental steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20-lyase, aromatase and sulphatase in dexamethasone-induced and natural parturition. *J. Endocr.* 122, 351-359
- MATAMOROS A, CAAMANO L, LAMB SV, REIMERS TJ (1994). Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biol. Reprod.* 51, 486-492
- McDONALD LE, McNUTT SH, NICHOLS RE (1953). On the essentiality of the bovine corpus luteum of pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 14, 539-541
- MENDELSON CR, MEANS GD, MAHENDROO MS, CORBIN CJ, STEINKAMPF MP, GRAHAM-LORENCE S, SIMPSON ER (1990). Use of molecular probes to study regulation of aromatase cytochrome P-450. *Biol. Reprod.* 42, 1-10
- MILLER WL (1988). Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. *Endocrine Reviews* 9, 295-318
- MILLER WL (1995). Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55, 607-616
- MÖSTL E (1994). The horse feto-placental unit. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 166-168
- MÖSTL E, MÖSTL K, CHOI HS, DREIER HK, STOCKL W, BAMBERG E (1985). Plasma levels of androstenedione, epitestosterone, testosterone and oestrogens in cows at parturition. *J. Endocrinol.* 89, 251-255
- MÖSTL E, CHOI HS, BAMBERG E (1985). Stimulation of androgen and oestrogen concentrations in plasma of cows after administration of synthetic glucocorticoid (flumethasone) at the end of gestation. *J. Endocr.* 105, 121-126
- MORGAN G, WOODING FBP, BECKERS JF, FRIESEN HG (1989). In immunological cryoultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fert.* 86, 745-752
- MORGAN G, WOODING FBP, GODKIN JD (1993). Localization of bovine trophoblast protein -1 in the cow blastocyst during implantation: an immunological cryoultrastructural study. *Placenta* 14, 641-649
- MOSSMAN HW (1987). *Vertebrate fetal membranes*. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NJ
- MUSAH AI, SCHWABE C, WILLHAM RL, ANDERSON LL (1987). Induction of parturition, progesterone secretion, and delivery of placenta in beef heifers given relaxin with cloprostenol or dexamethasone. *Biol. Reprod.* 37, 797-803

- MUTO N, TAN L (1986). Stereochemistry of estrogen biosynthesis by a reconstituted aromatase cytochrome P-450 preparation from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 454-462
- MYANT NB (1990). Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor. Academic Press, New York, 233-315
- NEBERT DW, GONZALES FJ (1987). P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 945-993
- NICKSON DA, McBRIDE MW, ZEINALI S, HAWES CS, PETROPOULOS A, MUELLER UW, SUTCLIFFE RG (1991). Molecular cloning and expression of human trophoblast antigen FDO161G and its identification as 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *J. Reprod. Fert.* 93, 149-156
- ORME-JOHNSON NR (1990). Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 213-231
- PAPADOPOULOS V, AMRI H, BOUJRAD N, CASCIO C, CULTY M, GARNIER M, HARDWICK M, LI H, VIDIC B, BROWN AS, REVERSA JL, BERNASSAU JM, DRIEU K (1997). Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62, 21-28
- PASHEN RL, ALLEN WR (1979). The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27, 499-509
- PASHEN RL, SHELDRIK EL, ALLEN WR, FLINT APF (1982). Dehydroepiandrosterone synthesis by the fetal foal and its importance as an oestrogen precursor. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32, 389-397
- PEPE GJ, ALBRECHT ED (1995). Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr. Rev.* 16, 608-648
- PESCADOR N, SOUMANO K, STOCCO DM, PRICE CA, MURPHY BD (1996). Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 55, 485-491
- PIMENTEL SM, PIMENTEL CA, WESTON PG, HIXON JE, WAGNER WC (1986). Progesterone secretion by the bovine fetoplacental unit and responsiveness of corpora lutea to steroidogenic stimuli at two stages of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 47 No. 9, 1967-1971
- RABE T, BRANDSTETTER K, KELLERMANN J, RUNNEBAUM B (1982). Partial characterization of placental 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (EC 1.1.1.145), delta 4-5 isomerase (EC 5.3.3.1) in human term placental mitochondria. *J. Steroid Biochem.* 17, 427-433
- REIMERS TJ, ULLMANN MB, HANSEL W (1985). Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 33, 1227-1236
- RICHERT-HANAUER U, FAILING K, HOFFMANN B, MÖLLMANN U (1988). Untersuchungen zum Verlauf der Cortisolwerte im Blut beim Schaf während des Zyklus und der Trächtigkeit. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 95, 374-376
- RICKETTS AP, FLINT APF (1980). Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta. *J. Endocr.* 86, 337-347
- RICKETTS AP, GALIL AKA, ACKLAND N, HEAP RB, FLINT APF (1980). Activation by corticosteroids of steroid metabolizing enzymes in ovine placental explants in vitro. *J. Endocr.* 85, 457-469.
- ROBERTSON HA, KING GJ (1975). Estrogens and placental attachment in the cow. *J. Anim. Sci.* 41, 377
- ROBERTSON HA, KING GJ (1979). Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 55, 463-470
- RUNNEBAUM B, RABE T (1983). Zur Regulation der plazentaren Progesteronsynthese beim Menschen. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 43, 87-92 (Sonderheft)

- SACHS L (1984). Die Student-Verteilung. In: Sachs L (Hrsg.) *Angewandte Statistik*, 6. Ausgabe. Springer Verlag Heidelberg, New York, Tokyo
- SAVION N, LAHERTY R, COHEN D, LUI G-M, GOSPODAROWICZ D (1982). Role of lipoproteins and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in progesterone production by cultured bovine granulosa cells. *Endocrinology* 110, 13-22
- SCHALLENBERGER E, RAMPP J, WALTERS DL (1985). Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. II. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout pregnancy. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 108, 322-330
- SCHMITT B (1994). Charakterisierung der Umsetzung von Androstendion in Östrogene durch die Plazenta beim Rind. Diss. med. vet., Giessen
- SCHOON H-A (1989). Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität. Vet. med. Habil.-Schrift, Hannover
- SCHROEDER F, FROLOV AA, MURPHY EJ, ATSHAVES BP, JEFFERSON JR, PU L, WOOD WG, FOXWORTH WB, KIER AB (1996). Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213, 150-177
- SCHULER G, HARTUNG F, HOFFMANN B (1994). Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 169-174
- SETHUMADHAVAN K, BELLINO FL, THOTAKURA NR (1991). Estrogen synthetase (aromatase). The cytochrome P-450 component of the human placental enzyme is a glykoprotein. *Molec. Cell. Endocr.* 78, 25-32
- SHEMESH M (1990). Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 129-135
- SHEMESH M, HANSEL W, STRAUSS JF (1983). Bovine placentomes contain factors which decrease progesterone secretion. *Biol. Reprod.* 29, 856-862
- SHEMESH M, HANSEL W, STRAUSS JF (1984). Calcium dependent, cyclic nucleotid-independent steroidogenesis in the bovine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6403-6407
- SHEMESH M, HANSEL W, STRAUSS JF, SHORE LS (1989). Regulation of side-chain cleavage enzyme and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by Ca<sup>2+</sup> second messenger and protein kinase C systems in the placenta of the cow. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 37, 163-172
- SHIMOZAWA O, SAKAGUCHI M, OGAWA H, HARADA N, MIHARA K, OMURA T (1993). Core glycosylation of cytochrome P-450(arom). Evidence for localization of N-terminus of microsomal cytochrome P-450 in the lumen. *J. Biol. Chem.* 268, 21399-21402
- STOCCO DM (1998). Recent advances in the role of StAR. *Rev. Reprod.* 3, 82-85
- STRAHL H (1912). Zur Kenntnis der Wiederkäuerplacentome. *Anat. Anz.* 40, 257-264
- STRAUSS JF, MARTINTEZ F, KIRIAKIDOU M (1996). Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol. Reprod.* 54, 303-311
- TALAMANTES F, OGREN L (1988). The placenta as an endocrine organ: polypeptides. In: Knobil E, Neill J et al. (Hrsg.); *The physiology of reproduction*, Vol. 2, 2093-2144. Raven Press Ltd, New York
- TAN L, MUTO N (1986). Purification and reconstitution properties of human placental aromatase. A cytochrome P-450-type monooxygenase. *Eur. J. Biochem.* 156, 243-250
- THOMAS JL, BERKO EA, FAUSTINO A, MYERS RP, STRICKLER RC (1988). Human placental 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5 $\rightarrow$ 4-ene-isomerase: purification from microsomes, substrate kinetics, and inhibition by products steroids. *J. Steroid Biochem.* 31, 785-793
- THOMAS JL, MYERS RP, STRICKLER RC (1989). Human placental 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5 $\rightarrow$ 4-ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profi-

- les, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes. *J. Steroid Biochem.* 31, 785-793
- THOMPSON EA, SIITERI PK (1974). The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J. Biol. Chem.* 219, 5373-5378
- THORBURN GD, NICOL DH, BASSETT JM, SHUTT DA, COX RI (1972). Parturition in the goat and sheep: changes in corticosteroids, progesterone, oestrogens and prostaglandin F. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 16, 61-84
- THORBURN GD (1991). The placenta, prostaglandins and parturition: a review. *Reprod. Fert. Dev.* 3, 277-294
- TÓTH IE (1992). Lipoprotein receptors and steroidogenesis in adrenocortical cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43, 395-402
- TÓTH IE, SZABŐ D, BRUCKNER GG (1997). Lipoproteins, lipid droplets, lysosomes, and adrenocortical steroid hormone synthesis: morphological studies. *Microsc. Res. Tech.* 36, 480-492
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKESHI M (1993). Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fert.* 98, 631-636
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKEISHI M (1994). 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fert.* 102, 35-39
- ULLMANN MB, REIMERS TJ (1989). Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 37, 173-179
- VIJAYAKUMAR S, SALERNO JC (1992). Molecular modeling of the 3-D structure of cytochrome P-450<sub>scc</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 1160, 281-286
- WAGNER WC, ELLENDORF F, HOFFMANN B, EGGERS GR, EVERS P (1986). Untersuchungen zur plazentären Steroidhormonsynthese beim Rind. *Zuchthygiene* 21, 158-159
- WAGNER WC, EGGERS G, HOFFMANN B, ELLENDORFF F (1992). Changes in placental hormone secretion after dexamethasone treatment in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 27, 85-92
- WANGO EO, WOODING FBP, HEAP RB (1990). The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. *J. Anat.* 171, 241-257
- WATERMAN MR (1998). Steroidogenesis, StAR and PBR: Is there a light at the end of the tunnel? *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 121-122
- WATHES DC, WOODING FBP (1980). An electron microscopic study of implantation in the cow. *Am. J. Anat.* 159, 285-306
- WILLIAMS WF, MARGOLIS MJ, MANSPEAKER J, DOUGLASS LW, DAVIDSON JP (1987). Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. *Theriogenology* 28 No. 2, 213-223
- WIMSATT WA (1951). Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am. J. Anat.* 89, 233-281
- WINKEL CA, SNYDER JM, MACDONALD PC (1980). Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. *Endocrinology* 106, 1054-1060
- WOICKE J, SCHOON H-A, HEUWIESER W, SCHULZ L-C, GRUNERT E (1986). Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. *J. Vet. Med. A* 33, 660-667
- WOODING FBP (1984). Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am. J. Anat.* 170, 233-250

- WOODING FBP (1992). Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13, 101-113
- WOODING FBP, WATHES DC (1980). Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fert.* 59, 425-430
- WOODING FBP, FLINT APF, HEAP RB, MORGAN G, BUTTLE HL, YOUNG IR (1986). Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. *J. Reprod. Fert.* 76, 499-512
- WOODING FBP, BECKERS JF (1987). Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res.* 247, 667-673
- WOODING FBP, HOBBS T, MORGAN G, HEAP RB, FLINT APF (1993). Cellular dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. *J. Reprod. Fert.* 98, 275-283
- YAGUCHI H, TSUTSUMI K, SHIMONO K, OMURA M, SASANO H, NISHIKAWA T (1998). Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life Sciences* 62,1387-1395
- YAMAZAKI T, NAWA K, KOMINAMI S, TAKEMORI S (1992). Cytochrome P450 (17 alpha, lyase)-mediating pathway of androgen synthesis in bovine adrenocortical cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1134, 143-148
- ZHENG J, FRICKE PM, REYNOLDS LP, REDMER DA (1994). Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 51, 623-632
- ZUBER MX, SIMPSON ER, WATERMAN MR (1986). Expression of bovine 17 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P450 cDNA in non-steroidogenic (COS 1) cells. *Science* 234, 1258-1261



**KAPITEL II**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG UND BEDEUTUNG  
KONJUGIERTER ÖSTROGENE WÄHREND DER  
GRAVIDITÄT DES RINDES**

## INHALTSVERZEICHNIS

2.1.	Einleitung.....	85
2.2.	Literaturübersicht .....	86
2.2.1.	Östrogensulfotransferase .....	86
2.2.1.1.	Klassifizierung der Sulfotransferasen und physikochemische Eigenschaften der Östrogensulfotransferase .....	86
2.2.1.2.	Biologische Bedeutungen der Sulfokonjugation von Steroiden .....	89
2.2.1.3.	Regulation der Östrogensulfotransferase .....	90
2.2.1.4.	Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur Östrogensulfotransferase im Endometrium während der Gravidität und in der Plazenta beim Rind und anderen Spezies .....	91
2.2.2.	Östrogensulfatase.....	92
2.2.2.1.	Klassifizierung der Sulfatasen und physikochemische Eigenschaften der menschlichen Steroidsulfatase .....	92
2.2.2.2.	Biologische Bedeutungen der Steroidsulfatase .....	95
2.2.2.2.1.	Biologische Bedeutung der Sulfatase in der Plazenta des Menschen.....	95
2.2.2.2.2.	“Sulfatase Pathway” .....	96
2.2.2.3.	Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur Östrogensulfatase im Endometrium während der Gravidität und in der Plazenta beim Rind und anderen Spezies .....	96
2.3.	Material und Methoden .....	97
2.3.1.	Tiermaterial und Probenentnahme .....	97
2.3.2.	Präparation des Gewebes .....	98
2.3.3.	Herstellung der Homogenate .....	99
2.3.4.	Herstellung der subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe .....	99
2.3.5.	In vitro-Inkubationssystem zur Untersuchung der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase (OST) und –sulfatase (OS).....	100
2.3.5.1.	Herstellung der <sup>3</sup> H-markierten Substratlösungen .....	100
2.3.5.2.	Herstellung der Kontrollproben .....	100
2.3.5.3.	Inkubationsansätze unter Verwendung von Gewebehomogenaten als Probenmaterial.....	101
2.3.5.4.	Inkubationsansätze unter Verwendung von subzellulären Fraktionen als Probenmaterial.....	101
2.3.5.5.	Inkubationsansätze zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase (OST).....	101

---

2.3.5.6.	Aufbereitung der Inkubationsansätze und Messung der Substratumwandlungen .....	102
2.3.5.7.	Auswertung der Ergebnisse und statistische Berechnungen .....	103
2.3.6.	Radioimmunologische Bestimmungen fetaler und maternaler Steroidhormonkonzentrationen im peripheren Blutplasma.....	104
2.3.7.	Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer.....	104
2.3.7.1.	Chemikalien.....	104
2.3.7.2.	<sup>3</sup> H-markierte Steroide .....	104
2.3.7.3.	Materialien und Geräte .....	105
2.3.7.4.	Puffer.....	106
2.4.	Ergebnisse.....	107
2.4.1.	Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma der Versuchstiere .....	107
2.4.2.	Sulfokonjugation von Estron in Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe .....	108
2.4.3.	Sulfokonjugation von Estron in subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe.....	111
2.4.4.	Substratspezifität der Östrogensulfotransferase.....	113
2.4.5.	Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Karunkel- bzw. Kotyledonen gewebe .....	114
2.4.6.	Hydrolyse von Estronsulfat in subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe.....	118
2.4.7.	Begleitende Untersuchungen zur Bedeutung konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes .....	121
2.4.7.1.	Sulfokonjugation von Estron und Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Myometrium.....	121
2.4.7.2.	Sulfokonjugation von Estron und Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Lutealgewebe gravider bzw. zyklischer Rinder.....	124
2.5.	Diskussion.....	126
2.5.1.	Diskussion der Methodik.....	126
2.5.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	127
2.5.2.1.	Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma .....	127
2.5.2.2.	Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase in Kotyledonen und Karunkeln .....	127
2.5.2.3.	Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase im Myometrium.....	129

---

2.5.2.4.	Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase im Corpus luteum.....	130
2.5.2.5.	Interpretation der Ergebnisse aus funktioneller Sicht.....	130
2.6.	Literaturverzeichnis .....	133

## 2.1. Einleitung

Im vorangegangenen Kapitel wurde ein *in vitro*-System zur Charakterisierung der plazentaren Steroidbiosynthese des Rindes ausgehend von Pregnenolon etabliert. Mit diesem Testsystem konnten Ergebnisse erarbeitet werden, die im Einklang mit *in vivo*-Untersuchungen stehen und somit als physiologisch relevant angesehen werden können. Ein wesentlicher Widerspruch zwischen *in vivo*-Daten und den durch das eigene *in vitro*-Testsystem erhaltenen Resultaten ergibt sich hinsichtlich des Endprodukts der plazentaren Östrogenbiosynthese. Bei den Messungen im maternalen Blutplasma stellt mit Ausnahme der letzten Graviditätstage Estronsulfat das Hauptprodukt der plazentaren Östrogensynthese dar (HOFFMANN et al., 1997). Auch im fetalen Blutplasma liegen die Östrogene plazentaren Ursprungs überwiegend in Form von Konjugaten vor (HOFFMANN et al., 1976; HOFFMANN, 1983). Weiterhin deuten Messungen von Gewebekonzentrationen im Trophoblasten (SCHMITT, 1994) und frühere punktuelle *in vitro*-Untersuchungen von KIESENHOFER (1987) sowie von MATTIOLI et al. (1984) darauf hin, daß die graviditätsassoziierten Östrogene beim Rind in erheblichem Ausmaß bereits in der Plazenta konjugiert werden. In den eigenen *in vitro*-Inkubationen war dagegen die Bildung konjugierter Östrogene nicht nachweisbar. Auch SCHMITT (1994) fand bei seinen *in vitro*-Untersuchungen zur Aromatisierung von Androstendion unter Verwendung von nichthomogenisiertem Trophoblastgewebe unter den Reaktionsprodukten konjugierte Östrogene nur in Spuren.

Eine bisher in ihrer biologischen Bedeutung nicht verstandene Eigenschaft der plazentaren Steroidbiosynthese des Rindes ist die Bildung großer Mengen an konjugierten Östrogenen. Die im maternalen Blutplasma zirkulierenden Konzentrationen übersteigen um ein mehrfaches die bei östrischen Rindern gemessenen Östrogenkonzentrationen. Allerdings handelt es sich hierbei im Gegensatz zu den Verhältnissen im Östrus nicht um das biologisch sehr aktive Estradiol-17 $\beta$ , sondern, wie bereits angesprochen, überwiegend um konjugiertes Estron (HOFFMANN et al., 1997). In konjugierter Form verlieren Östrogene ihre Bindungsfähigkeit an den Östrogenrezeptor und sind somit zumindest über den klassischen Wirkmechanismus inaktiv (HÄHNEL et al., 1973).

Ziel der in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen war es daher, den Widerspruch zwischen den Ergebnissen von *in vivo*-Untersuchungen und den Resultaten der eigenen *in vitro*-Inkubationen aufzuklären. Dazu sollten über die Lokalisation und *in vitro*-Charakterisierung der Sulfotransferaseaktivität in der zweiten Graviditätshälfte sowie unter der Geburt weitere Informationen über eine mögliche biologische Bedeutung konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes erhalten werden. Nachdem Vorversuche die Anwesenheit hoher Östrogensulfatase-Aktivitäten im Probenmaterial erkennen ließen, wurden parallele Untersuchungen zur Aktivität dieses Enzyms durchgeführt, da es konjugierte Östrogene durch die Abspaltung des Sulfatrestes in freie Formen überführen und somit eine Wirksamkeit am Östrogenrezeptor herbeiführen kann.

## 2.2. Literaturübersicht

### 2.2.1. Östrogensulfotransferase

#### 2.2.1.1. Klassifizierung der Sulfotransferasen und physikochemische Eigenschaften der Östrogensulfotransferase

Die Östrogensulfotransferase (EC 2.8.2.4.; OST) sulfokonjugiert Östrogene an deren C3-ständiger OH-Gruppe, indem sie an das Sauerstoffatom des Steroids die Sulfatgruppe von 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) bindet. Dieses "aktivierte" Sulfat wird synthetisiert, indem zunächst Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat durch das Enzym ATP-Sulfurylase zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat umgesetzt werden, worauf das entstandene Adenosin-5'-phosphosulfat mit einem weiteren Adenosin-5'-phosphosulfat unter Einwirkung des Enzyms APS-Kinase zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat und Adenosindiphosphat reagieren. Bei der „Sulfokonjugation“ von Östrogenen handelt es sich nach der allgemeinen chemische Nomenklatur eigentlich um eine Sulfonierung und bei den Reaktionsprodukten folglich um Sulfonate. In der Literatur wird diese Reaktion jedoch meist unkorrekt als Sulfatierung bezeichnet (KUSS, 1994; STROTT, 1996; FALANY, 1997). Da sich dieser Begriff inzwischen allgemein etabliert hat, wird im folgenden ebenfalls von Sulfatierung, Steroidsulfaten und Sulfatase gesprochen.

Beim Menschen werden Sulfotransferasen in zwei große Gruppen eingeteilt: die membrangebundenen Sulfotransferasen des Golgiapparates, welche die Sulfokonjugation von Glukosaminoglykanen sowie der Tyrosinreste von Proteinen katalysieren, und die Gen-Superfamilie der „zytosolischen“ Sulfotransferasen, welche für die Sulfatierung von Pharmaka, Xenobiotika und niedermolekularen endogenen Substanzen verantwortlich sind. Die Gruppe der zytosolischen Sulfotransferasen wird wiederum nach strukturellen, enzymologischen und immunologischen Gesichtspunkten unterteilt in die Hydroxysteroid- oder Alkoholsulfotransferasen und die Phenolsulfotransferasen. Jede dieser beiden Untergruppen besteht offensichtlich aus multiplen, nahe verwandten Isoformen mit ähnlichen, überlappenden oder unterschiedlichen Substratspezifitäten. Die Östrogensulfotransferase wird zusammen mit den eigentlichen Phenolsulfotransferasen der Phenolsulfotransferasen-Familie zugeordnet. Diese Zuordnung zu den Phenolsulfotransferasen erfolgte aufgrund von Ähnlichkeiten in der Nukleotidsequenz der entsprechenden cDNAs (FALANY und WILBORN, 1994; STROTT, 1996; FALANY, 1997; WEINSHILBOUM et al., 1997). Nach der Nomenklatur der Internationalen Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie (WEBB, 1992) werden vier Enzyme anerkannt, welche die Sulfatierung von Steroiden katalysieren:

- a) Alkohol-Sulfotransferase (Hydroxysteroid-Sulfotransferase, EC 2.8.2.2.): relativ unspezifisch; sulfatiert neben Hydroxysteroiden primäre und sekundäre Alkohole einschließlich aliphatische Alkohole, Ascorbinsäure, Chloramphenicol, Ephedrin, jedoch keine phenolischen Steroide.

- b) Estron-Sulfotransferase (EC 2.8.2.4.): spezifisch für die 3-OH-Gruppe von Östrogenen.
- c) Steroid-Sulfotransferase (EC 2.8.2.15): relativ unspezifisch; Substratspektrum ähnlich EC 2.8.2.2., sulfatiert jedoch auch Estron.
- d) Cortisol-Sulfotransferase (Glukokortikosteroid-Sulfotransferase; EC 2.8.2.18): spezifisch für die 21-OH-Gruppe von Glukokortikoiden.

STROTT (1996) hält diese Einteilung für unbefriedigend, da sie sehr viele Fragen offen läßt und nicht dem derzeitigen Kenntnisstand entspricht. Nach FALANY (1997) gibt es beim Menschen mindestens vier zytosolische Sulfotransferasen (ST): die Östrogen-ST, die Hydroxysteroid-ST (= DHEA-ST) sowie die phenol- bzw. monoaminsulfatierende Form der Phenol-ST (P-PST bzw. M-PST). Davon sollen mit Ausnahme der M-PST alle zur Sulfatierung von Östrogenen befähigt sein, wenn auch mit großen Unterschieden hinsichtlich der Affinität (s.u.).

Hinsichtlich der Substratspezifität und der exakten Identität des Enzyms bzw. der Enzyme, welches/welche die Sulfokonjugation von Östrogenen katalysiert/katalysieren, bestanden lange Zeit große Unsicherheiten. Dies ist v.a. darauf zurückzuführen, daß frühere Untersuchungen an wenig aufbereitetem Probenmaterial wie Homogenaten oder Zellfraktionen durchgeführt wurden. Da neuere Untersuchungen gezeigt haben, daß die Sulfokonjugation von Steroiden durch mehrere Enzyme mit zum Teil überlappenden Substratspezifitäten katalysiert wird, ist es in einem Großteil der älteren Publikationen kaum nachvollziehbar, welches bzw. welche der zur Sulfatierung von Östrogenen befähigten Enzyme bei den Untersuchungen erfaßt wurden. Da kaum eines der in Frage kommenden Enzyme in reiner Form isoliert werden konnte, liegen den gemessenen Umwandlungen vermutlich die Aktivitäten mehrerer Enzyme zugrunde bzw. wurden die bei der physikalisch-chemischen Charakterisierung erhobenen Daten durch verschiedene Enzymproteine beeinflusst. Erst durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden wurden hier in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte erzielt (BERNIER et al., 1994b; STROTT, 1996; FALANY, 1997; WEINSHILBOUM et al., 1997). So hat sich beim Menschen beispielsweise gezeigt, daß sich die cDNA der plazentaren Östrogensulfotransferase und der Arylsulfotransferase des Gehirns nur im nichttranslatierten 5'-Ende unterscheiden und daß die entsprechenden mRNAs vom selben Gen unter alternativer Verwendung der Exons 1a bzw. 1b transkribiert werden (BERNIER et al., 1994b). Weiterhin deuten bisherige Informationen auf speziesspezifische Unterschiede im Substratspektrum und das Vorkommen organspezifischer (SONG et al., 1995) sowie geschlechtsspezifischer Isoformen hin (FALANY et al., 1995a). Die Östrogensulfotransferasen besitzen eine hohe Substratspezifität für Östrogene mit  $K_m$ -Werten für Estradiol-17 $\beta$  und Estron im unteren nanomolaren Bereich (FALANY et al., 1995b). Auch die in der Leber in hohen Aktivitäten vorkommenden Phenol- und Hydroxysteroidsulfotransferasen besitzen die Fähigkeit zur Sulfatierung von Östrogenen, allerdings mit  $K_m$ -Werten im mikromolaren Bereich. Daher erscheint es fraglich, ob

diese Enzyme unter in vivo-Bedingungen eine Rolle bei der Sulfokonjugation von Östrogenen spielen (HERNANDEZ et al., 1992; FALANY, 1997; SONG et al., 1997).

ADAMS und LOW (1974) bezeichnen die plazentare Östrogensulfotransferase des Rindes als hochspezifisch für die 3-Hydroxy-Gruppe von Östrogenen, weil keine Sulfatierung neutraler Steroide mit einer OH-Gruppe am C3-Atom, wie DHEA oder Pregnenolon beobachtet werden konnte. Auch Testosteron, Progesteron, Corticosteron und p-Nitrophenol stellten keine Substrate für die OST der Rinderplazenta dar. Die Östrogenspezifität der OST in der menschlichen Leber ist dagegen offensichtlich nur relativ, da - wenn auch in deutlich geringerem Umfang - DHEA und Pregnenolon sulfokonjugiert werden (FALANY et al., 1995b; FALANY, 1997).

Die cDNA der plazentaren OST des Rindes kodiert für ein Protein aus 295 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33000-34600 Da (NASH et al., 1988). Sehr ähnliche Molekulargewichte werden für die plazentare OST des Menschen (BERNIER et al., 1994a), die adrenale OST des Meerschweinchens (WHITNALL et al., 1993), die testikuläre OST der Maus (SONG et al., 1995) die endometriale OST des Schweins (BROOKS et al., 1987) sowie für die OST der menschlichen Leber (FALANY et al., 1995b) angegeben. Da sich die plazentare OST des Rindes unter nichtdenaturierenden Bedingungen in der Gelfiltration sowie in der Gelelektrophorese wie ein Molekül von ca. 70 kDa verhält (MOORE et al., 1988), ist das native Enzym offensichtlich ein Dimer aus identischen Untereinheiten. Sie kommt vermutlich in zwei bis drei Isoformen vor (NASH et al., 1988; ADAMS, 1991). Aufgrund früherer Untersuchungen wurde eine strukturelle Ähnlichkeit mit Serumalbumin postuliert (CLARKE et al., 1982a). Diese Ergebnisse basierten jedoch offensichtlich auf Artefakten durch die Kopurifikation von Transferrin, welches sich bei den gängigen Proteinreinigungstechniken sehr ähnlich verhält wie die bovine plazentare OST (ADAMS, 1991). Nach ADAMS und LOW (1974) stimmen beim Rind die OST der Plazenta und der NNR in allen untersuchten biochemischen Eigenschaften überein.

Die OST kommt beim Menschen in den meisten fetalen Geweben vor (WENGLE, 1966). Im adulten Organismus ist die Anzahl von Geweben mit nachweisbarer OST-Aktivität deutlich reduziert (BOSTROM und WENGLE, 1967). Dabei ergeben sich Abhängigkeiten von der Spezies, vom Alter und vom Geschlecht (STROTT, 1996). Beim Rind werden die höchsten Aktivitäten in der Plazenta gemessen, gefolgt von der NNR und der Leber. In einer Vielzahl weiterer getesteter Gewebe bzw. Organe einschließlich Uterus, Hypophyse, Hoden, Ovar, Corpus luteum, Niere, Lunge, Prostata und Gehirn konnte dagegen keine bzw. nur eine marginale Sulfokonjugation von Östrogenen festgestellt werden (HOLCENBERG und ROSEN, 1965).

Bezüglich der subzellulären Lokalisation der OST bestehen weiterhin Unklarheiten. Sulfotransferasen werden in der Literatur allgemein als lösliche bzw. zytoplasmatische Enzyme ohne Bezug zur zellulären Struktur beschrieben (FALANY und WILBORN, 1994). Im Hoden

der Maus wurde die OST tatsächlich immunhistologisch gleichmäßig verteilt im Zytoplasma der LEYDIG-Zellen nachgewiesen, während sich die Kerne dieser Zellen kaum anfärbten (SONG et al., 1997). In der Nebennierenrinde des Meerschweinchens beschreiben WHITTALL et al. (1993) dagegen eine Östrogensulfotransferase, welche sich von der  $3\alpha$ - bzw.  $3\beta$ -Hydroxysteroidsulfotransferase immunologisch und bezüglich der subzellulären Verteilung unterscheidet. Immunhistologisch fand sich die OST konzentriert im Kern, während im Zytoplasma nur ein schwaches diffuses Signal nachweisbar war, mit Ausnahme von intensiven Signalen in nicht näher charakterisierten intrazytoplasmatischen Einschlüssen, die Ähnlichkeiten mit Fetttropfchen (lipid droplets) aufwiesen. Die Hydroxysteroidsulfotransferasen wurden dagegen bevorzugt im ER lokalisiert, während sie in den Kernen nicht nachweisbar waren.

### 2.2.1.2. Biologische Bedeutungen der Sulfokonjugation von Steroiden

Die Sulfatierung durch zytosolische Sulfotransferasen stellt ein wichtiger Schritt in der Bio-transformation vieler Pharmaka und Xenobiotika, aber auch endogener Substrate wie Steroide und Schilddrüsenhormone dar. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Sulfonat-Kette in stark geladenem Zustand vor. Die Kopplung der sehr polaren Sulfonat-Kette an diese Substrate bewirkt somit eine Zunahme der Wasserlöslichkeit, welche meist zu einer erhöhten Ausscheidung über Urin und Galle führt. Bei Steroiden ist durch die starke Zunahme der Hydrophilie mit der Sulfatierung weiterhin eine drastische Verkleinerung des Verteilungsvolumens verbunden. Meist resultiert aus der Sulfokonjugation eine Abnahme der Wirkung. In selteneren Fällen kann die Sulfokonjugation jedoch auch zu einer Bioaktivierung von Substanzen, wie z.B. bestimmter Prokarzinogene führen. Eine Beteiligung der OST an derartigen Prozessen wurde bisher jedoch nicht beschrieben (FALANY und WILBORN, 1994; STROTT, 1996; FALANY, 1997).

Entsprechend der oben dargestellten allgemeinen Bedeutung der Sulfokonjugation im Rahmen der Inaktivierung und Ausscheidung exogener und endogener Substanzen wird der OST eine wichtige Rolle bei der Regulation der Verfügbarkeit freier, aktiver Östrogene zugesprochen. Bei Östrogenen geht die Sulfokonjugation mit einem Verlust der Rezeptorbindung einher (HÄHNEL et al., 1973). Neben der Inaktivierung von Östrogenen wurde im Endometrium des Schweines während der Lutealphase ein weiterer Mechanismus zur Begrenzung der Östrogenwirkung unter Beteiligung der OST postuliert: durch den Entzug rezeptoraktiver Östrogene soll die OST wesentlich an der progesteroninduzierten Down-Regulation des Östrogenrezeptors beteiligt sein. So konnte durch die Applikation eines OST-Inhibitors die progesteroninduzierte Downregulation des Östrogenrezeptors unterdrückt werden (SAUNDERS et al., 1989). Beim Menschen wird der Verlust der Sulfotransferaseaktivität als ein möglicher wichtiger Schritt bei der Entstehung östrogenabhängiger Mammatumoren diskutiert (FALANY und FALANY, 1997).

Eine Erhöhung der Ausscheidungsrate durch die Sulfokonjugation ist im Falle der Östrogene kaum anzunehmen, da z.B. Estronsulfat im Blutplasma wie andere Steroide mit hoher Avidität an Plasmaproteine, v.a. Albumin gebunden ist (PUCHE und NES, 1962; BOUHAMIDI et al., 1992). Dementsprechend verlängert sich durch die Sulfokonjugation die Halbwertszeit von Steroiden im Blut erheblich (WANG et al., 1967a,b). Daher zirkulieren sulfokonjugierte Steroide im Vergleich zu den entsprechenden freien Formen in vielfach höheren Konzentrationen (STROTT, 1996).

Nachdem die Sulfokonjugation von Steroiden lange Zeit fast ausschließlich als Inaktivierung und Vorbereitung zur Ausscheidung betrachtet wurde, finden Steroidsulfate zunehmend Interesse als Substanzen mit eigener biologischer Funktion bzw. Wirkung. Bereits frühzeitig wurde erkannt, daß die Humanplazenta hinsichtlich ihrer Östrogensynthese auf C19-Vorstufen angewiesen ist, welche in sulfokonjugierter Form überwiegend von der fetalen NNR bereitgestellt werden (s. Kapitel I, Abschnitt 1.1.3.). Somit können sulfatierte Steroide als inaktive Hormonvorstufen dienen, welche in Zielorganen selektiv durch die Einwirkung einer Sulfatase und ggf. weiterer Enzyme in aktive Hormone umgewandelt werden. Die Sulfatierung dient hier offensichtlich einer verbesserten Transportierbarkeit, möglicherweise auch der Vermeidung unerwünschter Wirkungen außerhalb der jeweiligen Zielzellen. Eine Rolle konjugierter Östrogene als aktivierbare Hormonvorstufen wurde im Zusammenhang mit der lokalen Östrogenproduktion in menschlichen Mammatumoren angenommen (s. Abschnitt 2.2.2.2.). Eine entsprechende physiologische Bedeutung plazentarer konjugierter Östrogene wurde von JANSZEN et al. (1995) für das Rind postuliert.

Neben der Funktion sulfokonjugierter Steroide als Transport- oder Depotform wurde auch über direkte Wirkungen berichtet, die offensichtlich nicht über den klassischen genomischen Wirkmechanismus vermittelt werden. So beeinflußt das zu den Neurosteroiden gehörende Pregnenolonsulfat in bestimmten Hirnregionen das Erinnerungsvermögen (FLOOD et al., 1995; DARNAUDERY et al., 1998). Im menschlichen Amnion wurde *in vitro* eine Stimulation der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität durch DHEA-, Pregnenolon- und Estronsulfat, nicht jedoch durch Cholesterinsulfat und freie Steroide beobachtet (SAITOH et al., 1984). Ob dieser Beobachtung eine physiologische Bedeutung zukommt und wie dieser Effekt vermittelt wird, ist zur Zeit noch unklar.

### **2.2.1.3. Regulation der Östrogensulfotransferase**

Die Aktivität von Sulfotransferasen wird hormonell geregelt. Dementsprechend besitzen Sulfotransferase-Gene Hormone Responsive Elements in ihren Promoter-Abschnitten. Die Art der Regulation sowie die zugrundeliegenden Mechanismen sind zur Zeit noch weitgehend unklar (STROTT, 1996). In Abhängigkeit von Spezies, Geschlecht und Zelltyp wurde die Regulation der OST durch Hormone verschiedener Klassen nachgewiesen. Untersuchungen zur Regulation der OST-Aktivität liegen in erster Linie für das menschliche Endometrium

(TSENG und LIU, 1981; CLARKE et al., 1982b; FALANY et al., 1998) und das Endometrium des Schweines (MEYERS et al., 1983; SAUNDERS et al., 1989) vor. Übereinstimmend ergab sich bei beiden Spezies, daß während des Zyklus in der Follikelphase basale OST-Aktivitäten gemessen wurden, die in der Lutealphase parallel zum Progesteronspiegel deutlich anstiegen. In vitro-Untersuchungen bestätigten, daß die endometriale OST nach Östrogen-Priming in der Proliferationsphase in der Sekretionsphase durch Progesteron induziert wird (TSENG und LIU, 1981; CLARKE et al., 1982; MEYERS et al., 1983), wobei dieser Effekt über den Progesteronrezeptor vermittelt wird (FALANY und FALANY, 1996b).

In den LEYDIG-Zellen der Maus, in denen die OST bei adulten Tieren in hohem Ausmaß exprimiert wird, unterliegt diese der Regulation durch LH. So ist die testikuläre OST erst mit dem Durchlaufen der Pubertät nachweisbar. Weiterhin führt die Hypophysektomie adulter Tiere zum Verlust der testikulären OST-Expression, welche durch die Applikation von HCG wiederhergestellt werden kann (SONG et al., 1997).

Auch in der Leber männlicher, nicht jedoch weiblicher Ratten kommt es unter der Pubertät zu einem deutlichen Anstieg der OST-mRNA. Während eine Hypophysektomie die OST-Expression in der Leber männlicher Ratten nicht beeinflußt, kommt es bei weiblichen Ratten unter dieser Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der OST-Expression. In männlichen hypophysektomierten Ratten wurde eine Suppression der OST-Expression durch Wachstumshormon beobachtet (KLAASSEN et al., 1998). Auch Thyroxin supprimiert die OST-Expression in der Leber männlicher Ratten (BORTHWICK et al., 1995). Ferner wird die OST-Expression in der Rattenleber durch die Selenversorgung der Tiere beeinflußt. Die Verfütterung einer selenarmen Diät reduzierte die OST-mRNA erheblich im Vergleich zu adäquat ernährten Kontrolltieren (YANG und CHRISTENSEN, 1998).

#### **2.2.1.4. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur Östrogensulfotransferase im Endometrium während der Gravidität und in der Plazenta beim Rind und anderen Spezies**

Untersuchungen zur OST-Aktivität in der Plazenta des Rindes liegen zur Zeit nur punktuell für den 7.-8. Graviditätsmonat (MATTIOLI et al., 1984) sowie für den unmittelbaren präpartalen Zeitraum und die Geburt (MÖSTL et al., 1986; KIESENHOFER, 1987) vor. Übereinstimmend ergaben sich in diesen Untersuchungen deutlich höhere OST-Aktivitäten im fetalen Teil der Plazentome im Vergleich zu den Karunkeln. BROWN et al. (1987) erzeugten einen monoklonalen Antikörper gegen die plazentare OST des Rindes und wiesen diese bei der immunhistologischen Untersuchung von Plazentomen ausschließlich im Zytoplasma der Trophoblastriesenzellen nach, wobei keine Angaben über das untersuchte Graviditätsstadium gemacht wurden.

Gestationsprofile der endometrialen OST-Aktivität ergaben beim Schwein und beim Schaf deutliche, jedoch unterschiedliche Abhängigkeiten vom Graviditätsstadium (DWYER und

ROBERTSON, 1980). Beim Schwein fielen die zwischen Tag 12-30 der Gravidität hohen OST-Aktivitäten im weiteren Verlauf der Gravidität deutlich ab. Beim Schaf dagegen war nach niedrigen OST-Aktivitäten bis zum 20. Graviditätstag ein steiler Anstieg bis zur Mitte der Gravidität feststellbar.

Auch bei der Maus steigt ab dem 12. Trächtigkeitstag die Aktivität der plazentaren OST im weiteren Verlauf der Gravidität an. Im Uterus ist ebenfalls ab dem 16. Graviditätstag eine ansteigende OST-Aktivität nachweisbar. Die uterine OST-Expression ist graviditätsassoziiert und räumlich auf die Anheftungsstellen der Plazenten begrenzt (HOBKIRK et al., 1983).

In der Humanplazenta konnte im Gegensatz zum Fetus (DICZFALUSY et al., 1969; HONDOH et al., 1994) und zum Endometrium (TSENG und LIU, 1981; CLARKE et al., 1982b; GROSSO und WAY, 1984; HATA et al., 1987) lange Zeit keine OST-Aktivität nachgewiesen werden. Später gelang TSENG et al. (1985) die Darstellung einer zytosolischen OST-Aktivität in der Geburtsplazenta des Menschen. Die Aktivität dieses Enzymes wurde in den früheren Untersuchungen offensichtlich durch die hohe Aktivität der plazentaren Steroidsulfatase maskiert.

## **2.2.2. Östrogensulfatase**

### **2.2.2.1. Klassifizierung der Sulfatasen und physikochemische Eigenschaften der menschlichen Steroidsulfatase**

Über das Enzym bzw. die Enzyme, welches/welche die Hydrolyse sulfokonjugierter Steroide katalysiert/katalysieren, liegen beim Rind kaum Informationen vor. Die Sulfataseaktivität in der Plazenta des Menschen ist wegen ihrer Bedeutung im Zusammenhang mit der X-Chromosom-abhängigen Ichthyose, welcher ein Mangel dieses Enzymes zugrunde liegt, wesentlich besser untersucht (s. Abschnitt 2.2.2.2.1.). Die exakte Identität des Enzymes, welches Steroidsulfate hydrolysiert, war auch beim Menschen lange umstritten. Dies zeigt sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Bezeichnungen wie beispielsweise Arylsulfatase C (SHANKARAN et al., 1991), Steroidsulfatase (NOEL et al., 1983), Sterylsulfatase (DIBBELT und KUSS, 1986), Steroid-Sulfohydrolase (CHIBBAR und MITCHELL, 1990) und Östrogensulfatase (PASQUALINI et al., 1992), wobei unklar blieb, inwieweit diesen Bezeichnungen dasselbe Enzym zugrunde liegt.

Erst in den letzten Jahren wurden - nicht zuletzt durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden - beim Menschen erhebliche Fortschritte hinsichtlich der Biochemie und Genetik der Sulfatasen erzielt (Übersicht bei PARENTI et al., 1997). Sulfatasen katalysieren die Hydrolyse von Sulfatester-Bindungen, wobei als Substrate sowohl recht komplexe Substanzen wie beispielsweise Glykosaminoglykane oder auch relativ kleine Moleküle wie Steroidsulfate dienen können. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihrer subzellulären Lokalisation. Da sie untereinander große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, werden die Sulfatasen als Mitglieder einer Genfamilie angesehen. Aufgrund der konservierten Struktur

auf Aminosäure-Ebene wird vermutet, daß sie durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen hervorgegangen sind. Sulfatase-Gene finden sich bereits bei niederen Eukaryonten. Vermutlich haben einige der Genduplikationen sehr früh in der Evolution stattgefunden, da einige der Sulfatase-Gene auf DNS-Ebene einen relativ niedrigen Grad der Konservierung aufweisen und über das gesamte Genom verstreut sind. Beim Menschen wurden bisher 9 Sulfatasen und die entsprechenden Gene identifiziert. Als Arylsulfatasen, zu denen auch die Steroidsulfatase gehört, wird eine Untergruppe der Sulfatasen bezeichnet, welche die Fähigkeit zur Hydrolyse von Sulfatestern aromatischer Verbindungen besitzen. Mittlerweile sind sechs Arylsulfatasen (ARS) klassifiziert worden, welche als ARS A-F bezeichnet werden. Dabei sind die natürlichen Substrate der ARS D-F derzeit noch unbekannt (PARENTI et al., 1997). Die ARS A-C wurden früher in die Arylsulfatasen Typ I und II eingeteilt. Der Arylsulfatase Typ I wurde die ARS C zugeordnet, welcher auch die Steroidsulfatase-Aktivität zugeschrieben wurde. Die zum Typ II gehörenden Arylsulfatasen A und B sind lösliche, lysosomale Enzyme. Sie hydrolysieren keine Steroidsulfate. Ihre spezifischen Substrate sind Substanzen, die sich deutlich von den Substraten der Arylsulfatase C unterscheiden: Cerebrosid-Sulfatide für die Arylsulfatase A (MEHL und JATZKEWITZ, 1968, CHANG et al., 1986), Dermatansulfate und verwandte Mucopolysaccharidsulfate für die Arylsulfatase B (FLUHARTY et al., 1975; CHANG et al., 1986).

Arylsulfatase C und Steroidsulfatase des Menschen wurden zunächst als identisch angesehen. Anhand unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten in gelelektrophoretischen Untersuchungen wurden zwei Isoformen erkannt und charakterisiert: f (= fast)-Form bzw. s (= slow)-Form. Beide Formen besitzen ähnliche Molekulargewichte, unterscheiden sich jedoch durch unterschiedliche pH-Optima, Hitzestabilität, antigene Eigenschaften und Substratspezifität (SIMARD et al., 1985; CHANG et al., 1990; SHANKARAN et al., 1991). Unter denaturierenden Bedingungen wurden Molekulargewichte um 75 kDa ermittelt, das native Enzym liegt vermutlich als Polymer vor (BURNS, 1983; NOEL et al., 1983). In der Literatur finden sich aber hiervon abweichend weitere unterschiedliche Molekulargewichtsangaben. Dies ist jedoch eher auf Probleme bei der Solubilisierung und Reinigung als auf die Existenz unterschiedlicher Enzyme zurückzuführen (DIBBELT und KUSS, 1986). Nachdem erkannt worden war, daß die Arylsulfatase C in Form von zwei Isoformen existiert, von denen die s-Form mit der Steroidsulfataseaktivität assoziiert ist, wurde postuliert, daß s- und f-Form durch posttranskriptionelle oder posttranslationelle Modifikationen aus demselben Genprodukt hervorgehen, da in Fällen von Sulfatasedefizienz beide Formen fehlten. Genetische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß die beiden Isoformen aus unterschiedlichen Genen hervorgehen, die aber beide auf dem Teil des X-Chromosoms lokalisiert sind, welcher der X-Inaktivierung entgeht (SHAPIRO et al., 1979; CHANG et al., 1990; SHANKARAN et al., 1991). Die cDNA der menschlichen Steroidsulfatase kodiert für ein Protein von 583 Aminosäuren (STEIN et al., 1989).

S- und f-Form der Arylsulfatase C besitzen eine unterschiedliche, jedoch teilweise überlappende Substratspezifität: das künstliche aromatische Substrat 4-Methylumbelliferyl-Sulfat wird von beiden Formen mit ähnlicher  $K_m$  umgesetzt. Die f-Form besitzt jedoch mit 2-7% der Aktivität der s-Form praktisch keine Aktivität gegenüber Steroidsulfaten. Die s-Form der menschlichen Plazenta hydrolysiert mit absteigender Effizienz Cholesterinsulfat, Estronsulfat und DHEA-Sulfat (SHANKARAN et al., 1991). Nach Transfektion des Gens der menschlichen placentaren Steroidsulfatase in COS-1-Zellen wurden durch das exprimierte Protein sowohl Aryl- als auch Alkylsteroidsulfatester hydrolysiert. Dies spricht für die Existenz eines einzigen Enzyms für die Hydrolyse von Estronsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat beim Menschen (PUROHIT et al., 1995).

S-Form und f-Form weisen ein unterschiedliches, jedoch überlappendes Verteilungsmuster auf: Organe mit vorwiegender Expression der s-Form sind Plazenta, Schilddrüse, Herz, Milz, Skelettmuskulatur und Nebenniere. In Niere, Leber und Pankreas wird vorwiegend die f-Form gefunden. In Gonaden, Lunge und Verdauungstrakt sind beide Formen gleichermaßen nachweisbar (MUNROE und CHANG, 1987; SHANKARAN et al., 1991). In der Humanplazenta ist die Steroidsulfatase-mRNA im Synzytiotrophoblasten, nicht jedoch im Zytotrophoblasten nachweisbar. Steroidsulfatase-mRNA und -Immunreaktivität waren auf zellulärer Ebene am Übergang 1./2. Trimester höher als in Geburtsplazenten (SALIDO et al., 1990).

Die Steroidsulfatase ist ein membrangebundenes Enzym, welches vorwiegend im ER und dort auf der luminalen Membranseite lokalisiert ist. Nach Expression der menschlichen Steroidsulfatase in BHK-21-Zellen war sie vorwiegend im ER, daneben in geringerem Umfang auch in Golgi-Apparat, Zytoplasmamembran, multivesikulären Endosomen und Lysosomen nachweisbar (STEIN et al., 1989). Auch in kultivierten menschlichen Fibroblasten war die Steroidsulfatase im rauhen ER und im Golgi-Apparat nachweisbar, ferner in Endozytose-assoziierten Strukturen wie Coated Pits und Endosomen (WILLEMSEN et al., 1988). Diese Autoren sehen in der Assoziation der Steroidsulfatase mit Strukturen der Endozytose einen Zusammenhang mit der Bedeutung der Steroidsulfatase für die Hydrolyse sulfatierter Östrogen-Präkursoren. In der Humanplazenta ist die Steroidsulfatase-Immunreaktivität assoziiert mit dem rauhen ER des Synzytiotrophoblasten (SALIDO et al., 1990), während sie in Kern, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lysosomen, der Zytoplasmamembran und den Mikrovilli nicht nachweisbar war.

Neben der „klassischen“ membrangebundenen Steroidsulfatase wurde in der Humanplazenta eine lösliche Steroidsulfatase im Kern beschrieben (GNIOT-SZULZYCKA und DRYWA, 1994). Auch in der Leber der Ratte wurde ein kerngebundenes Isoenzym gefunden, welches eine höhere Affinität zu Estronsulfat als die mikrosomale Form haben soll (ZHU et al., 1998). Im Gegensatz zum Menschen, bei dem die Arylsulfatase C-Isoenzyme mittlerweile recht genau charakterisiert sind (s.o.), ist bei anderen Spezies die Identität des oder der Enzyme, welches/welche die Sulfate von nichtsteroidalen aromatischen Verbindungen, von Östrogenen bzw. von neutralen Steroiden hydrolysiert/hydrolysieren, noch weitgehend unklar, da diesbe-

züglich meist nur bruchstückhafte Informationen vorliegen. In Abhängigkeit von der Spezies finden sich Hinweise auf ein Enzym mit einem reaktiven Zentrum für alle drei Aktivitäten, bis hin zu eigenen Enzymen für die jeweiligen Aktivitäten. In einer vergleichenden Studie zur ARC-Aktivität der Leber bei 11 verschiedenen Spezies fanden sich nach Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie beim Rind alle drei Aktivitäten in einem Peak. Die Autoren schlossen hieraus auf die Existenz eines einzigen Enzyms. Beim Meerschweinchen konnten dagegen die Aktivitäten für Alkylsulfate (DHEA-S) und Arylsulfate (Estronsulfat, 4-Methylumbelliferylsulfat) physikalisch getrennt werden (RUOFF und DANIEL, 1991).

Aufgrund der beim Rind und anderen Spezies unklaren Identität des Enzyms oder der Enzyme, welches/welche die Hydrolyse von sulfokonjugierten Östrogenen katalysiert/katalysieren, soll in den eigenen Untersuchungen hierfür die Bezeichnung Östrogensulfatase (OS) verwendet werden.

### **2.2.2.2. Biologische Bedeutungen der Steroidsulfatase**

#### **2.2.2.2.1. Biologische Bedeutung der Sulfatase in der Plazenta des Menschen**

Die Humanplazenta ist zur Östrogensynthese aus C<sub>19</sub>-Steroiden, nicht jedoch aus C<sub>21</sub>-Steroiden befähigt. Ursache hierfür ist das Fehlen einer plazentaren 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C17,20-Lyase- (P450c17 $\alpha$ -) Aktivität. Die menschliche Plazenta ist daher hinsichtlich ihrer Östrogensynthese auf C19-Vorstufen angewiesen, welche hauptsächlich von der fetalen Nebennierenrinde in Form von Dehydroepiandrosteron (DHEA)-Sulfat bereitgestellt werden. Dieses wird zum großen Teil in der fetalen Leber am C16-Atom hydroxyliert. Die Abspaltung des Sulfatrestes von den sulfokonjugierten Präkursoren stellt dann den ersten Schritt der Östrogensynthese in der Humanplazenta dar. Die wechselseitige Abhängigkeit von Fetus und Plazenta hinsichtlich der graviditätsassoziierten Östrogenproduktion wird durch den Begriff "fetoplazentare Einheit" charakterisiert (DICZFALUSY et al., 1965; KUSS, 1994).

Defekte des Steroidsulfatasegens sind beim Menschen Ursache der X-chromosomgebundenen Ichthyose (EPSTEIN und LEVENTHAL, 1981; BONIFAS et al., 1987). Aufgrund der Rolle der Steroidsulfatase in der Verwertung sulfokonjugierter Präkursoren führen sie zu einer starken Reduktion der plazentaren Östrogenproduktion. Bei den betroffenen Müttern kann es durch verspätetes Einsetzen der Wehentätigkeit zu einer Verzögerung der Geburt kommen. In 75% der Fälle erfolgt dennoch ein spontanes Einsetzen der Wehen. Bei etwa 25% ist das Wachstum des Fetus verlangsamt, und bei ca. 10% endet die Schwangerschaft mit intrauterinem Fruchttod (TAYLOR, 1982). Bei den betroffenen Kindern führt der Steroidsulfatase-mangel zu Hautveränderungen in Form von Verdickungen und fischschuppenartiger Oberfläche (Ichthyose) (WEBSTER et al., 1978; EPSTEIN und LEVENTHAL, 1981), da die Hydrolyse des Cholesterinsulfats, welches vermutlich zwischen den Zellen des Stratum corneum als Kittsubstanz dient, unterbleibt und hierdurch die Abschilferung der Zellen des äußeren Stra-

tum corneum erschwert ist (ELIAS et al., 1984). In 50% der Fälle findet man weiterhin Hornhauttrübungen (JAY et al. 1968; LYKKESFELDT et al., 1985a), seltener auch Kryptorchismus oder Hodenkrebs (LYKKESFELDT et al., 1983; 1985a, b). Die Lokalisation des Sulfatasegens auf dem X-Chromosom verbunden mit dem rezessiven Erbgang haben zur Folge, daß vorwiegend männliche Nachkommen betroffen sind (BONIFAS et al., 1987).

#### **2.2.2.2.2. “Sulfatase Pathway”**

Eine wichtige biologische Rolle kommt der „Estronsulfatase“ offensichtlich in östrogenabhängigen Mammatumoren bei der lokalen Erzeugung biologisch aktiver Östrogene zu (PASQUALINI et al., 1992). In Mammatumoren postmenopausaler Frauen werden deutlich höhere Estron- bzw. Estradiolkonzentrationen gemessen als im Blutplasma, wo nur sehr geringe Konzentrationen freier Östrogene, jedoch zehnfach höhere Konzentrationen an Estronsulfat gefunden werden. Dieser Gewebe-/Plasmagradient deutet auf eine lokale Östrogenproduktion hin, die aus einer Aromatisierung von Androgenen („Aromatase-Pathway“) oder der Hydrolyse von Estronsulfat („Sulfatase-Pathway“) resultieren kann. Bei in vitro-Untersuchungen an menschlichen Mammatumoren wies der Sulfataseweg eine deutlich höhere Kapazität als der Aromataseweg auf. Bei in vitro-Untersuchungen an Ratten-Mammatumoren wurden deutliche Sulfataseaktivitäten, jedoch keine Aromataseaktivität festgestellt. Daher wird der Sulfatase-Weg als der Hauptweg bei der Erzeugung freier Östrogene in Mammatumoren angesehen (SANTNER et al., 1984). Über die Bedeutung des “Sulfatase Pathway” in nichtneoplastischen Zellen liegen zur Zeit kaum Informationen vor.

#### **2.2.2.3. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur Östrogensulfatase im Endometrium während der Gravidität und in der Plazenta beim Rind und anderen Spezies**

Im Gegensatz zur plazentaren Steroidsulfatase des Menschen (s.o.) liegen zum homologen Enzym des Rindes kaum Informationen vor. Bisherige Untersuchungen wurden nur punktuell für den 7.-8. Graviditätsmonat (MATTIOLI et al., 1984), den 262. Graviditätstag (JANSZEN et al., 1995) sowie für den unmittelbaren präpartalen Zeitraum und die Geburt (MÖSTL et al., 1986; KIESENHOFER, 1987; JANSZEN et al., 1995) durchgeführt, wobei in keinem Fall die erfaßte Enzymaktivität näher charakterisiert wurde. Übereinstimmend fanden sich in den Untersuchungen von MATTIOLI et al., (1984) sowie MÖSTL et al. (1986) und KIESENHOFER (1987) deutlich höhere OS-Aktivitäten im maternalen Teil der Plazentome im Vergleich zu den Kotyledonen. JANSZEN et al. (1995) verglichen die OS-Aktivität im interkarunkulären Endometrium, interkotyledonären Allantochorion, Allantoamnion und im gesamten Plazentom am 262. Graviditätstag und unter der Geburt. Die bei weitem höchsten OS-Aktivitäten fanden sich im Plazentom, wobei vom 262. Graviditätstag bis zur Geburt eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet wurde. In den übrigen getesteten Geweben wurden dagegen unab-

hängig vom Untersuchungszeitpunkt niedrige bzw. nicht meßbare OS-Aktivitäten gefunden. Über die Bedeutung der plazentaren OS liegen beim Rind zur Zeit keine gesicherten Informationen vor. Über Defekte des plazentaren OS-Gens wurde bisher nicht berichtet. Beim Rind sind mehrere Formen der Ichthyose beschrieben, die insgesamt sehr selten auftreten und deren Ätiologie und Pathogenese unbekannt sind. Unter den Ichthyosen des Rindes findet sich auch eine milde Form mit geschlechtsgebundenem Erbgang, welche sich bei Bullenkälbern manifestiert (BAKER und WARD, 1985; WEISS und TEIFKE, 1999). Ob diese Erkrankung auf einem Sulfatasemangel beruht, ist nicht bekannt.

Im Endometrium gravider Schweine wurden vom 12.-60. Graviditätstag kontinuierlich ansteigende OS-Aktivitäten gemessen, gefolgt von einem Plateau bis zum 104. Graviditätstag. Bei graviden Schafen ergab sich ein entgegengesetzter Verlauf der endometrialen OS-Aktivitäten, da diese nach hohen Werten am 16. Graviditätstag im weiteren Verlauf der Gravidität deutlich abfielen (DWYER und ROBERTSON, 1980). GLUTEK und HOBKIRK (1990) bestimmten die OS-Aktivitäten in Plazenta, Endometrium, Dezidua basalis, Amnion und Chorion bei graviden Meerschweinchen. In diesen Geweben ergaben sich im Verlauf der Gravidität unterschiedliche Profile. Während sich die OS-Aktivität in der Dezidua basalis nicht wesentlich veränderte, fanden sich in Plazenta, Endometrium und Chorion Anstiege der OS-Aktivitäten, welche sich v.a. zwischen dem mittleren und letzten Graviditätsdrittel ergaben. Im Amnion dagegen fielen die OS-Aktivitäten nach dem 32.-35. Graviditätstag deutlich ab. Trotz ihres punktuellen Charakters lassen diese Untersuchungen insgesamt erkennen, daß hinsichtlich der plazentaren bzw. endometrialen OS-Aktivität mit erheblichen speziesspezifischen Besonderheiten gerechnet werden muß.

## **2.3. Material und Methoden**

### **2.3.1. Tiermaterial und Probenentnahme**

Als Probenmaterial wurden Plazentome bei der Schlachtung von 150 (n=4), 220 (n=4), 240 (n=3) und 270 (n=3) Tage graviden Kühen mit bekanntem Besamungszeitpunkt gewonnen. Vor der Schlachtung war von allen Tieren aus der Arteria oder Vena coccygea Blut entnommen worden. Unmittelbar nach Betäubung der Tiere mittels Bolzenschußapparat wurde der Uterus samt Inhalt entfernt, eröffnet und der Fetus bzw. das Kalb herausgenommen, bei denen die Blutprobenentnahme aus den Nabelgefäßen bzw. aus der V. jugularis erfolgte. Danach wurden an willkürlich gewählten Lokalisationen sowohl aus dem fruchttragenden als auch aus dem nicht fruchttragenden Uterushorn insgesamt zwischen 15-35 Plazentome entfernt. Darüber hinaus wurden von je drei am 150. und 240. sowie von je zwei am 220. und 270. Trächtigkeitstag geschlachteten Tieren Myometriumpuben gewonnen. Bei drei am 150. Tag sowie

bei zwei am 240. Graviditätstag geschlachteten Tieren wurden auch die Ovarien entnommen<sup>1</sup>. Die Blutproben wurden sofort nach ihrer Entnahme im Eisbad (0°C) gekühlt. Plazentome, Ovarien und Myometriumproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in eisgekühlten, sterilen PBS-Puffer pH 7.45 verbracht. Alle Proben wurden innerhalb von ca. 30 Minuten zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert, wo unverzüglich mit der Aufbereitung der Gewebeproben begonnen wurde. Alle Blutproben wurden nach Verbringung ins Labor zentrifugiert und das gewonnene Plasma bis zur Analyse bei ca. -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

Weiterhin wurden im Rahmen von vier Schnittentbindungen jeweils zwei bis drei Plazentome von Kühen gewonnen, bei denen nach Ablauf einer physiologischen Graviditätsdauer die Geburt spontan eingetreten war. In allen Fällen lautete die Indikation für die Schnittentbindung absolut bzw. relativ zu große Frucht. Alle Schnittentbindungen erbrachten jeweils ein vitales Kalb. Zusätzlich wurden für ergänzende Untersuchungen Corpora lutea von vier laut Ovarbefund im Diöstrus geschlachteten Kühen gewonnen und entsprechend wie oben angegeben ins Labor gebracht.

### 2.3.2. Präparation des Gewebes

Die Plazentome wurden zuerst durch mehrmaliges Waschen in PBS-Puffer von anhaftendem Blut befreit. Anschließend wurden sie unter einer Sterilwerkbank (LaminAir<sup>R</sup>, Heraeus) halbiert und das Kotyledonengewebe durch Zug mit einer Pinzette vom Karunkelgewebe getrennt. Im maternalen Teil verbliebene fetalen Kotyledonenreste wurden, soweit erkennbar, einzeln mit der Pinzette entfernt. Das Trophoblastgewebe wurde mit einem Skalpell vom darunterliegenden Bindegewebe abgeschabt. Die oberste Karunkelschicht wurde mit einer Schere durch tangential zur Oberfläche geführte Schnitte abgetragen. Die so erhaltenen fetalen und maternalen "Gewebebreie" wurden mit einem doppelten Volumen an Ringerlösung DAB7 suspendiert und in einer auf 0°C vorgekühlten Zentrifuge (Minifuge RF, Heraeus) bei 450 g 3 Minuten zentrifugiert. Die sich dabei auf dem Gewebebrei ablagernde Erythrozytenschicht wurde dann mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette zusammen mit dem Überstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis keine Erythrozytenablagerung mehr sichtbar war und der Überstand klar blieb.

Bei den Uterusproben wurde zunächst das Myometrium von restlichen Uterusbestandteilen abgetrennt und mit PBS-Puffer gewaschen. In einem Teil der Experimente wurde die so präparierte Uterusmuskulatur anschließend als Ganzes mit einer Schere vorzerkleinert und weiter aufbereitet (s.u.). In den restlichen Fällen wurden die innere Kreismuskulatur und die äußere Längsmuskulatur getrennt der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Durch die separate Untersuchung der beiden Muskellagen sollte deren unterschiedliche ontogenetische Abstam-

---

<sup>1</sup> Untersuchungen an diesen Organen waren ursprünglich nicht vorgesehen. Sie wurden eingefügt, nachdem erste experimentelle Ergebnisse vorlagen.

mung, histologische, biochemische und pharmakologische Charakteristika sowie Unterschiede in der Reaktion auf östrogene Stimuli (DOUALLA-BELL et al., 1995) berücksichtigt werden. Die Corpora lutea graviditatis (n=8) bzw. cyclicae (n=4) wurden durch großzügiges Entfernen der Bindegewebskapsel freipräpariert und der verbleibende Kern grob mit der Schere zerkleinert.

Alle Arbeitsschritte wurden unter Kühlung des Probenmaterials in einer im Eiswasserbad platzierten Glasschale (Plazentome, Myometrium) bzw. Glaszentrifugenröhrchen (Corpora lutea) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Geräte waren steril und ebenfalls eisgekühlt.

### **2.3.3. Herstellung der Homogenate**

Für jedes Tier wurden jeweils 10 g des präparierten Kotyledonen-, Karunkel-, und Myometriengewebes mit je 30 ml sterilem, eisgekühltem Ringer/HEPES-Puffer versetzt und mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel) dreimal 15 Sekunden mit zweiminütiger Pause im Eisbad homogenisiert. Bei den Corpora lutea wurden jeweils 2 g Gewebe mit je 6 ml sterilem, eisgekühltem Ringer/HEPES-Puffer versetzt und wie oben beschrieben homogenisiert.

### **2.3.4. Herstellung der subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe**

Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von OST und OS in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe wurden an 150, 220, 240 (jeweils drei Tiere pro Gruppe) und 270 Tage (n= 2) trächtigen Rindern durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei ca. 4°C. Für jedes dieser Versuchstiere wurden je 10 g des aus Kotyledonen und Karunkeln stammenden Gewebebreis (s. Abschnitt 2.3.3.) mit jeweils 30 ml 250 mM Sucrosepuffer pH 7.15 versetzt und mit einem Potter (B. Braun) zweimal bis zum Boden aufgeschlossen. Die so gewonnene Gewebesuspension wurde durch zwei Lagen Gaze gesiebt und in einer Zentrifuge (Minifuge RT, Haereus) bei 600 g 10 Minuten zentrifugiert. Das verbleibende Sediment 1 (S1= Kernfraktion) wurde mit sterilem, eisgekühltem 250 mM Sucrosepuffer pH 7.15 rückgelöst und zur weiteren Verarbeitung im Eisbad aufbewahrt. Der Überstand 1 wurde in einer Zentrifuge (Biofuge 28 RS, Heraeus) 10 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Das Sediment 2 (S2= Mitochondrienfraktion) wurde ebenfalls mit 250 mM Sucrosepuffer pH 7.15 rückgelöst und im Eisbad aufbewahrt. Der verbleibende Überstand 2 wurde in einer Ultrazentrifuge (TGA-65 Ultrazentrifuge, Kontron) 60 Minuten lang bei 100000 g zentrifugiert. Das Sediment 3 (S3= Mikrosomenfraktion) wurde ebenfalls mit 250 mM Sucrosepuffer pH 7.15 rückgelöst und wie die anderen Sedimentsuspensionen und der letzte Überstand 3 (= Zytosol) bis zur weiteren Verwendung im Eisbad aufbewahrt. In allen subzellulären Fraktionen erfolgte eine Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976). Die Proteingehalte der resuspendierten Sedimente bzw. der Zytosole sind in Tabelle 1 dargestellt. In Abhängigkeit vom Versuchsansatz wurden von diesen

Ausgangslösungen Verdünnungen angesetzt, welche als Probenmaterial in die Inkubationsansätze eingebracht wurden (s. Abschnitt 2.3.5.4.).

Tabelle 1: Proteingehalte (mg/ml) der mittels Differentialzentrifugation gewonnenen subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe ( $\bar{x} \pm SD$ ).

Fraktion	Kotyledone	Karunkel
Sediment 1 (Kerne)	7.13 $\pm$ 3.49	9.71 $\pm$ 3.28
Sediment 2 (Mitochondrien)	5.08 $\pm$ 1.99	7.25 $\pm$ 2.54
Sediment 3 (Mikrosomen)	2.54 $\pm$ 1.04	5.60 $\pm$ 1.96
Zytosol	1.71 $\pm$ 0.52	3.22 $\pm$ 0.74

### 2.3.5. In vitro-Inkubationssystem zur Untersuchung der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase (OST) und –sulfatase (OS)

#### 2.3.5.1. Herstellung der <sup>3</sup>H-markierten Substratlösungen

Die verschiedenen Substratlösungen wurden unter Verwendung methanolischer Stammlösungen der jeweiligen <sup>3</sup>H-markierten Substrate durch Verdünnung mit Ringer-Lösung mit einem 0.1%-igen Zusatz von BSA hergestellt. Die <sup>3</sup>H-Estron- bzw. <sup>3</sup>H-Estronsulfatkonzentration der Substratlösungen wurde für die Inkubation von Homogenaten und Zellfraktionen jeweils auf 0.6 pmol/100  $\mu$ l eingestellt. In den Experimenten zur Bestimmung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase (s. Abschnitt 2.3.5.5.) wurde für die dort verwendeten <sup>3</sup>H-markierten Substratlösungen eine Substratmenge von 0.3 pmol/100  $\mu$ l gewählt.

#### 2.3.5.2. Herstellung der Kontrollproben

Zur Kontrolle auf einen eventuellen nichtenzymatischen Zerfall der Substrate unter den Bedingungen der Inkubationen und der anschließenden Inaktivierung sowie zur Abschätzung des Hintergrunds wurden parallel zu allen Inkubationsansätzen Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) 30 Minuten inkubiert und anschließend analog den Proben hitzeinaktiviert. Bei den Mediumleerwerten wurde den Inkubationsansätzen statt der Gewebeaufbereitung die entsprechende Menge an Inkubationsmedium (Ringer/HEPES-Puffer + 0.1% BSA) einpipettiert. Bei den Gewebeleerwerten wurde die Gewebeaufbereitung vor dem Einpipettieren durch 20-minütiges Kochen im Wasserbad inaktiviert.

### **2.3.5.3. Inkubationsansätze unter Verwendung von Gewebehomogenaten als Probenmaterial**

Es wurden jeweils 1 ml Ringer/HEPES-Lösung mit 0.1% BSA als Inkubationsmedium, 200 µl Gewebehomogenat und 100 µl der jeweiligen Substratlösung ( $^3\text{H}$ -Estron bzw.  $^3\text{H}$ -Estronsulfat) in dieser Reihenfolge in sterile 15 ml Extraktionsröhrchen einpipettiert. Bei den Inkubationsansätzen zur Bestimmung der Östrogensulfotransferaseaktivität wurde dem Inkubationsmedium 5 µmol/ml 4-Nitrophenylsulfat-Kaliumsalz (4-NPS – Fluka Chemie AG) als kompetitiver Hemmer der Steroidsulfatase zugegeben (IWAMORI et al., 1976; KAWANO et al., 1989). Die Reaktion wurde mit Einpipettieren des Substrats gestartet. Nach Ablauf der 0-, 5-, 15- bzw. 30-minütigen Inkubation bei 37°C im Wärmeschüttelbad wurde die Reaktion durch Erhitzen der Proben über eine Dauer von 2.5 Minuten im kochenden Wasserbad abgestoppt. Die Proben wurden bis zu ihrer Analyse im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.5.4. Inkubationsansätze unter Verwendung von subzellulären Fraktionen als Probenmaterial**

Es wurden pro Inkubationsansatz 200 µl 250 mM Sucrosepuffer pH 7.15 als Medium, 1 ml der aufbereiteten subzellulären Fraktionen (vergleiche Abschnitt 2.3.4.) und 100 µl der jeweiligen Substratlösung ( $^3\text{H}$ -Estron oder  $^3\text{H}$ -Estronsulfat) in dieser Reihenfolge in 15 ml Extraktionsröhrchen einpipettiert. Zur Bestimmung der Östrogensulfotransferaseaktivität wurden den Inkubationsansätzen wieder jeweils 5 µmol 4-NPS zur kompetitiven Hemmung der Steroidsulfatase zugegeben. Die Reaktion wurde mit dem Einpipettieren des Substrats gestartet. Nach Ablauf der 0-, 5-, 15- bzw. 30-minütigen Inkubation bei 37°C im Wärmeschüttelbad wurde die Reaktion durch Erhitzen der Proben über eine Dauer von 2.5 Minuten im kochenden Wasserbad abgestoppt. Die Proben wurden bis zu ihrer Analyse im Tiefgefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.5.5. Inkubationsansätze zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase (OST)**

In den Experimenten zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase wurde als Probenmaterial gepooltes Zytosol aus Karunkel- und Kotyledonengewebe einer 240 Tage graviden Kuh verwendet, da aus den in Abschnitt 2.4.3. beschriebenen Untersuchungen Zytosol als die Zellfraktion mit der höchsten Östrogensulfotransferaseaktivität hervorging. Pro Inkubationsansatz wurden jeweils 1 ml Zytosol, 0.2 ml 250 mM Sucrose-Puffer pH 7.15 als Inkubationsmedium und die jeweiligen  $^3\text{H}$ -markierten Substrate in 100 µl Ringer/HEPES-Lösung + 0.1% BSA für 0, 5, 15 bzw. 30 Minuten im Wärmeschüttelbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Inkubationsansätze durch 150-sekündiges Kochen im Wasserbad abgestoppt. Allen Inkubationsansätzen wurden zur Hemmung der Steroidsulfataseaktivität 5 µmol 4-NPS zugefügt. Die getesteten Substrate Dehydroepiandrosteron, Estron,

Estradiol-17 $\beta$ , Estradiol-17 $\alpha$ , Testosteron und Pregnenolon wurden in äquimolaren Mengen von 0.3 pmol in die Versuchsansätze eingebracht. Die inkubierten Proben wurden bis zu ihrer Analyse bei -20° C im Gefrierschrank gelagert.

### 2.3.5.6. Aufbereitung der Inkubationsansätze und Messung der Substratumwandlungen

Alle Inkubationsansätze wurden in gleicher Weise analysiert. Zunächst wurden die tiefgefrorenen Inkubationsansätze mit je 3.5 ml Toluol überschichtet und im Rotationsmischer bei Raumtemperatur 15 Minuten über Kopf rotierend aufgetaut. Nach 3-minütigem Abzentrifugieren bei 2500 g wurde die wässrige Phase im Ethylalkohol-Trockeneisbad bei ca. -60°C gefroren und der Toluolüberstand in 15 ml-Extraktionsröhrchen dekantiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde dreimal wiederholt. Der gesammelte Toluolextrakt I (= Fraktion der freien Steroide) wurde bei 40°C im Vortex-Evaporator (Haake-Buchler) niedertrocknet. Zur verbliebenen wässrigen Phase jedes Inkubationsansatzes wurden 320  $\mu$ l Hydrolysepuffer (625 mM Natriumazetat pH 4.8) sowie 60  $\mu$ l  $\beta$ -Glucuronidase-Arylsulfatase-Lösung (Beta-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* – Serva Feinbiochemica GmbH&Co; 1:4 verdünnt in 0.9%iger NaCl-Lösung<sup>2</sup>) gegeben. Die Inkubationsansätze wurden dann für 10 Sekunden durchmischt (REAX 2000, Heidolph) und anschließend im Wärmebad bei 37°C über Nacht inkubiert. Die so hydrolysierten Inkubationsansätze wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren erneut extrahiert und der gesammelte Toluolextrakt II (= Fraktion der konjugierten Steroide) bei 40°C im Vortex-Evaporator (Haake-Buchler) niedertrocknet. Zur Messung der <sup>3</sup>H-Impulse in den niedertrockneten Extrakten I und II wurden den entsprechenden Glasextraktionsröhrchen jeweils 0.8 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und diese 10 Minuten im Rotationsmischer über Kopf rotiert. Nach 2-minütigem Zentrifugieren bei 2000 g wurde der in Szintillator rückgelöste Extrakt in Szintillatorvials überführt. Die Glasextraktionsröhrchen wurden dann noch zweimal mit je 1 ml Szintillationsflüssigkeit nachgespült. Schließlich wurde die <sup>3</sup>H-Aktivität im Szintillationszähler gemessen.

Bei den Inkubationen unter Verwendung von **Gewebehomogenaten** als Probenmaterial wurde zur Berechnung der prozentualen Umwandlung von Estronsulfat in Estron der Quotient aus den gezählten <sup>3</sup>H-Impulsen in Extrakt I und der Summe der Zählimpulse der Extrakte I und II gebildet und mit dem Faktor 100 multipliziert. Entsprechend wurde die prozentuale Umwandlung von Estron in Estronsulfat als Quotient aus den Zählimpulsen in Extrakt II und der Summe der Zählimpulse beider Extrakte, multipliziert mit dem Faktor 100, errechnet.

Bei den Inkubationen unter Verwendung von **subzellulären Fraktionen** wurden aus den wie oben beschrieben bestimmten prozentualen Umwandlungsraten, der eingesetzten Substratmenge und dem Proteingehalt der eingebrachten subzellulären Proben die Umwandlungsraten

---

<sup>2</sup> entspricht 0.3 Standardeinheiten Arylsulfatase pro Ansatz

in pmol/g Protein errechnet. Von allen ursprünglich im Vierfachansatz hergestellten Proben wurden zunächst zwei Ansätze analysiert und ausgewertet. Bei deutlicher Abweichung der Doppelansätze (> 5%) wurde die Präzision durch die Auswertung eines dritten bzw. vierten Inkubationsansatzes, sofern nicht infolge technischer Probleme verlorengegangen, erhöht.

### **2.3.5.7. Auswertung der Ergebnisse und statistische Berechnungen**

Die Auswertung der Daten erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993). Da alle erfassten Variablen asymmetrische Verteilungen aufwiesen, wurden die Rohdaten vor der Durchführung von parametrischen multifaktoriellen Varianzanalysen entsprechend transformiert, um annähernde Normalverteilungen zu erhalten. Weiterhin wurde für den Verlauf der Umwandlungen über die maximale Inkubationsdauer von 30 Minuten die Fläche unter der Kurve (AUC= area under the curve) berechnet und in der statistischen Auswertung wie die zugehörigen Rohdaten behandelt.

Die prozentualen Umwandlungsraten aus den Homogenatinkubationen waren natürlicherweise limitiert durch die Grenzen 0% und 100%. Diese Daten wurden daher arcsin-transformiert (Sachs, 1982). Die Daten aus den Inkubationen von subzellulären Fraktionen, bei denen die Substratumwandlung auf den Proteingehalt des Probenmaterials bezogen war, zeigten eine rechtsschiefe Verteilung und wurden daher einer logarithmischen Transformation unterzogen. Bei den Untersuchungen unter Verwendung von Karunkel- bzw. Kotyledonen-Homogenaten als Probenmaterial wurde für die OST bzw. die OS der Einfluß der Versuchsgruppe (Tag 150, 220, 240, 270 der Gravidität; Geburt) und der Gewebeherkunft (fetal bzw. maternal) mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Für die Experimente unter Verwendung von subzellulären Fraktionen als Probenmaterial wurde zunächst für die OST bzw. die OS der Einfluß der Faktoren Versuchsgruppe, Gewebeherkunft und subzelluläre Fraktion (Aufbereitung) mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse geprüft. Nach der Bestätigung eines signifikanten Einflusses des Faktors Aufbereitung wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalysen der Einfluß der Gewebeherkunft (Kotyledone bzw. Karunkel) sowie der Versuchsgruppe für die einzelnen subzellulären Fraktionen geprüft, wobei im Falle der OST für die Kern-, Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion aufgrund der dort gemessenen marginalen Umwandlungsraten auf eine besondere statistische Bearbeitung verzichtet wurde.

Aus den transformierten Daten wurden zur graphischen Darstellung der Ergebnisse Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und diese rücktransformiert. Entsprechend werden in den Abbildungen des Ergebnisteils bei den logarithmisch transformierten Variablen der geometrische Mittelwert und der Streufaktor ( $X_g * SF^{\pm 1}$ ), bei den arcsin-transformierten Variablen der Median und der einfache Streubereich nach Rücktransformation ( $M \pm S$ ) dargestellt.

### **2.3.6. Radioimmunologische Bestimmungen fetaler und maternaler Steroidhormonkonzentrationen im peripheren Blutplasma**

In den Blutproben der Muttertiere sowie der zugehörigen Feten bzw. Kälber wurden mittels etablierter radioimmunologischer Verfahren die Konzentrationen an Cortisol (RICHERT-HANAUER, 1990), Estron (HOFFMANN et al., 1994) und Estronsulfat (HOFFMANN et al., 1996) bestimmt.

### **2.3.7. Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer**

#### **2.3.7.1. Chemikalien**

##### **A. Albrecht GmbH + Co. KG, D-88323 Aulendorf/Württ.**

Ringer-Lösung DAB7

##### **Fluka Chemie AG, CH-9471 Buchs**

4-Nitrophenylsulfat, Kaliumsalz

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O p.a.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> p.a.

##### **Makor Chemicals LTD, Jerusalem, Israel**

Estronsulfat, Kaliumsalz

##### **Merck KgaG, D-64271 Darmstadt**

NaCl p.a.

Methanol für die Chromatographie

Toluol pro Analyse

Wasser für die Chromatographie

##### **Pierce, Rockford, Illinois, 61105 USA**

Albumin Standard No 23209

Coomassie Protein Assay Reagent

##### **Serva Feinbiochemica GmbH&Co., D-69155 Heidelberg**

Beta-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*

Sucrose – Research Grade

##### **SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO 63178 USA**

Bovines Serumalbumin (BSA)

HEPES-Puffer(1M)

Tris/HCl pH 7.4

##### **Zinsser Analytik GmbH, D-60489 Frankfurt**

Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300

#### **2.3.7.2. <sup>3</sup>H-markierte Steroide**

##### **Amersham Buchler GmbH&Co. KG, D-38110 Braunschweig**

(1,2,6,7-<sup>3</sup>H)-Testosteron

**DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH, D-63383 Dreieich**

(6,7-<sup>3</sup>H)-Estron  
(6,7-<sup>3</sup>H)-Estronsulfat, Ammoniumsalz  
(2,4,6,7-<sup>3</sup>H)-Estradiol  
(1,2,6,7-<sup>3</sup>H)-Dehydroepiandrosteron  
(7-<sup>3</sup>H)-Dehydroepiandrosteron Sulfat, Natriumsalz  
(1,2,6,7-<sup>3</sup>H)-Progesteron  
(1,2,6,7-<sup>3</sup>H)-Cortisol  
(7-<sup>3</sup>H(N))-Pregnenolon

(6,7-<sup>3</sup>H)-Estradiol-17 $\alpha$ : Eigene Synthese nach dem von WILLIAMS et al. (1968) beschriebenen Verfahren durch Inkubation von (6,7-<sup>3</sup>H)-Estron mit Rindererythrozyten, wobei die Umwandlung von <sup>3</sup>H-Estron in <sup>3</sup>H-Estradiol-17 $\alpha$  durch die 17 $\alpha$ -Reduktase der Rindererythrozyten katalysiert wird. Die Reinigung des gebildeten <sup>3</sup>H-Estradiol-17 $\alpha$  erfolgte nach Extraktion mittels Toluol und chromatographischer Vorreinigung (s. Kapitel III, Abschnitt 3.2.2.1) nach dem in Kapitel III, Abschnitt 3.2.2.2. beschriebenen HPLC-Verfahren.

**2.3.7.3. Materialien und Geräte****Beckman Instruments, Fullerton, California, U.S.**

Flüssigszintillationszähler LS 5000 TD

**B. Braun Melsungen AG, D-34212 Melsungen**

Potter 60 ml mit zylindrischem Teflonpistill

**Haake Buchler, Saddle Brook, N.J., U.S.**

HBI Vortex-Evaporator

**Heraeus, D-63450 Hanau**

Biofuge 28 RS  
Medifuge  
Minifuge RF  
Sterilwerkbank LaminAir HA 2448 GS  
Vakuumtrockenschrank  
Varifuge 30 R

**Heidolph Elektro GmbH&Co. KG, D-93309 Kelheim**

Rotationsmischer Typ REAX-2  
REAX 2000 Vortexer

**Janke + Kunkel GmbH&Co. KG, D-79219 Staufen**

Ultra-Turrax

**Köttermann GmbH&Co. KG, D-31311 Uetze/Hänigsen**

Wärmeschüttelbad Typ 3047

**Kontron Elektronik GmbH, D-85386 Eching/München**

TGA-65 Ultracentrifuge

**KNF Neuberger GmbH, D-79112 Freiburg-Munzingen**

Vakuumpumpe N726.3 FT18

**Zinsser Analytik GmbH, D-60489 Frankfurt**

Wheaton Minis Vitro 180

Wheaton-Schraubgläser 15ml

Zinsser minis 2000

**2.3.7.4. Puffer****PBS-Puffer pH 7.45**

NaCl	16.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2.88 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.40 g
Aqua dest.	ad 2000 ml

**Ringer/HEPES-Puffer**

Ringer-Lösung DAB7	390 ml
1M HEPES-Puffer	10 ml

**250 mM Sucrosepuffer pH 7.15**

Sucrose	128.36 g
Tris/HCl pH 7.4	4.73 g
Aqua dest.	ad 1500 ml
pH-Wert mittels 1n NaOH auf 7.15 einstellen	

**Hydrolysepuffer pH 4.8**

1N CH <sub>3</sub> COOH	500 ml
1N NaOH	300 ml

**Phosphatpuffer pH 7.2**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.357 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.686 g
NaN <sub>3</sub>	0.325 g
Aqua dest. ad 1l	

**BSA-Phosphatpuffer**

1 l Phosphatpuffer + 1 g BSA

## 2.4. Ergebnisse

### 2.4.1. Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma der Versuchstiere

Die Konzentrationen von Cortisol, Estron und Estronsulfat im peripheren Blutplasma der Versuchstiere sowie der dazugehörigen Feten bzw. Kälber sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Konzentrationen von Cortisol, Estron und Estronsulfat im Blutplasma der Versuchskühe ( $\bar{x}$ = Mittelwert; SD= Standardabweichung).

Versuchsgruppe	Kuh Nr.	Cortisol (nmol/l)	Estron (nmol/l)	Estronsulfat (nmol/l)
150 Tage	9	127.9	0.82	5.66
	10	203.0	0.43	2.15
	11	145.8	0.97	7.50
	18	143.5	0.70	2.00
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	155.1 $\pm$ 28.5	0.73 $\pm$ 0.19	4.33 $\pm$ 2.35
220 Tage	1	32.9	0.84	12.40
	2	149.2	0.59	9.20
	3	115.3	0.57	4.60
	12	119.2	0.40	4.50
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	104.2 $\pm$ 43.2	0.60 $\pm$ 0.16	7.68 $\pm$ 3.33
240 Tage	4	87.0	1.12	38.50
	7	112.3	0.80	24.86
	8	102.8	1.96	21.52
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	100.7 $\pm$ 10.4	1.29 $\pm$ 0.49	28.29 $\pm$ 7.35
270 Tage	5	103.8	3.07	49.50
	6	23.6	4.46	45.30
	13	98.0	12.10	47.50
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	75.1 $\pm$ 36.5	6.54 $\pm$ 3.97	47.43 $\pm$ 1.72
Geburt	14	42.3	13.40	56.30
	15	98.8	6.90	25.60
	16	122.7	8.80	63.10
	17	46.8	9.20	34.10
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	77.7 $\pm$ 34.2	9.58 $\pm$ 2.37	44.78 $\pm$ 15.41

Tabelle 3: Konzentrationen von Cortisol, Estron und Estronsulfat im Blutplasma der Feten bzw. Kälber ( $\bar{x}$ = Mittelwert; SD= Standardabweichung).

Versuchsgruppe	Kalb/Fetus Nr.	Cortisol (nmol/l)	Estron (nmol/l)	Estronsulfat (nmol/l)
150 Tage	9	8.79	< 0.3	58.52
	10	16.60	-*	-*
	11	15.70	< 0.3	141.10
	18	2.90	< 0.3	3.60
	$\bar{x}\pm SD$	11.00 $\pm$ 5.57	-	67.74 $\pm$ 56.51
220 Tage	1	14.60	< 0.3	50.00
	2	18.40	< 0.3	24.54
	3	7.93	< 0.3	15.64
	12	2.10	< 0.3	14.10
	$\bar{x}\pm SD$	10.76 $\pm$ 6.25	-	26.07 $\pm$ 14.38
240 Tage	4	25.90	< 0.3	64.30
	7	13.70	< 0.3	27.96
	8	19.70	< 0.3	56.36
	$\bar{x}\pm SD$	19.77 $\pm$ 4.98	-	49.47 $\pm$ 15.63
270 Tage	5	40.10	0.35	150.00
	6	82.60	< 0.3	206.80
	13	28.70	189.00	126.40
	$\bar{x}\pm SD$	50.47 $\pm$ 23.19	-	161.07 $\pm$ 33.74
Geburt	14	-*	-*	-*
	15	160.50	132.80	61.07
	16	96.30	138.50	99.00
	17	102.60	140.00	88.30
	$\bar{x}\pm SD$	119.80 $\pm$ 28.89	137.10 $\pm$ 3.10	83.00 $\pm$ 15.68

\*Bei Kalb 10 reichte das gewonnene Plasma nicht für die Bestimmung von Estron und Estronsulfat aus. Bei Kalb 14 stand keine Blutprobe zur Verfügung.

#### 2.4.2. Sulfokonjugation von Estron in Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe

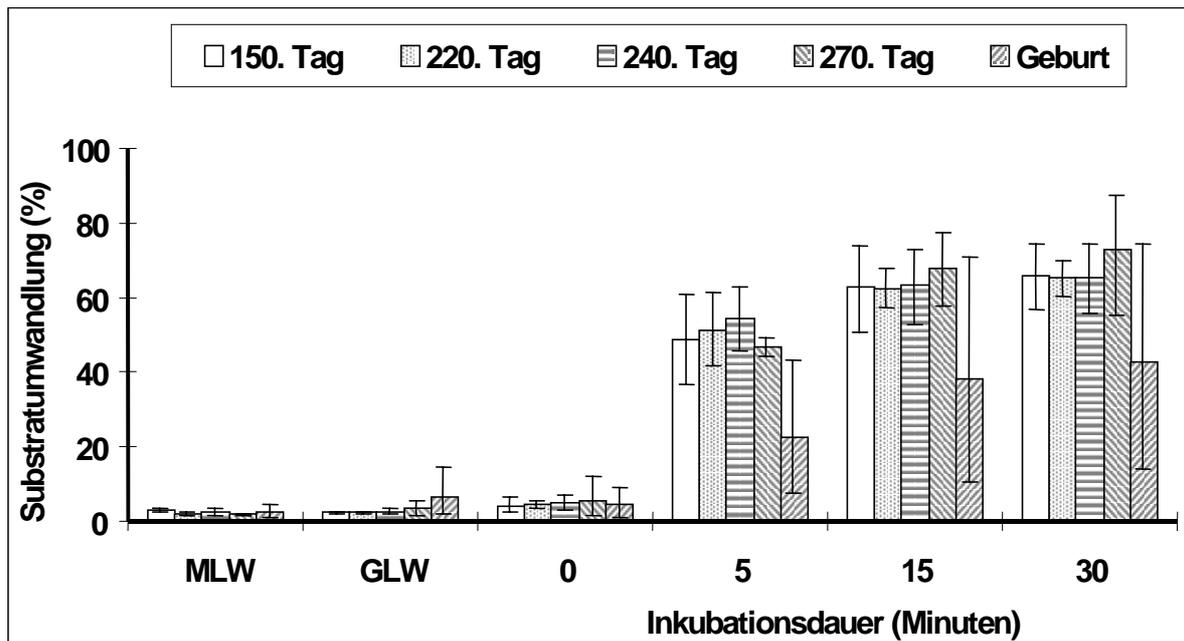
Zu allen Untersuchungszeitpunkten war in Kotyledonen- bzw. Karunkelhomogenaten eine deutliche Sulfokonjugation des angebotenen Substrates  $^3\text{H}$ -Estron zu verzeichnen (s. Abbildung 1). Unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt und der Herkunft des Gewebes - Kotyledone bzw. Karunkel - fand der Großteil der Substratumwandlung innerhalb der ersten 15 Minuten der 30-minütigen Inkubationszeit statt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab, daß die Variable „Versuchsgruppe“ keinen signifikanten Einfluß auf die Substratumwandlung hatte ( $p > 0.05$ ; s. Tabelle 4). Sowohl für die Substratumwandlung zu einzelnen Inkubationszeitpunkten ( $p [5 \text{ min}] < 0.01$ ;  $p [15 \text{ min}] < 0.001$ ;  $p [30 \text{ min}] < 0.001$ ) als auch für die entsprechenden AUC-Werte ( $p < 0.001$ ) fanden sich signifikante bzw. hochsignifikante Unter-

schiede zwischen Kotyledonen- und Karunkelhomogenaten (s. Abbildung 2). Da hinsichtlich der Substratumwandlung zu den verschiedenen Inkubationszeiten sowie für die AUC-Werte keine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Untersuchungszeitpunkt und der Gewebherkunft festgestellt wurde ( $p > 0.05$ ), ist der Unterschied zwischen Karunkel- und Kotyledonengewebe unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt.

Tabelle 4: Statistische Auswertung der Homogenatinkubationen zur Darstellung der Östrogensulfotransferase-Aktivität in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Faktor: Herkunft) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Graviditätstage 150, 220, 240 und 270 sowie unter der Geburt; Faktor: Gruppe). Weiterhin wurde auf eine Wechselwirkung Herkunft x Gruppe (HG) untersucht. Die statistische Prüfung für die Substratumwandlung (% SU) nach 5-, 15- und 30-minütiger Inkubationsdauer sowie der entsprechenden AUC-Werte wurde sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Daten aus der Geburtsgruppe durchgeführt.

	<b>Parameter</b>	<b>p (Gruppe)</b>	<b>p (Herkunft)</b>	<b>p (HG)</b>
<b>mit Geburtstieren</b> (n = 18)	% SU <sub>5 min</sub>	0.383	0.008	0.066
	% SU <sub>15 min</sub>	0.611	0.000	0.056
	% SU <sub>30 min</sub>	0.611	0.000	0.162
	AUC	0.556	0.000	0.083
<b>ohne Geburtstiere</b> (n = 14)	% SU <sub>5 min</sub>	0.899	0.004	0.518
	% SU <sub>15 min</sub>	0.777	0.000	0.421
	% SU <sub>30 min</sub>	0.755	0.000	0.610
	AUC	0.831	0.000	0.539

## A. Kotyledone



## B. Karunkel

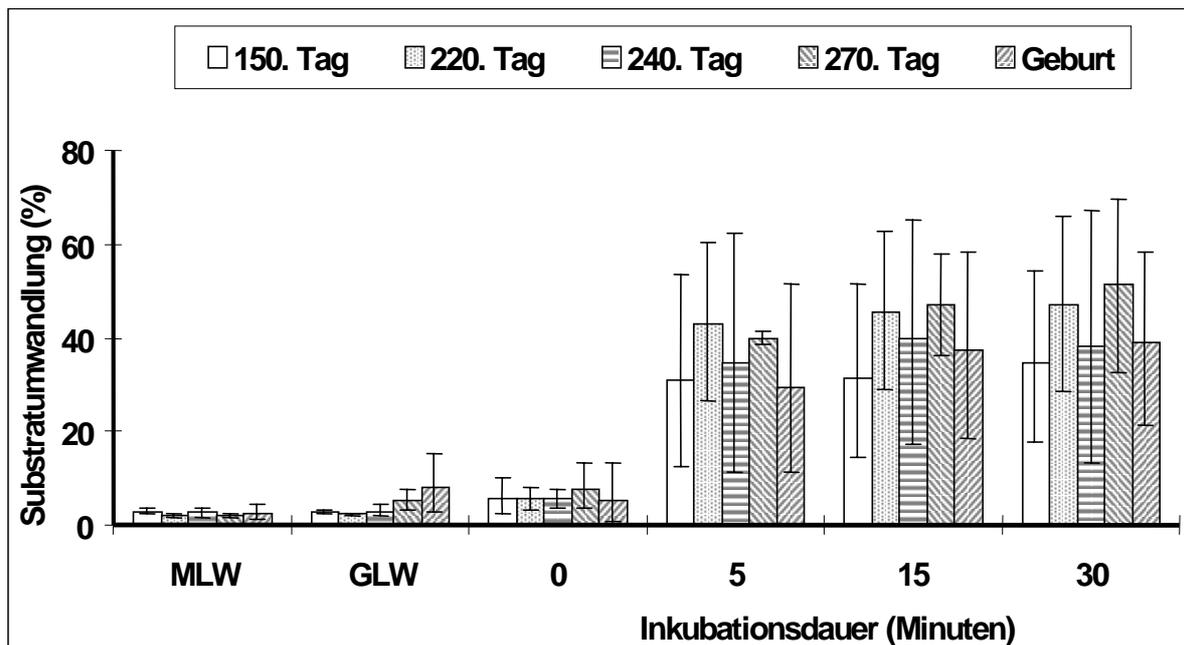


Abb. 1: Sulfokonjugation von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estron durch Homogenat aus (A) Kotyledonen- bzw. (B) Karunkelgewebe in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Die Tiere ( $n=3-4$ ) der verschiedenen Versuchsgruppen sind jeweils in Säulen zusammengefaßt. Dargestellt ist der Median mit einfachem Streubereich.

MLW = Mediumleerwerte nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwerte nach 30-minütiger Inkubation

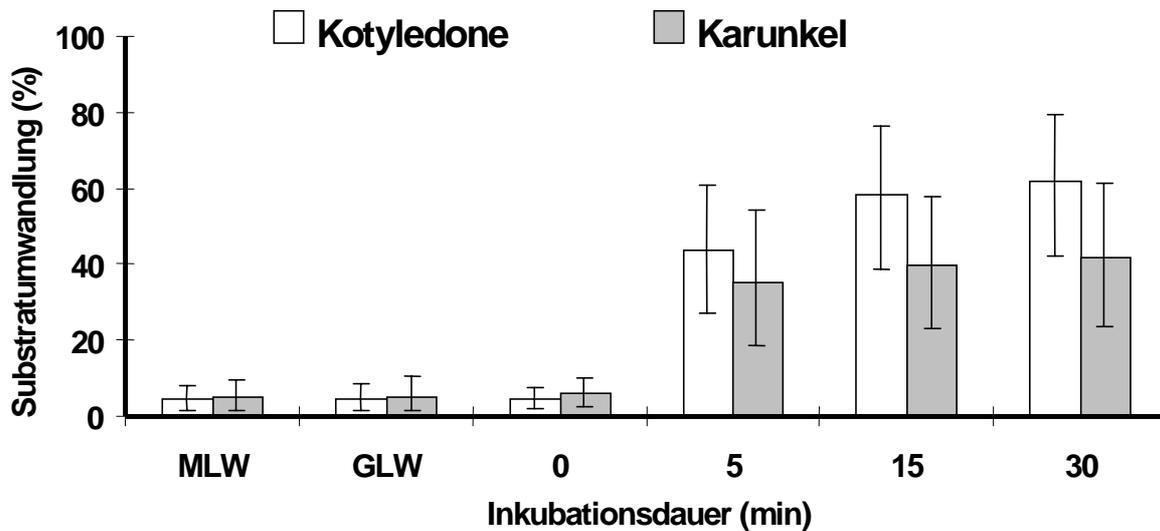


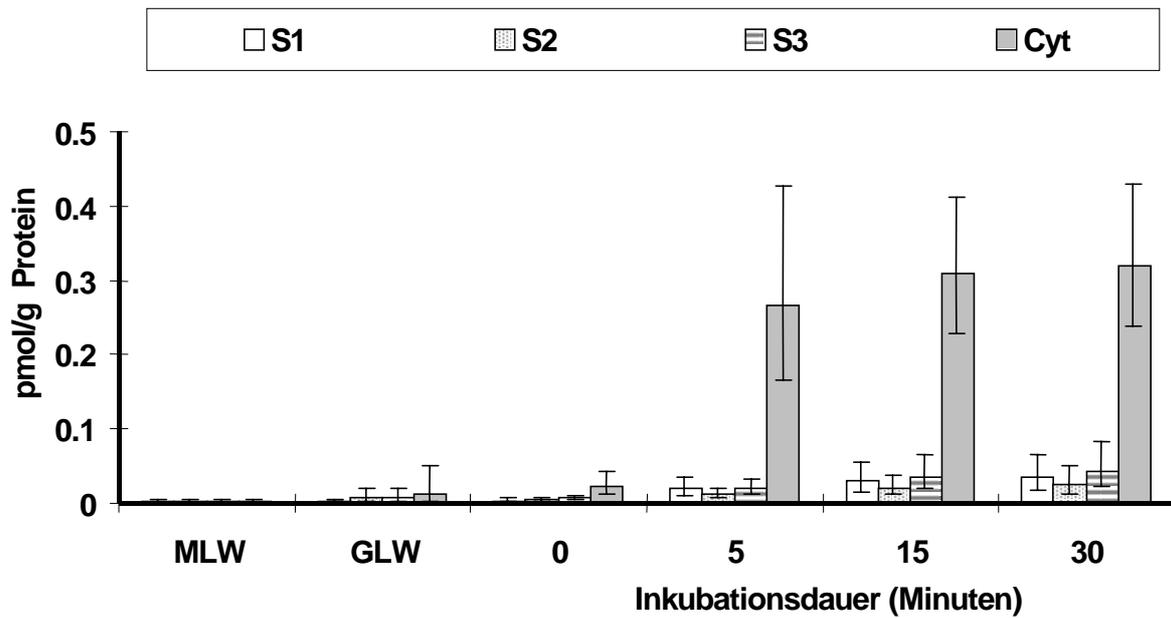
Abb. 2: Sulfokonjugation von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estron durch Homogenate aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe. Da zwischen den verschiedenen Trächtigkeitsstadien kein signifikanter Unterschied feststellbar war, wurden jeweils die Meßwerte aller Tiere zusammengefaßt (n= 18). Dargestellt ist die Substratumwandlung (in % der eingesetzten Substratmenge) als Median und einfacher Streubereich.

MLW = Mediumleerwerte nach 30-minütiger Inkubation  
 GLW = Gewebeleerwerte nach 30-minütiger Inkubation

### 2.4.3. Sulfokonjugation von Estron in subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe

Sowohl im fetalen als auch im maternalen Anteil der Plazentome ergaben sich - bezogen auf die Proteinkonzentrationen der subzellulären Fraktionen - die bei weitem höchsten Umwandlungsraten im Zytosol ( $p < 0.001$ ; s. Tabelle 5 und Abbildung 3), während die restlichen getesteten Fraktionen hinsichtlich der Sulfokonjugation von  $^3\text{H}$ -Estron deutlich weniger aktiv waren. Der Verlauf der Sulfokonjugation im Zytosol war vergleichbar mit der in den Gesamtzellhomogenaten beobachteten Umwandlung. Auch hier wurde das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 15 Minuten annähernd erreicht. Aufgrund der niedrigen OST-Aktivitäten in der Mitochondrien-, Mikrosomen- bzw. Kernfraktion wurde dort auf eine eigene statistische Bearbeitung verzichtet. Ein Einfluß der Versuchsgruppe auf die Sulfokonjugation von  $^3\text{H}$ -Estron war auch bei der separaten statistischen Bearbeitung der Substratumwandlung im Zytosol nicht nachweisbar (s. Tabelle 6), weshalb die Messwerte aller Tiere in Abbildung 3 zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst wurden. Die Substratumwandlungen waren in aus Kotyledonengewebe gewonnenem Zytosol ca. doppelt so hoch wie die entsprechenden Umwandlungsraten im Zytosol aus Karunkelgewebe ( $p < 0.01-0.001$ ).

## A. Kotyledone



## B. Karunkel

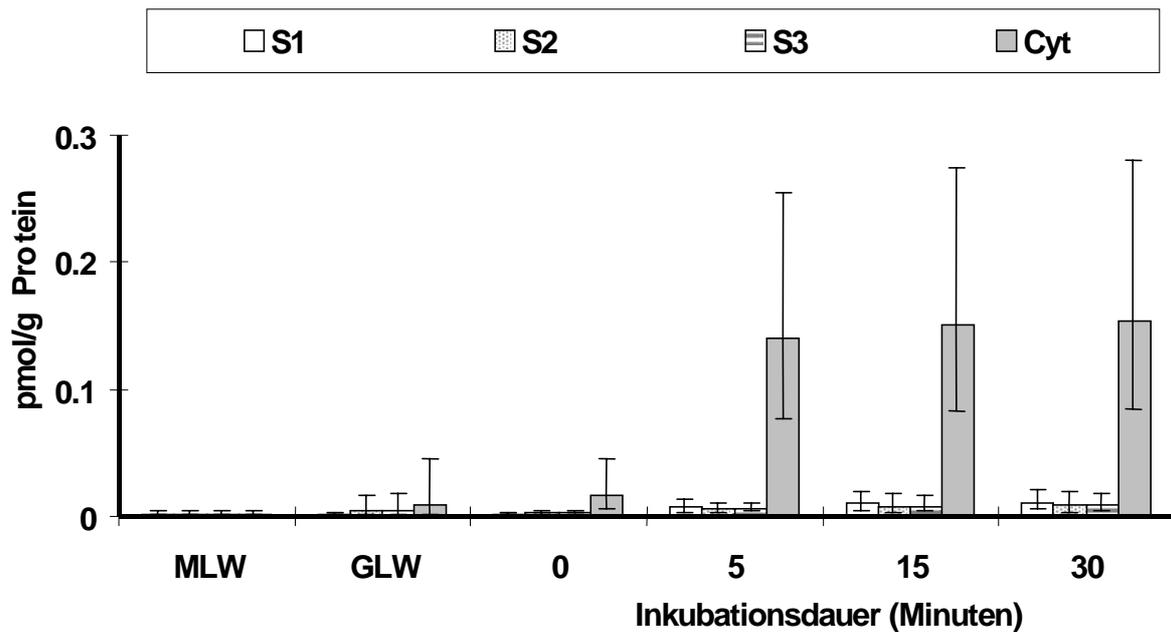


Abb. 3: Sulfokonjugation von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus (A) Kotyledonen- bzw. (B) Karunkelgewebe von graviden Rindern ( $n=11$ ) mit einer Graviditätsdauer zwischen 150 und 270 Tagen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Dargestellt ist die Substratumwandlung in pmol/g Protein ( $X_g \cdot \text{SF}^{\pm 1}$ ).

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

S1 = Kernfraktion

S2 = Mitochondrienfraktion

S3 = Mikrosomenfraktion

Cyt = Zytosol

Tabelle 5: Statistische Auswertung der Inkubationen zur Darstellung der Östrogensulfotransferaseaktivität in verschiedenen subzellulären Fraktionen (Faktor: Fraktion) aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Faktor: Herkunft) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Graviditätstage 150, 220, 240 und 270; Faktor: Gruppe). Weiterhin wurde auf die Wechselwirkungen Fraktion x Gruppe (FG), Herkunft x Gruppe (HG), Fraktion x Herkunft (FH) sowie auf eine Wechselwirkung aller drei Faktoren (FHG) untersucht. Die statistische Prüfung für die Substratumwandlung (SU) nach 5-, 15- und 30-minütiger Inkubationsdauer sowie für die entsprechenden AUC-Werte erfolgte mittels dreifaktorieller Varianzanalyse.

Parameter	p (Gruppe)	p (Fraktion)	p (Herkunft)	p (FG)	p (HG)	p (FH)	p (FHG)
SU <sub>5 min</sub>	0.113	0.000	0.000	0.245	0.568	0.384	0.744
SU <sub>15 min</sub>	0.051	0.000	0.000	0.311	0.881	0.129	0.661
SU <sub>30 min</sub>	0.103	0.000	0.000	0.296	0.904	0.101	0.617
AUC	0.065	0.000	0.000	0.254	0.870	0.113	0.767

Tabelle 6: Statistische Auswertung der Inkubationen zur Darstellung der Östrogensulfotransferaseaktivität im Zytosol<sup>3</sup> aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Faktor: Herkunft) in Abhängigkeit vom Untersuchungsstadium (Graviditätstage 150, 220, 240 und 270; Faktor: Gruppe). Weiterhin wurde die Wechselwirkung Herkunft x Gruppe (HG) untersucht. Die statistische Prüfung für die Substratumwandlung (SU) nach 5-, 15- und 30-minütiger Inkubationsdauer sowie für die entsprechenden AUC-Werte erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse.

Meßgröße	p (Gruppe)	p (Herkunft)	p (HG)
SU <sub>5 min</sub>	0.451	0.001	0.404
SU <sub>15 min</sub>	0.794	0.000	0.527
SU <sub>30 min</sub>	0.813	0.000	0.580
AUC	0.453	0.000	0.186

#### 2.4.4. Substratspezifität der Östrogensulfotransferase

Bei der Inkubation äquimolarer Mengen (0.3 pmol/Ansatz) verschiedener phenolischer bzw. neutraler Steroide mit einem Gemisch von Zytosol aus Kotyledonen- und Karunkelgewebe einer 240 Tage trächtigen Kuh zeigte sich, daß <sup>3</sup>H-Estradiol-17β und <sup>3</sup>H-Estron gleichermaßen rasch und mit hoher Ausbeute sulfokonjugiert wurden (s. Abbildung 4). Hierbei war das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 5 Minuten annähernd erreicht. <sup>3</sup>H-Estradiol-17α wurde

<sup>3</sup> Aufgrund der sehr niedrigen Östrogensulfotransferaseaktivitäten in den restlichen getesteten subzellulären Fraktionen wurde dort auf eine eigene statistische Bearbeitung verzichtet.

ebenfalls in erheblichem Ausmaß sulfokonjugiert, die Umwandlung erfolgte jedoch deutlich langsamer und erreichte auch nach 30-minütiger Inkubation mit ca. 60% Umwandlung nicht die maximale Umwandlung von Estradiol-17 $\beta$  und Estron (jeweils ca. 75%). Wurden den Inkubationsansätzen die 3 $\beta$ -Hydroxy-5-en-Steroide Dehydroepiandrosteron bzw. Pregnenolon oder Testosteron, ein 3-keto-4-en-Steroid mit einer  $\beta$ -ständigen OH-Gruppe an C17, als Substrat angeboten, war keine Umwandlung feststellbar. Bei den Inkubationsansätzen zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase lagen die Mediumleerwerte und Gewebeleerwerte bei 2.0%  $\pm$  1.0% Substratumwandlung.



Abb. 4: Sulfokonjugation verschiedener phenolischer bzw. neutraler Steroide bei der Inkubation mit einem Gemisch von Zytosol aus Kotyledonen- und Karunkelgewebe einer 240 Tage graviden Kuh. Die  $^3\text{H}$ -markierten Substrate wurden in äquimolaren Mengen von 0.3 pmol in die Versuchsansätze eingebracht.

E2 $\beta$  = Estradiol-17 $\beta$

E1 = Estron

E2 $\alpha$  = Estradiol-17 $\alpha$

DHEA = Dehydroepiandrosteron

P5 = Pregnenolon

T = Testosteron

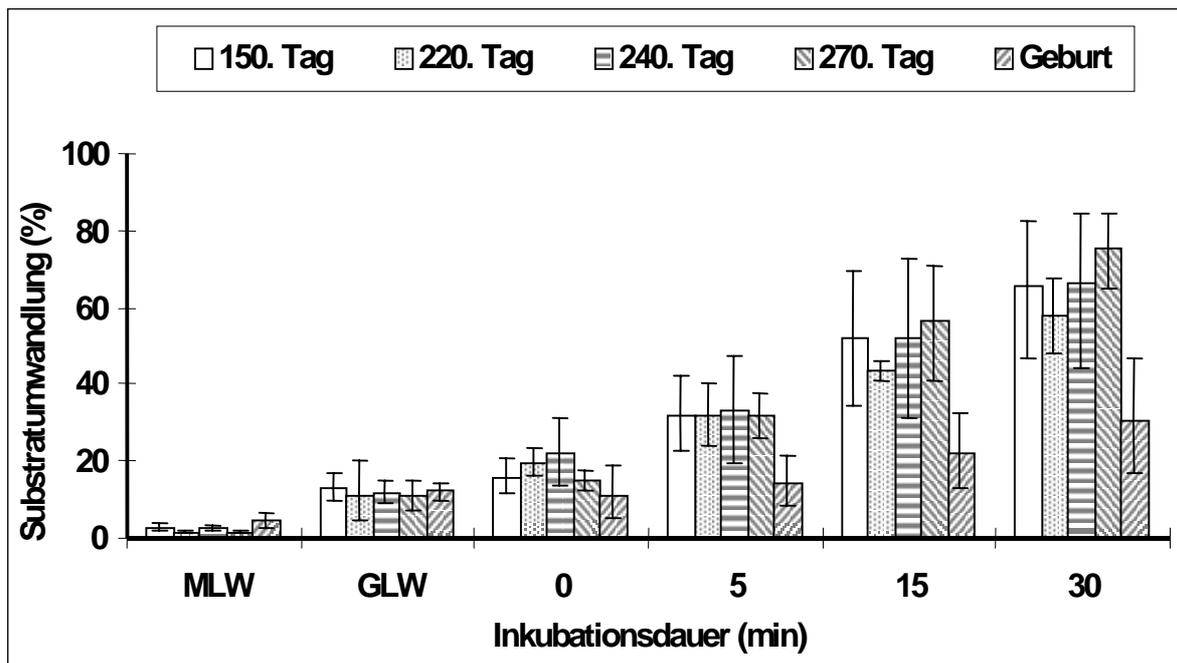
#### 2.4.5. Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Karunkel- bzw. Kotyledonen gewebe

Die Hydrolyse von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat war sowohl in Homogenaten aus Karunkel- als auch aus Kotyledonengewebe in erheblichem Ausmaß nachweisbar (s. Abbildung 5). Sie war im maternalen Teil der Plazentome bei den graviden Tieren unabhängig vom Trächtigkeitsstadium bereits nach 15 Minuten annähernd abgeschlossen und erreichte mittlere maximale Umwandlungen von ca. 90%. Im Kotyledonengewebe war dagegen eine kontinuierliche Substratum-

wandlung bis zum Ende der 30-minütigen Inkubationsdauer zu beobachten. Bei graviden Tieren waren dann im Mittel ca. 70% des angebotenen  $^3\text{H}$ -Estronsulfats hydrolysiert. Unter der Geburt waren die OS-Aktivitäten in Karunkel- bzw. Kotyledonenhomogenaten signifikant niedriger als bei graviden Tieren ( $p < 0.05$ ), während sich zwischen den verschiedenen untersuchten Graviditätszeitpunkten keine Unterschiede ergaben (s. Tabelle 7). Die OS-Aktivität war im maternalen Teil der Plazentome deutlich höher als im fetalen (s. Abbildung 6). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Geburtstiere für alle Parameter hochsignifikante Unterschiede ( $p$  jeweils  $< 0.001$ ; s. Tabelle 7). Mit Ausnahme der 5 Minuten-Werte unter Berücksichtigung der Geburtsgruppe ( $p < 0.05$ ) gab es sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Geburtstiere weder zu den verschiedenen Inkubationszeiten noch bei der AUC eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Einfluß der Gewebeherkunft und dem Einfluß der Trächtigkeitsdauer ( $p > 0.05$ ). Dies spricht dafür, daß der Unterschied zwischen Karunkel- und Kotyledonengewebe unabhängig vom Trächtigkeitsstadium ist.

Hinsichtlich der Gewebeleerwerte und 0-Minuten-Inkubationsansätze fallen wie in den im folgenden beschriebenen Experimenten zur Darstellung der OS-Aktivität die gegenüber den Mediumleerwerten teilweise deutlich erhöhten und stark streuenden Messwerte auf. Dies weist auf erhebliche Probleme bei der Inaktivierung der OS insbesondere in Proben mit hoher OS-Aktivität hin (s. auch „Diskussion der Methodik“ in Abschnitt 2.5.1.).

## A. Kotyledone



## B. Karunkel

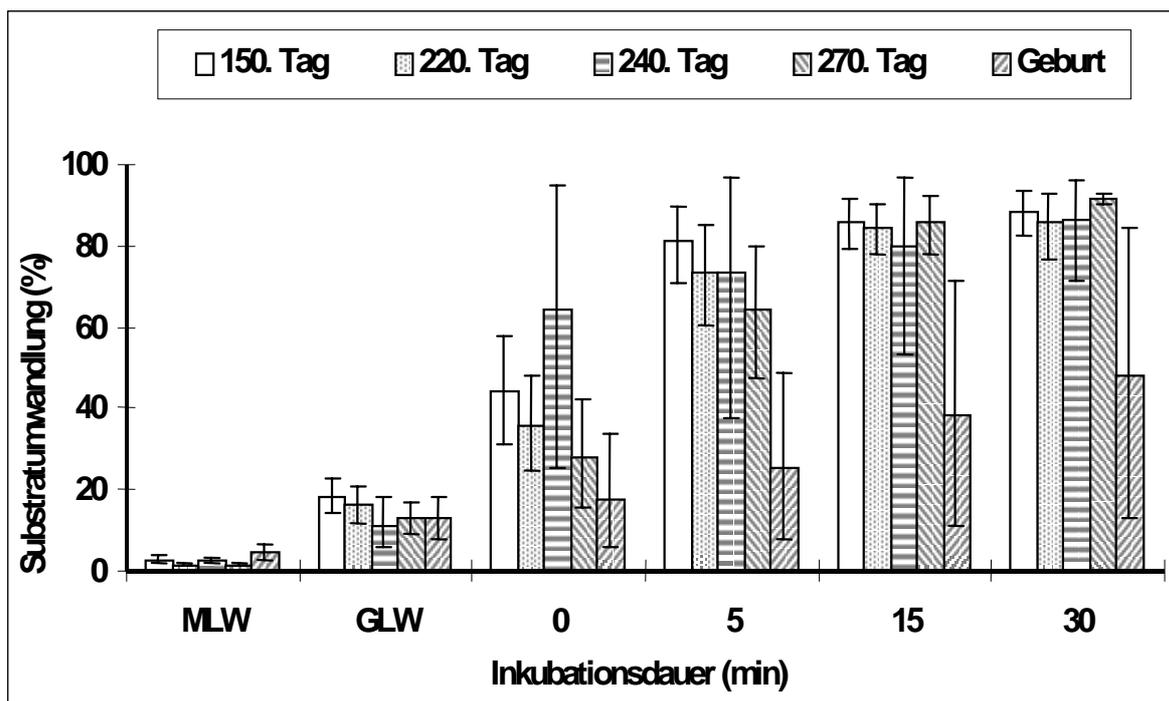
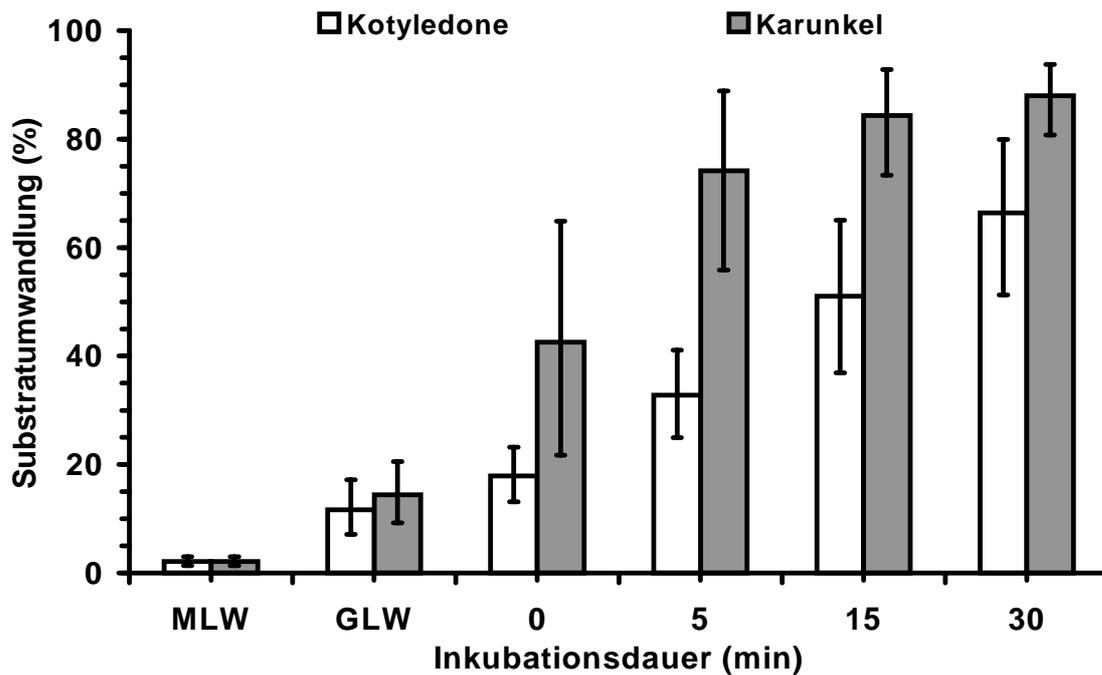


Abb. 5: Hydrolyse von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estronsulfat durch Homogenate aus (A) Kotyledonen- bzw. (B) Karunkelgewebe in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Die Tiere ( $n=3-4$ ) der verschiedenen Versuchsgruppen sind jeweils in Säulen zusammengefaßt. Dargestellt ist der Median mit einfachem Streubereich.

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

## A) Gravide Tiere (n=14)



## B) Tiere unter der Geburt (n=4)

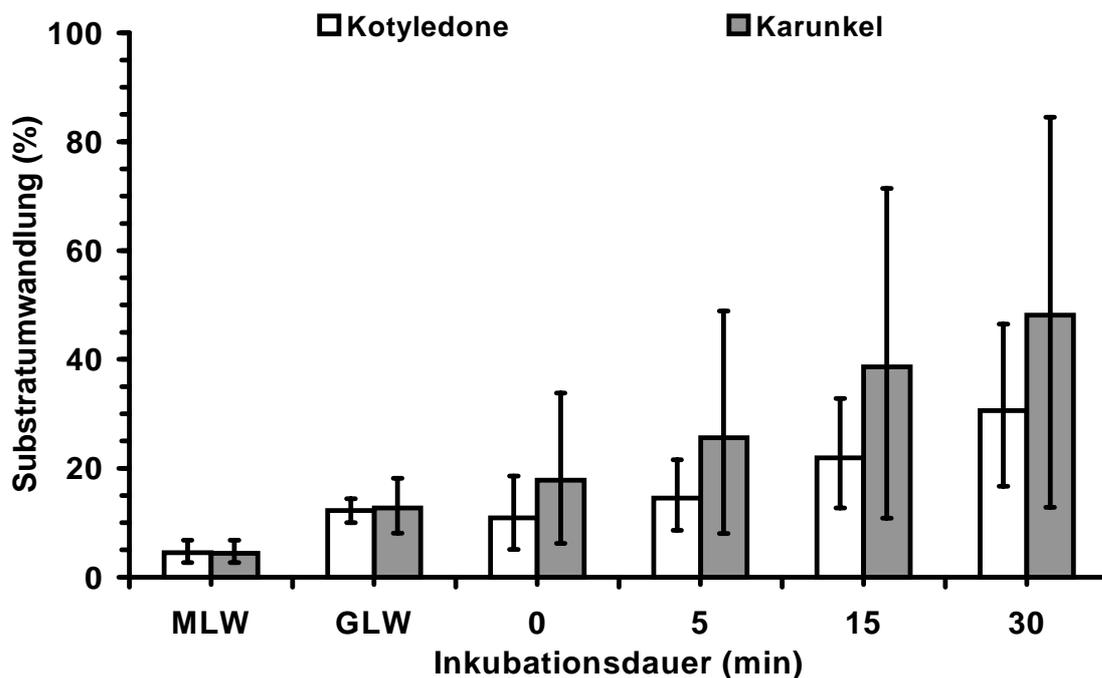


Abb. 6: Hydrolyse von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in Abhängigkeit von der Herkunft der Homogenate (Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe). Aufgrund der signifikanten Unterschiede zwischen A) graviden Tieren (n=14) und B) Tieren unter der Geburt (n=4) erfolgt die Darstellung der Substratumwandlung getrennt (Median und einfacher Streubereich).

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

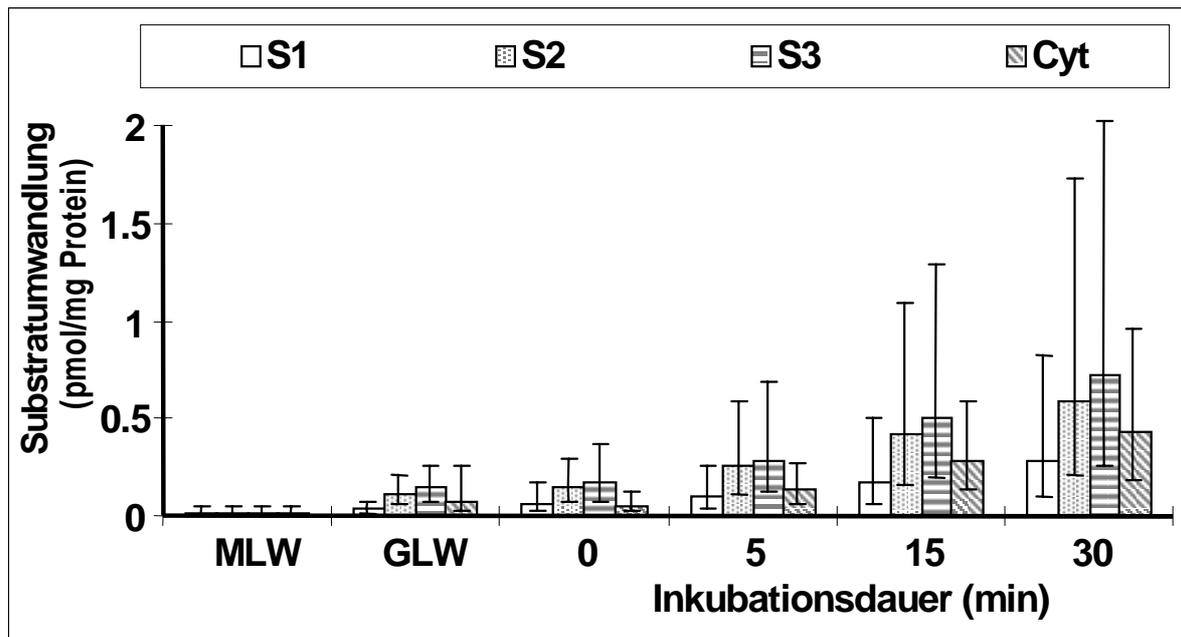
Tabelle 7: Statistische Auswertung der Homogenatinkubationen zur Darstellung der Östrogensulfatase-Aktivität in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Faktor: Herkunft) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Graviditätstage 150, 220, 240 und 270 sowie unter der Geburt; Faktor: Gruppe). Weiterhin wurde auf eine Wechselwirkung Herkunft x Gruppe (HG) untersucht. Die statistische Prüfung für die Substratumwandlung (% SU) nach 5-, 15- und 30-minütiger Inkubationsdauer sowie der entsprechenden AUC-Werte wurde sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Daten aus der Geburtsgruppe durchgeführt.

	Parameter	p (Gruppe)	p (Herkunft)	p (HG)
<b>mit Geburtstieren</b> (n = 18)	SU <sub>5 min</sub>	0.017	0.000	0.029
	SU <sub>15 min</sub>	0.019	0.000	0.340
	SU <sub>30 min</sub>	0.026	0.000	0.810
	AUC	0.026	0.000	0.248
<b>ohne Geburtstiere</b> (n = 14)	SU <sub>5 min</sub>	0.863	0.000	0.440
	SU <sub>15 min</sub>	0.909	0.000	0.653
	SU <sub>30 min</sub>	0.646	0.000	0.710
	AUC	0.921	0.000	0.665

#### 2.4.6. Hydrolyse von Estronsulfat in subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe

Sowohl im fetalen als auch im maternalen Anteil der Plazentome ergaben sich - bezogen auf die Proteinkonzentrationen des Probenmaterials - hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0.001$ ) zwischen den in den einzelnen subzellulären Fraktionen gemessenen Umwandlungen (s. Abbildung 7 sowie Tabellen 8 und 9). Weiterhin ergab sich eine signifikant positive Wechselwirkung zwischen den Faktoren Fraktion und Herkunft des Probenmaterials (Karunkel bzw. Kotyledone;  $p < 0.05-0.001$ ). Sowohl in Kotyledonen als auch in Karunkeln fanden sich die höchsten Werte stets in der Mikrosomen- bzw. Mitochondrienfraktion, wobei mit Ausnahme des 30-Minuten-Wertes analog zu den Ergebnissen der Homogenatinkubationen im Karunkelgewebe signifikant höhere Umwandlungsraten gemessen wurden als im Kotyledonengewebe ( $p < 0.05-0.01$ ). Auch in der Kernfraktion des Karunkelgewebes war mit Ausnahme des 30-Minuten-Wertes die Hydrolyse des angebotenen  $^3\text{H}$ -Estronsulfats signifikant höher als in der Kernfraktion des Kotyledonengewebes ( $p < 0.05$ ). Dagegen wurde im Kotyledonengewebe eine höhere zytosolische Östrogensulfataseaktivität gemessen als im Karunkelgewebe ( $p < 0.01$ ). Ein Einfluß des Trächtigkeitsstadiums auf die Hydrolyse von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat war auch bei Verwendung von Zellfraktionen als Probenmaterial weder im Karunkel- noch im Kotyledonengewebe nachweisbar.

## A. Kotyledone



## B. Karunkel

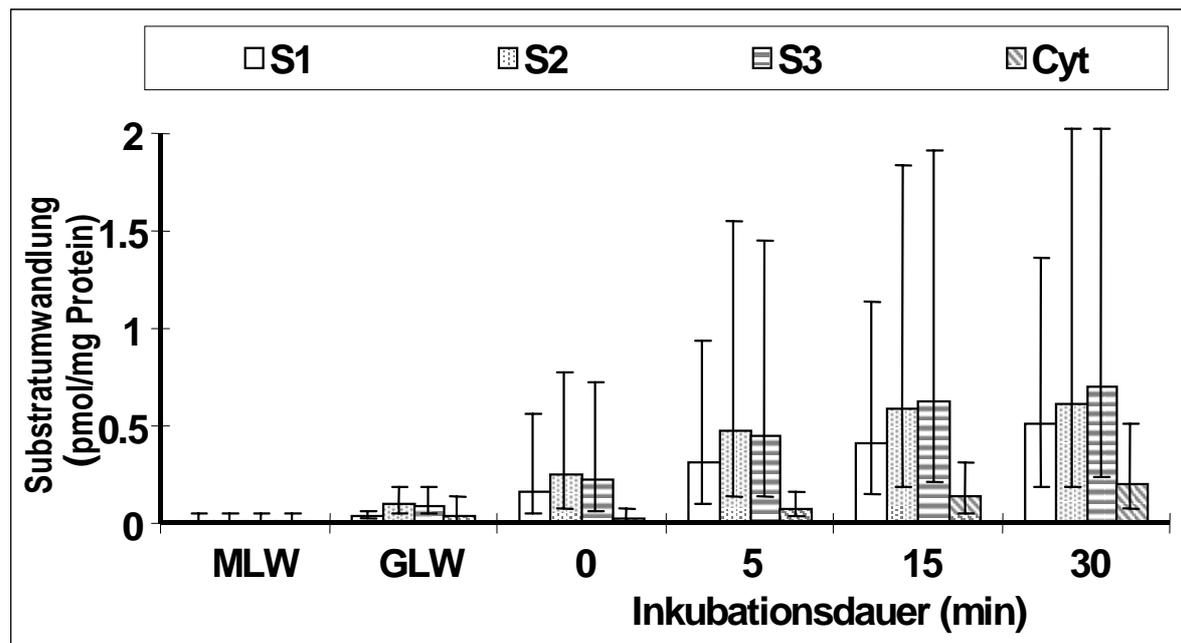


Abb. 7: Hydrolyse von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus (A) Kotyledonen- bzw. (B) Karunkelgewebe von 150-270 Tage graviden Rindern ( $n=11$ ) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Dargestellt ist die Substratumwandlung in pmol/g Protein ( $\text{Xg} \cdot \text{SF}^{\pm 1}$ ).

MLW = Mediumleerwerte nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwerte nach 30-minütiger Inkubation

S1 = Kernfraktion

S2 = Mitochondrienfraktion

S3 = Mikrosomenfraktion

Cyt = Zytosol

Tabelle 8: Statistische Auswertung der Inkubationen zur Darstellung der Östrogensulfataseaktivität in verschiedenen subzellulären Fraktionen (Faktor: Fraktion) aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Faktor: Herkunft) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Graviditätstage 150, 220, 240 und 270; Faktor: Gruppe). Weiterhin wurde auf die Wechselwirkungen Fraktion x Gruppe (FG), Herkunft x Gruppe (HG), Fraktion x Herkunft (FH) sowie auf eine Wechselwirkung aller drei Faktoren (FHG) untersucht. Die statistische Prüfung für die Substratumwandlung (SU) nach 5-, 15- und 30-minütiger Inkubationsdauer sowie für die entsprechenden AUC-Werte erfolgte mittels dreifaktorieller Varianzanalyse.

Parameter	p (Gruppe)	p (Fraktion)	p (Herkunft)	p (FG)	p (HG)	p (FH)	p (FHG)
SU <sub>5 min</sub>	0.460	0.000	0.004	0.893	0.221	0.000	0.342
SU <sub>15 min</sub>	0.313	0.000	0.045	0.579	0.216	0.003	0.641
SU <sub>30 min</sub>	0.168	0.000	0.833	0.352	0.348	0.015	0.694
AUC	0.283	0.000	0.041	0.638	0.218	0.000	0.689

Tabelle 9: Separate statistische Auswertung der Inkubationen zur Darstellung der Östrogensulfataseaktivität für die einzelnen subzellulären Fraktionen aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Faktor: Herkunft) in Abhängigkeit vom Untersuchungsstadium (Graviditätstage 150, 220, 240 und 270; Faktor: Gruppe). Weiterhin wurde die Wechselwirkung Herkunft x Gruppe (HG) untersucht. Die statistische Prüfung für die Substratumwandlung (SU) nach 5-, 15- und 30-minütiger Inkubationsdauer sowie für die entsprechenden AUC-Werte erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalysen.

Fraktion	Parameter	p (Gruppe)	p (Herkunft)	p (HG)
Kern (S1)	SU <sub>5 min</sub>	0.604	0.002	0.615
	SU <sub>15 min</sub>	0.554	0.021	0.603
	SU <sub>30 min</sub>	0.326	0.073	0.582
	AUC	0.477	0.015	0.612
Mitochondrien (S2)	SU <sub>5 min</sub>	0.488	0.003	0.624
	SU <sub>15 min</sub>	0.370	0.011	0.466
	SU <sub>30 min</sub>	0.208	0.386	0.360
	AUC	0.327	0.010	0.416
Mikrosomen (S3)	SU <sub>5 min</sub>	0.496	0.000	0.031
	SU <sub>15 min</sub>	0.437	0.015	0.084
	SU <sub>30 min</sub>	0.349	0.577	0.347
	AUC	0.405	0.012	0.061
Zytosol	SU <sub>5 min</sub>	0.154	0.002	0.849
	SU <sub>15 min</sub>	0.062	0.001	0.627
	SU <sub>30 min</sub>	0.039	0.002	0.738
	AUC	0.061	0.001	0.713

### **2.4.7. Begleitende Untersuchungen zur Bedeutung konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes**

Begleitend zu den Hauptversuchen zur Charakterisierung der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase in den Plazentomen wurden punktuelle Untersuchungen zum Vorhandensein dieser beiden Enzymaktivitäten im Myometrium sowie im Lutealgewebe zyklischer bzw. gravider Rinder durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten erste Antworten auf folgende Fragen bringen:

- Kommen Myometrium (Wachstum) bzw. Corpus luteum (Interaktionen zwischen lutealer und plazentarer Steroidbiosynthese) als Zielorgane konjugierter plazentarer Östrogene ("Sulfatase-Pathway") bzw. als Stätte der Sulfokonjugation von Östrogenen in Frage?
- Ist beim Rind unter den steroidhormonproduzierenden Organen die Expression einer Östrogen-/Steroidsulfatase spezifisch für die Plazenta?

#### **2.4.7.1. Sulfokonjugation von Estron und Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Myometrium**

Die Östrogensulfotransferaseaktivität des Myometriums weist zwischen den untersuchten Proben erhebliche Schwankungen auf (s. Tabellen 10 und 11). Während in einem Teil der Proben keine bzw. lediglich eine marginale Umwandlung zu beobachten war, wurde die höchste Umwandlungsrate von 47,4% bei einem 270 Tage tragenden Tier gefunden. Eine eindeutige Aussage hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen der myometrialen Östrogensulfotransferaseaktivität und dem Graviditätsstadium bzw. der Probenentnahme in Längs- oder Ringmuskulatur kann aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht getroffen werden. Der anhand der Ergebnisse von Inkubationen mit Gesamtmyometrium entstandene Eindruck einer mit der Gestationsdauer zunehmenden Östrogensulfotransferaseaktivität hat sich in den Versuchen unter Verwendung von Ring- bzw. Längsmuskulatur nicht bestätigt.

Bei der Inkubation aller Myometriumsproben mit  $^3\text{H}$ -Estronsulfat wurde eine zeitabhängige Zunahme der  $^3\text{H}$ -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene beobachtet (vergl. Tabellen 12 und 13). Allerdings wurden auch nach Ablauf der maximalen Inkubationsdauer von 30 Minuten im Vergleich zu Plazenta-Homogenaten lediglich marginale Umwandlungen erzielt. Die höchsten Differenzen zwischen 30 Minuten-Werten und den zugehörigen Gewebeleerwerten lagen unter 11%. Ein Zusammenhang der Östrogensulfataseaktivität mit dem Graviditätsstadium bzw. mit der Entnahme aus einer der beiden Muskelschichten war nicht zu erkennen.

Tabelle 10: Sulfokonjugation von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estron (in % der zugefügten Substratmenge) in Homogenaten aus Myometrium von vier graviden Rindern. Die Gewebeproben umfassten alle Schichten des Myometriums und entstammten zufälligen Lokalisationen des graviden Uterus.

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
220	2.5	10.5	2.2	2.6	4.5	5.5
220	1.8	33.6*	2.4	6.6	14.5	29.0
240	2.0	2.0	4.1	10.0	23.5	34.6
270	1.5	2.5	2.7	10.6	31.5	47.4
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>1.9±0.3</b>	<b>12.1±11.5</b>	<b>2.9±0.7</b>	<b>7.4±2.9</b>	<b>18.8±9.1</b>	<b>29.1±13.6</b>

\* Hierbei handelt es sich offensichtlich um eine Fehlmessung

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

Tabelle 11: Sulfokonjugation von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estron (in % der zugefügten Substratmenge) in Homogenaten aus a) Ringmuskulatur bzw. b) Längsmuskulatur des Myometriums von sechs graviden Rindern. Die Gewebeproben entstammten zufälligen Lokalisationen des graviden Uterus.

a) Innere Ringmuskelschicht

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
150	3.5	2.4	2.3	4.2	8.0	12.4
150	2.6	3.1	2.7	2.3	3.1	2.7
150	2.4	2.3	2.7	2.8	2.9	2.8
240	2.0	2.7	3.2	6.0	13.1	21.1
240	4.3	3.8	2.7	4.3	5.7	9.7
270	2.1	2.4	2.1	2.7	4.2	5.3
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.8±0.8</b>	<b>2.8±0.5</b>	<b>2.6±0.4</b>	<b>3.7±1.3</b>	<b>6.2±3.6</b>	<b>9.0±6.5</b>

b) Äußere Längsmuskelschicht

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
150	3.5	2.4	2.6	2.8	3.8	4.8
150	2.6	2.9	3.7	4.4	4.7	8.0
150	2.4	2.7	3.5	4.6	5.7	5.7
240	2.0	2.3	6.7	6.2	18.5	32.4
240	4.3	3.6	2.3	2.7	4.1	5.0
270	2.1	2.5	4.2	5.3	10.7	18.3
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.8±0.8</b>	<b>2.7±0.4</b>	<b>3.8±1.4</b>	<b>4.3±1.3</b>	<b>7.9±5.3</b>	<b>12.4±10.1</b>

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

Tabelle 12: Hydrolyse von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estronsulfat (in % der zugefügten Substratmenge) in Homogenaten aus Myometrium von vier graviden Rindern. Die Gewebeproben umfassten alle Schichten des Myometriums und entstammten zufälligen Lokalisationen des graviden Uterus.

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
220	-	11.5	4.2	5.5	6.3	7.4
220	1.5	3.5	3.8	4.3	5.9	8.1
240	3.5	2.2	3.6	4.6	5.8	6.5
270	1.9	2.8	2.5	3.7	6.7	10.9
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.3±0.7</b>	<b>5.0±3.4</b>	<b>3.5±0.6</b>	<b>4.5±0.6</b>	<b>6.2±0.3</b>	<b>8.2±1.5</b>

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

Tabelle 13: Hydrolyse von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estronsulfat (in % der zugefügten Substratmenge) in Homogenaten aus a) Ringmuskulatur bzw. b) Längsmuskulatur des Myometriums von sechs graviden Rindern. Die Gewebeproben entstammten zufälligen Lokalisationen des graviden Uterus.

a) Innere Ringmuskelschicht

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
150	2.1	4.8	6.6	7.3	10.2	15.5
150	4.4	7.5	9.2	9.8	12.4	12.4
150	2.5	5.4	4.2	6.0	6.7	7.0
240	1.6	3.5	5.1	5.4	9.0	11.8
240	2.3	7.0	8.9	10.1	12.7	17.6
270	1.7	5.2	4.7	5.6	7.7	11.8
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.4±1.0</b>	<b>5.6±1.3</b>	<b>6.4±2.0</b>	<b>7.4±1.9</b>	<b>9.8±2.2</b>	<b>12.7±3.3</b>

b) Äußere Längsmuskelschicht

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
150	2.1	6.0	4.9	5.5	7.3	10.9
150	4.4	11.3	8.7	10.2	11.9	12.7
150	2.5	5.2	5.1	6.3	7.8	10.6
240	1.6	1.9	3.4	4.0	6.2	7.1
240	2.3	3.2	4.0	5.0	6.8	10.0
270	1.7	2.8	3.5	3.8	5.1	7.6
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.4±1.0</b>	<b>5.1±3.1</b>	<b>4.9±1.8</b>	<b>5.8±2.1</b>	<b>7.5±2.1</b>	<b>9.8±1.9</b>

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

### 2.4.7.2. Sulfokonjugation von Estron und Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Lutealgewebe gravider bzw. zyklischer Rinder

Untersuchungen zur Aktivität von Östrogensulfotransferase bzw. -sulfatase in Homogenaten aus Corpora lutea graviditates wurden an 150 (n= 3 Tiere) und 240 (n= 2 Tiere) Tage tragenden Rindern durchgeführt. Zum Vergleich wurden vier Gelbkörper zyklischer Tiere untersucht. Weder bei den Corpora lutea gravider Tiere noch bei den zyklischen Gelbkörpern war eine eindeutige Sulfokonjugation von  $^3\text{H}$ -Estron zu verzeichnen (s. Tabelle 14). Dagegen war sowohl bei den Corpora lutea der graviden als auch der zyklischen Tiere eine deutliche Hydrolyse von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat zu verzeichnen, wobei nach Abzug der Gewebeleerwerte maximale Umwandlungen von bis zu 45% erreicht wurden (s. Tabelle 15). Auch in den Experimenten an Lutealgewebe fielen die gegenüber den Mediumleerwerten deutlich erhöhten Meßwerte bei den Gewebeleerwerten und den 0 Minuten-Proben auf, welche offensichtlich auf Probleme bei der Inaktivierung der außerordentlich hitzestabilen Sulfatase zurückzuführen sind.

Tabelle 14: Sulfokonjugation von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estron (in % der zugefügten Substratmenge) in Homogenaten aus a) Corpora lutea gravider Rinder bzw. aus b) Corpora lutea zyklischer Rinder im Blütestadium.

a) Gravide Rinder (n=5)

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
150	3.5	3.3	3.7	4.7	3.5	3.6
150	2.6	2.8	2.7	2.8	2.7	2.4
240	2.4	7.2	3.3	3.4	4.0	3.7
240	2.0	2.6	2.7	3.7	4.1	4.5
240	4.3	5.0	3.3	3.5	3.7	4.8
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.9±0.8</b>	<b>4.2±1.7</b>	<b>3.1±0.4</b>	<b>3.6±0.6</b>	<b>3.6±0.5</b>	<b>3.8±0.8</b>

b) Zyklische Rinder (n=4)

C.I.-Nr.:	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
1	2.1	2.5	8.4	10.3	10.3	10.0
2		2.3	4.5	5.5	5.3	4.7
3		3.6	4.2	5.1	4.3	4.3
4		2.4	3.2	3.6	4.3	4.9
$\bar{x}\pm\text{SD}$	-	<b>2.7±0.5</b>	<b>5.1±2.0</b>	<b>6.2±2.5</b>	<b>6.0±2.5</b>	<b>6.0±2.4</b>

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

Tabelle 15: Hydrolyse von 0.6 pmol  $^3\text{H}$ -Estronsulfat (in % der zugefügten Substratmenge) in Homogenaten aus a) Corpora lutea gravidar Rinder bzw. aus b) Corpora lutea zyklischer Rinder im Blütestadium.

a) Gravide Rinder (n=5)

Tag	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
150	2.1	30.1	35.2	50.1	66.8	75.6
150	4.4	37.2	41.2	47.8	58.8	64.6
240	2.5	31.8	37.2	42.8	50.8	61.6
240	1.6	16.3	31.3	34.3	47.5	53.6
240	2.3	20.9	25.1	27.2	37.5	49.1
$\bar{x}\pm\text{SD}$	<b>2.6±1.0</b>	<b>27.2±7.6</b>	<b>34.0±5.5</b>	<b>40.4±8.6</b>	<b>52.3±10</b>	<b>60.9±9.2</b>

b) Zyklische Rinder (n=4)

C.I.-Nr.:	MLW	GLW	0 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
1	4.0	10.7	19.1	20.5	24.3	28.0
2		21.8	29.3	29.9	37.0	38.2
3		30.7	36.7	40.6	54.6	66.3
4		18.9	27.9	30.6	34.2	46.2
$\bar{x}\pm\text{SD}$	-	<b>20.5±7.2</b>	<b>28.2±6.3</b>	<b>30.4±7.1</b>	<b>37.5±10.9</b>	<b>44.7±14.0</b>

MLW = Mediumleerwert nach 30-minütiger Inkubation

GLW = Gewebeleerwert nach 30-minütiger Inkubation

## 2.5. Diskussion

### 2.5.1. Diskussion der Methodik

Ein wesentlicher Anlaß für die Durchführung dieser *in vitro*-Studien zur Bildung konjugierter Östrogene in den Plazentomen war die Diskrepanz zwischen dem hohen Anteil an sulfokonjugiertem Estron unter den graviditätsassoziierten Östrogenen *in vivo* (HOFFMANN et al., 1997) und der fast ausschließlichen Produktion freier Östrogene *in vitro* (SCHMITT, 1994; SCHULER et al., 1994; s. Kapitel I). Bei der Etablierung des in den eigenen Untersuchungen verwendeten Testsystems zeigte sich, daß in Homogenaten bzw. Gewebeverbänden die OST-Aktivität in Karunkeln und Kotyledonen durch die aus zerstörten Zellen freigesetzte OS-Aktivität maskiert wurde. Erst nach Hemmung der OS-Aktivität mittels eines kompetitiven Inhibitors war *in vitro* eine OST-Aktivität nachweisbar. Somit konnte die Ursache des Widerspruchs zwischen den Ergebnissen vorangegangener *in vitro*-Arbeiten und *in vivo*-Befunden eindeutig geklärt werden.

Bei der präparativen Trennung von fetalem und maternalem Anteil der Plazentome wurde darauf geachtet, daß fetale Zotten möglichst vollständig aus den Karunkelkrypten entfernt wurden. Bedingt durch die Art der Gewinnung des Probenmaterials können die Kotyledonen-Präparationen als weitgehend frei von Kontaminationen aus dem maternalen Teil der Plazentome angesehen werden, während in den Karunkel-Präparationen ein gewisser Anteil an Bestandteilen kotyledonären Ursprungs unvermeidbar war. Da jedoch das für die Karunkel-Präparationen verwendete Gewebematerial durch flache, tangential zur Karunkeloberfläche geführte Schnitte gewonnen wurde - d.h. aus einem Bereich, in dem fetale Anteile unter Sichtkontrolle weitestgehend entfernt wurden - kann die Verunreinigung der Karunkelpräparationen durch Kotyledonen-Anteile insgesamt als mengenmäßig gering angesehen werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse zur subzellulären Verteilung der OST- bzw. OS-Aktivität ist zu berücksichtigen, daß die zur Präparation subzellulärer Fraktionen eingesetzten Differentialzentrifugationsverfahren eine gewisse Anreicherung, jedoch keine echte Reinigung aller subzellulären Kompartimente erlauben. Wie in Vorversuchen die Messungen entsprechender Markerenzyme zeigten, wurde in den eigenen Präparationen eine weitgehende Trennung zwischen Zytosol und den restlichen untersuchten Fraktionen erreicht. Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen wiesen jedoch untereinander erhebliche Kreuzkontaminationen auf.

Zur Abschätzung der Präzision des Meßverfahrens wurden bei den ersten drei Versuchstieren die Inkubationsansätze im Vierfachansatz bestimmt. Der Variationskoeffizient lag bei diesen Messungen stets unter 5%, im Durchschnitt bei 1.3%. Aufgrund der hohen Präzision wurden bei den folgenden Versuchstieren die Proben im Doppelansatz gemessen und die restlichen Parallelproben nur in den wenigen Fällen einer Abweichung von mehr als 5% analysiert und in der Auswertung berücksichtigt.

Die teilweise deutlich erhöhten und stark streuenden Meßwerte nach 30-minütiger Inkubation von "hitzeinaktivierten" Homogenaten bzw. subzellulären Fraktionen (Gewebeleerwerte) bei den Untersuchungen zur OS-Aktivität zeigen die Schwierigkeiten einer vollständigen Inaktivierung dieses Enzyms. Offensichtlich ist die plazentare OS des Rindes ein ausgesprochen hitzestabiles Enzym. Auch die Steroidsulfatase der menschlichen Plazenta erwies sich als sehr hitzestabil, ihr Temperaturoptimum liegt bei ca. 60°C (CHIBBAR und MITCHELL, 1990). Weiterhin hatten Versuche bei der Etablierung der Methoden gezeigt, daß die plazentare OS des Rindes auch während der Probenextraktion in Toluol aktiv bleibt. Die stets marginalen Umwandlungen in den gleichbehandelten Mediumleerwerten sprechen dafür, daß den erhöhten Gewebeleerwerten ebenso wie den Substratumwandlungen der Probenansätze tatsächlich eine enzymatische Umwandlung und nicht eine Instabilität des Substrates unter den Test- und Analysebedingungen zugrundeliegt.

## **2.5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **2.5.2.1. Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma**

Die gemessenen Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma der Muttertiere und der Feten bzw. Kälber stimmen mit entsprechenden Angaben in der Literatur (CHALLIS et al., 1974; HOFFMANN et al., 1976; ROBERTSON und KING, 1979; SCHAMS et al., 1972; HOFFMANN et al., 1997) überein. Somit kann aus endokrinologischer Sicht davon ausgegangen werden, daß die erhobenen Daten an physiologischen Graviditäten gewonnen wurden.

### **2.5.2.2. Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase in Kotyledonen und Karunkeln**

Bisherige punktuelle Untersuchungen (MATTIOLI et al., 1984; MÖSTL et al., 1986; KIESENHOFER, 1987) zur Verteilung der OST und der OS in den Plazentomen des Rindes hatten ergeben, daß in Kotyledonen und Karunkeln beide Aktivitäten vorhanden sind, wobei die höhere OST-Aktivität im fetalen Teil der Plazentome zu finden war, während die höhere OS-Aktivität in den Karunkeln gemessen wurde. Diese Verteilung der Aktivität konnte in den eigenen Untersuchungen für die gesamte zweite Hälfte der Trächtigkeit bestätigt werden.

Bezüglich der OST-Aktivität ergab sich in Karunkeln und Kotyledonen kein statistisch signifikanter Einfluß des Untersuchungszeitpunkts, d.h. des Trächtigkeitsstadiums. Auch unter der Geburt war die OST im Karunkelgewebe in gegenüber der Trächtigkeit unverändert hoher Aktivität nachweisbar. Im Kotyledonengewebe sank sie im Mittel auf ca. 60 % der in der vorangegangenen Trächtigkeitsphase gemessenen Werte ab. Aufgrund der hohen Streuung innerhalb der Geburtsgruppe erwies sich dieser Abfall jedoch nicht als statistisch signifikant ( $p > 0.05$ ).

Im Gegensatz zur OST- konnte bezüglich der OS-Aktivität ein Einfluß der Versuchsgruppe statistisch abgesichert werden. Zwischen den untersuchten Graviditätsstadien ergaben sich

jedoch ebenfalls keine Unterschiede. Die statistische Signifikanz resultierte allein aus den niedrigeren Aktivitäten der Geburtsgruppe. In den Kotyledonen wurden bei allen Geburtstieren niedrige OS-Aktivitäten gemessen. Die Messwerte in den Karunkeln wiesen dagegen zwischen den einzelnen Versuchstieren der Geburtsgruppe erhebliche Schwankungen auf. Entsprechend ergaben sich - je nach gemessenem Parameter und Inkubationsdauer - teilweise signifikante Wechselwirkungen zwischen der Versuchsgruppe und der Herkunft, d.h. der Einfluß der Versuchsgruppe hängt von der Herkunft des Probenmaterials ab und gilt offensichtlich primär für das Kotyledonengewebe. Doch ist bezüglich der OST-Aktivität in den Karunkeln aufgrund der sehr inhomogenen Meßwerte dort ebenfalls ein geburtsbedingter Abfall zu vermuten, der bei den einzelnen Tieren dieser Gruppe in unterschiedlichem Ausmaß vorangeschritten war. Offen bleibt, ob dem intrapartalen Abfall der OS-Aktivitäten eine Herunterregulierung der Enzymaktivität oder das Verschwinden bzw. der Vitalitätsverlust einer Sulfatase-exprimierenden Zellpopulation zugrunde liegt. Die eigenen Ergebnisse stehen hier in klarem Widerspruch zu den Resultaten von JANSZEN et al. (1995), nach denen es zwischen dem 262. Graviditätstag und der Geburt zu einem deutlichen Anstieg der OS-Aktivität in den Plazentomen kommt. Aufgrund ihrer Ergebnisse vermuteten diese Autoren, daß ein präpartaler Anstieg der plazentaren Steroidsulfataseaktivität maßgeblich am steilen präpartalen Anstieg der freien Östrogene im maternalen Plasma beteiligt ist. Die eigenen Befunde sprechen jedoch unter Berücksichtigung der in Kapitel I erhaltenen Ergebnisse dafür, daß dem steilen präpartalen Anstieg der freien Östrogene eher eine drastisch gesteigerte de novo-Synthese und eine daraus resultierende Überlastung der tendenziell sinkenden OST-Aktivität zugrunde liegt, als die Mobilisierung im fetalen Kompartiment sequestrierter konjugierter Östrogene.

Die OST-Aktivität wurde sowohl im Karunkelgewebe als auch im Trophoblasten nahezu ausschließlich im Zytosol nachgewiesen, was aufgrund der Zugehörigkeit der OST zur Gruppe der zytosolischen Sulfotransferasen zu erwarten war (FALANY und WILBORN, 1994). Hinweise auf eine nukleäre Lokalisation, wie bei WHITNALL et al. (1993) für die Nebennierenrinde des Meerschweinchens beschrieben, fanden sich nicht. Die OS-Aktivität war unabhängig von der Gewebeherkunft am höchsten in der Mitochondrien- und der Mikrosomenfraktion. Dies ist in Übereinstimmung mit der überwiegend mikrosomalen Lokalisation dieses Enzyms in der Plazenta des Menschen (SALIDO et al., 1990). Bezüglich der schwächeren OS-Aktivitäten in der Kernfraktion und im Zytosol fanden sich signifikant unterschiedliche Verteilungen zwischen Karunkel und Kotyledone. Während die OS-Aktivität in der kotyledonären höher war als in der karunkulären Kernfraktion, wies das Zytosol der Karunkeln im Vergleich zum Zytosol der Kotyledonen die höheren Enzymaktivitäten auf. Inwieweit es sich hier um tatsächliche Unterschiede in der Enzymverteilung, die möglicherweise aus unterschiedlichen biologischen Aufgaben der Östrogensulfatase in Karunkel und Kotyledone resultieren, oder um methodebedingte Artefakte bei der Aufbereitung unterschiedlicher Gewebsarten han-

delt, bedarf weiterer Untersuchungen. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, daß in der Humanplazenta (GNIOT-SZULZYCKA und DRYWA, 1994) sowie in der Rattenleber (ZHU et al., 1998) eine kerngebundene Isoform der Steroidsulfatase beschrieben wurde.

Die plazentare Östrogensulfotransferase des Rindes wies im eigenen in vitro-Testverfahren eine hohe Substratspezifität für Östrogene auf. Dehydroepiandrosteron, Testosteron und Pregnenolon wurden nicht sulfatiert. Identische Resultate wurden von ADAMS und LOW (1974) erzielt. Die Ergebnisse der Untersuchungen von HOLCENBERG und ROSEN (1965), nach denen in der Plazenta des Rindes auch Dehydroepiandrosteron in nennenswertem Umfang sulfokonjugiert wird, konnten somit nicht bestätigt werden.

### **2.5.2.3. Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase im Myometrium**

Da bei einem Teil der Tiere eine deutliche myometriale OST-Aktivität nachweisbar ist, kann das Myometrium neben der Plazenta ebenfalls als Ort der Sulfokonjugation plazentarer Östrogene angesehen werden, welche der Inaktivierung im Plazentom "entwischt" sind oder evtl. lokal im Myometrium auf dem "Sulfatase-Pathway" produziert wurden. Dieser Befund bestätigt weiterhin den östrogenresponsiven Charakter des Myometriums, da nur in östrogenresponsiven Zellen die Regulation der Konzentrationen biologisch aktiver Östrogene erforderlich erscheint. Die Funktion der myometrialen OST besteht daher vermutlich darin, die Östrogenwirkungen auf das Myometrium zu kontrollieren. Eine eindeutige Aussage hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen der OST-Aktivität im Myometrium und dem Graviditätsstadium bzw. der Probenentnahme in Längs- oder Ringmuskulatur kann aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht getroffen werden. Auffallend ist, daß in Homogenaten aus dem gesamten Myometrium mit  $29.1 \pm 13.6\%$  im Mittel höhere Umwandlungsraten gemessen wurden als in Präparationen aus Längsmuskulatur ( $12.4 \pm 10.1\%$ ) bzw. Kreismuskulatur ( $9.0 \pm 6.5\%$ ). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß ein erheblicher Anteil der im Gesamtmyometrium gemessenen OST-Aktivität der zwischen beiden Muskellagen lokalisierten Gefäß-/Bindegewebsschicht entstammte, welche bei der separaten Präparation der beiden Myometriumsanteile weitgehend entfernt wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur OS-Aktivität im Myometrium sprechen dafür, daß zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag auch im Myometrium eine OS vorhanden ist, diese jedoch sehr schwach exprimiert wird oder nur in einem geringen Teil der Zellen zu finden ist. Auch hier kann die Expression der OS in anderen Zellen als den glatten Muskelfasern nicht ausgeschlossen werden. Daher ist beim Rind die Rolle des Myometriums als Zielorgan konjugierter plazentarer Östrogene fraglich. Die Ergebnisse der eigenen Tastversuche stehen in klarem Widerspruch zu Untersuchungen am Myometrium gravider Schafe. Dort wurde in einem ähnlichen Versuchsansatz Estronsulfat fast vollständig hydrolysiert und in biologisch aktive Metaboliten umgewandelt (ROSSIER und PIERREPOINT, 1974).

#### 2.5.2.4. Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und -sulfatase im Corpus luteum

Sowohl in den zyklischen als auch in den Graviditätsgelbkörpern wurde eine hohe OS-Aktivität nachgewiesen, während die Sulfatierung von Estron nicht beobachtet wurde. Die biologische Bedeutung der lutealen OS ist unklar, sie besteht möglicherweise in der Hydrolyse sulfatierter Präkursoren der Progesteronbiosynthese wie z.B. Cholesterinsulfat. Die Expression einer hohen OS-Aktivität ist somit beim Rind kein besonderes Charakteristikum der Plazenta, sondern auch in anderen steroidogenen Organen nachweisbar.

#### 2.5.2.5. Interpretation der Ergebnisse aus funktioneller Sicht

Mit Ausnahme des unmittelbaren präpartalen Zeitraumes finden sich die plazentaren Steroide im maternalen Blutplasma überwiegend in sulfokonjugierter Form (HOFFMANN et al., 1997). Aufgrund der zwischen freien und konjugierten Steroiden allgemein unterschiedlichen Halbwertszeiten im Blutplasma (s. Abschnitt 2.2.1.2.) ist es fraglich, inwieweit das Verhältnis Estron:Estronsulfat im peripheren maternalen Blutplasma den Gegebenheiten am Syntheseort entspricht. Dennoch kann angesichts der hohen OST-Aktivitäten in den Kotyledonen davon ausgegangen werden, daß die plazentaren Östrogene den Trophoblasten mit Ausnahme der Spätgravidität bereits überwiegend in sulfokonjugierter Form verlassen. Aus funktioneller Sicht bieten sich zwei Interpretationsmöglichkeiten an:

a) Unter den Trophoblastzellen befinden sich östrogenresponsive Zellen, welche durch ihre OST-Expression vor einer (Über-)stimulation geschützt werden. In den Kotyledonen ist die OST immunhistologisch ausschließlich in den BNC nachweisbar (BROWN et al., 1987). Die Bedeutung von Östrogenen innerhalb des Trophoblasten könnte - wie aufgrund experimenteller Befunde bei anderen Spezies vermutet (PEPE und ALBRECHT, 1995) - in einer Beteiligung an lokalen Mechanismen zur Autoregulation der plazentaren Steroidsynthese liegen. Weiterhin könnte die OST-Expression in den BNC eine Rolle bei der Differenzierung der Trophoblastriesenzellen spielen, indem durch den Entzug der Östrogenwirkung in den reifenenden Trophoblastriesenzellen deren Proliferation unterdrückt wird. Zur Östrogenresponsivität des bovinen Trophoblasten liegen zur Zeit jedoch keine Informationen vor. Klassische Östrogenrezeptoren sind im Trophoblasten des Rindes immunhistologisch nicht nachweisbar (s. Kapitel IV).

b) Konjugierte Östrogene werden primär für den "Export" produziert und sind dazu vorgesehen, östrogenabhängige Prozesse in einem Teil der östrogenresponsiven Zellen des maternalen und evtl. auch des fetalen Organismus zu steuern. Das Spektrum derjenigen Zellen, welche während der Gravidität eine östrogene Stimulation erfahren sollen, ist vor dem Anstieg der freien Östrogenen neben der Expression des ER durch die Verfügbarkeit einer OS-Aktivität

limitiert. Durch den präpartalen Anstieg der freien Östrogene kann dieses Spektrum erweitert werden.

Die Bedeutung der OST im maternalen Teil der Plazentome könnte einerseits in einer zusätzlichen Barrierefunktion bestehen, wodurch freie Östrogene, welche der Inaktivierung in der Plazenta entwischten, vor dem weiteren Übertritt ins maternale Kompartiment inaktiviert werden. Andererseits könnte die OST auch in östrogenresponsiven Zellen der Karunkeln (s. Kapitel IV) der Limitation der östrogenen Stimulation dienen. Möglicherweise handelt es sich bei der in den Karunkeln gemessenen OST lediglich um einen Artefakt, welcher auf die Verunreinigung mit fetalen Gewebeanteilen - insbesondere ins Karunkelepithel eingewanderten Trophoblastriesenzellen - zurückzuführen ist, da die OST in den Plazentomen immunhistologisch nicht in Zellen maternalen Ursprungs nachzuweisen ist (BROWN et al., 1987).

Eine mögliche Bedeutung der hohen karunkulären OS-Aktivitäten könnte in der Aktivierung konjugierter Östrogene („Sulfatase Pathway“) aus dem Trophoblasten bestehen, da - wie die in Kapitel IV durchgeführten Untersuchungen ergaben - sowohl Karunkelepithel- als auch Karunkelstromazellen aufgrund der immunhistologisch nachweisbaren Expression von Östrogenrezeptoren als Zielzellen plazentarer Östrogene in Frage kommen. Weiterhin erscheint eine Bedeutung der karunkulären OS bei der Erschließung maternaler konjugierter Steroide wie Cholesterin- bzw. Pregnenolonsulfat als Präkursoren für die plazentare Steroidsynthese möglich. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß P450<sub>scc</sub> immunhistologisch nicht nur in den einkernigen Trophoblastzellen, sondern auch in den Karunkelepithelzellen nachweisbar ist (BEN-DAVID und SHEMESH, 1990). Eine analoge Bedeutung kann auch für die vergleichsweise niedrigere OS-Aktivität der Kotyledonen im Hinblick auf die Verwertung sulfokonjugierter Steroide aus dem fetalen Kompartiment postuliert werden.

Eine abschließende funktionelle Bewertung der in diesem Kapitel hinsichtlich der OST und OS erhaltenen Ergebnisse ist aufgrund der sehr lückenhaften Informationen über die Expression steroidumwandelnder Enzyme auf zellulärer Ebene kaum möglich. Bisherige Untersuchungen zeichnen zudem ein teilweise widersprüchliches Bild. So wird die Produktion von Estron, dem quantitativ bei weitem überwiegenden plazentaren Östrogen (HOFFMANN et al., 1997; s. Kapitel III) aufgrund von Zellkulturexperimenten überwiegend den uninukleären Trophoblastzellen zugeschrieben (MATAMOROS et al., 1994), während die OST immunhistologisch ausschließlich in den Trophoblastriesenzellen (BROWN et al., 1987) nachgewiesen wurde. Aufgrund dieser Konstellation wäre jedoch zu erwarten, daß ein Großteil der plazentaren Östrogene über einen weiten Zeitraum der Gravidität vorwiegend in freier Form in das maternale Kompartiment übertritt. Dies Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit umfassender Untersuchungen zur Lokalisation steroidumwandelnder Enzyme auf zellulärer Ebene als Voraussetzung für das Verständnis funktioneller Zusammenhänge in der plazentaren Steroidbiosynthese.

Aufgrund der Tatsache, daß die Aktivitäten von OST und OS gemeinsam in den Plazentomen des Rindes nachweisbar sind und somit Synthese und Inaktivierung biologisch aktiver freier Östrogene sowie die Aktivierung rezeptorinaktiver konjugierter Östrogene in unmittelbarer Nachbarschaft ablaufen können, stellt sich die Frage nach einer möglichen Bedeutung plazentarer Steroide als lokale Mediatoren. Diesem Aspekt soll insbesondere in Kapitel IV nachgegangen werden.

Zusammenfassend ergaben die in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen, daß die Aktivitäten von OST und OS sowohl in Kotyledonen- als auch in Karunkelhomogenaten nachweisbar waren, wobei signifikant höhere OST-Aktivitäten in den fetalen, signifikant höhere OS-Aktivitäten in den maternalen Anteilen der Plazentome gefunden wurden. Bezogen auf die Gewebemenge waren die Aktivitäten beider Enzyme über die zweite Graviditätshälfte hindurch konstant. Unter der Geburt wurde in Kotyledonen und Karunkeln ein signifikanter Abfall der OS-, nicht jedoch der OST-Aktivität beobachtet. Die eigenen Befunde sprechen gegen eine maßgebliche Beteiligung der OS bei der Verschiebung des Verhältnisses freie/konjugierte Östrogene zugunsten der ersteren unmittelbar vor der Geburt.

## 2.6. Literaturverzeichnis

- ADAMS JB (1991). Enzymic synthesis of steroid sulphates XVII. On the structure of bovine estrogen sulphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 282-288
- ADAMS JB, LOW J (1974). Enzymic synthesis of steroid sulphates. X. Isolation of oestrogen sulphotransferase from bovine placenta and comparison of its properties with adrenal oestrogen sulphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 370, 189-196
- BAKER JR, WARD WR (1985). Ichthyosis in domestic animals: a review of the literature and a case report. *Br. Vet. J.* 141, 2-8
- BEN-DAVID E, SHEMESH M (1990). Ultrastructural localization of cytochrome P-450<sub>scc</sub> in the bovine placentome using a protein A gold technique. *Biol. Reprod.* 42, 131-138
- BERNIER F, LOPEZ-SOLACHE I, LABRIE F, LUU-THE V (1994a). Cloning and expression of cDNA encoding human placental estrogen sulfotransferase. *Mol. Cell Endocrinol.* 99, R11-R15
- BERNIER F, LEBLANC G, LABRIE F, LUU-THE V (1994b). Structure of human estrogen and aryl sulfotransferase gene. Two mRNA species issued from a single gene. *J. Biol. Chem.* 269, 28200-28205
- BONIFAS JM, MORLEY BJ, OAKEY RE, KAN YW, EPSTEIN EH (1987). Cloning of a cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X chromosome-linked ichthyosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9248-9251
- BORTHWICK EB, VOICE MW, BURCHELL A, COUGHTRIE MW (1995). Effects of hypophysectomy and thyroxine on the expression of hepatic oestrogen, hydroxysteroid and phenol sulfotransferases. *Biochem. Pharmacol.* 49, 1381-1386
- BOSTROM H, WENGLE B (1967). Studies on ester sulphates. 23. Distribution of phenol and steroid sulphokinase in adult human tissues. *Acta Endocrinol.* 56, 691-704
- BOUHAMIDI R, GAILLARD JL, SILBERZAHN P, MARTIN B (1992). Binding of estrone-3-sulfates to stallion plasma and equine serum albumin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 345-349
- BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- BROOKS SC, BATELLI MG, COROMBOS JD (1987). Endocrine steroid sulfotransferases: porcine endometrial estrogen sulfotransferase. *J. Steroid Biochem.* 26, 285-290
- BROWN JM, ADAMS JB, BEATTIE CW (1987). Production and characterization of a monoclonal antibody to bovine estrogen sulfotransferase. *Hybridoma* 6, 413-422
- BURNS GRJ (1983). Purification and partial characterization of arylsulfatase C from human placental microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 759, 199-204
- CHALLIS JRG, KIM CK, NAFTOLIN F, JUDD HL, YEN SSC, BENIRSCHKE K (1974). The concentrations of androgens, oestrogens, progesterone and luteinizing hormone in the serum of foetal calves throughout the course of gestation. *J. Endocr.* 60, 107-115
- CHANG PL, VAREY PA, ROSA NE, AMEEN M, DAVIDSON RG (1986). Association of steroid sulfatase with one of the arylsulfatase C isoenzymes in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 14443-14447
- CHANG PL, MUELLER OT, LAFRENIE RM, VAREY PA, ROSA NE, DAVIDSON RG, HENRY WM, SHOWS TB (1990). The human arylsulfatase-C isoenzymes: two distinct genes that escape from X inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 729-737
- CHIBBAR R, MITCHELL BF (1990). Steroid sulfohydrolase in human chorion and decidua: studies using pregnenolone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate as substrate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 1693-1701

- CLARKE C, THORBURN P, McDONALD D, ADAMS JB (1982a). Enzymic synthesis of steroid sulphates. XV. Structural domains of oestrogen sulphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 707, 28-37
- CLARKE CL, ADAMS JB, WREN BG (1982b). Induction of estrogen sulfotransferase in the human endometrium by progesterone in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55, 70-75
- DARNAUDERY M, KOEHL M, PALLARES M, LE MOAL M, MAYO W (1998). The neurosteroid pregnenolone sulfate increases cortical acetylcholine release: a microdialysis study in freely moving rats. *J. Neurochem.* 71, 2018-2022
- DIBBELT L, KUSS E (1986). Human placental steryl-sulfatase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 1223-1229
- DICZFALUSY E, PION R, SCHWERS J, (1965). Steroid biogenesis and metabolism in the human fetoplacental unit ad midpregnancy. *Archives d Anatomie microscopique* 54, 67-84
- DICZFALUSY E (1969). Steroid metabolism in the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 61, 649-664
- DIXON WJ (1993). BMDP statistical software manual. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 1993
- DODGSON und ROSE (1975). Sulfohydrolases. In: *Metabolic Pathways*; Hrsg.: D.M. Greenberg; 3. Ausgabe, Vol. 7, Academic Press, New York, pp. 359-431
- DOUALLA-BELL F, BONNEAU MJ, LABRIE F, FORTIER MA (1995). Differential effects of a steroidal antiestrogen, EM-139, on prostaglandin and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in the circular and longitudinal layers of bovine myometrium. *Biol. Reprod.* 52, 1358-1363
- DWYER RJ, ROBERTSON HA (1980). Oestrogen sulphatase and sulphotransferase activities in the endometrium of the sow and ewe during pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 60, 187-191
- ELIAS PM, WILLIAMS ML, MALONEY ME, BONIFAS JA, BROWN BE, GRAYSON S, EPSTEIN EH (1984). Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* 74, 1414-1421
- EPSTEIN EH, LEVENTHAL ME (1981). Steroid sulfatase of human leucocytes and epidermis and the diagnosis of recessive X-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* 67, 1257-1262
- FALANY CN (1997). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.* 11, 206-216
- FALANY JL, FALANY CN (1996a). Expression of cytosolic sulfotransferases in normal mammary epithelial cells and breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 56, 1551-1555
- FALANY JL, FALANY CN (1996b). Regulation of estrogen sulfotransferase in human endometrial adenocarcinoma cells by progesterone. *Endocrinology* 137, 1395-1401
- FALANY JL, FALANY CN (1997). Regulation of estrogen activity by sulfation in human MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Res.* 9, 589-596
- FALANY CN, WILBORN TW (1994). Biochemistry of cytosolic sulfotransferases involved in bioactivation. *Adv. Pharmacol.* 27, 301-329
- FALANY JL, KRASNYKH V, MIKHEEVA G, FALANY CN (1995a). Isolation and expression of an isoform of rat estrogen sulfotransferase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 35-44
- FALANY CN, KRASNYKH V, FALANY JL (1995b). Bacterial expression and characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 529-539
- FALANY JL, AZZIZ R, FALANY CN (1998). Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium. *Chem. Biol. Interact.* 109, 329-339
- FLOOD JF, MORLEY JE, ROBERTS E (1995). Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10806-10810

- FLUHARTY AL, STEVENS RL, FUNG D, PEAK S, KIHARA H (1975). Uridine diphospho-N-acetylgalactosamine-4-sulfate sulfohydrolase activity of human arylsulfatase B and its deficiency in the Maroteaux-Lamy syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 955-962
- GLUTEK SM, HOBKIRK R (1990). Estrogen sulfatase and steroid sulfatase activities in intrauterine tissues of the pregnant guinea pig. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 37, 707-715
- GNIOT-SZULZYCKA J, DRYWA A (1994). A "soluble" form of sterol sulphate sulphonydrolase from cell nuclei of human placenta tissue – examinations with oestrone sulphate as substrate. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49, 195-201
- GROSSO DS, WAY DL (1984). Characterization of cytosolic estrogen sulfotransferase from RL95-2 endometrial cancer cells. *J. Clin. Endocr. Metab.* 59, 829-834
- HATA H, HOLINKA CF, PAHUJA SL, HOCHBERG RB, KURAMOTO H, GURPIDE E (1987). Estradiol metabolism in Ishikawa endometrial cancer cells. *J. Steroid Biochem.* 26, 699-704
- HÄHNEL R, TWADDLE E, RATAJCZAK T (1973). The specificity of the estrogen receptor of human uterus. *J. Steroid Biochem.* 4, 21-31
- HERNANDEZ JS, WATSON RW, WOOD TC, WEINSHILBOUM RM (1992). Sulfation of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in human liver. Catalysis by thermostable phenol sulfotransferase and by dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Drug Metab. Dispos.* 20, 413-422
- HOBKIRK R, CARDY CA, SAIDI F, KENNEDY TG, GIRARD LR (1983). Development and characteristics of an oestrogen sulphotransferase in placenta and uterus of the pregnant mouse. Comparison between mouse and rat. *Biochem. J.* 216, 451-457
- HOFFMANN B (1983). Untersuchungen zur Steroidhormonsynthese in der Plazenta des Rindes. *Wien. tierärztl. Mschr.* 70, 224-228
- HOFFMANN B, WAGNER W, GIMENEZ T (1976). Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. *Biol. Reprod.* 15, 236-133
- HOFFMANN B, HÖVELER R, NOHR B, HASAN SH (1994). Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 185-189
- HOFFMANN B, GENTZ F, FAILLING K (1996). Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG-concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 717-723
- HOFFMANN B, GOES DE PINHO T, SCHULER G (1997). Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105, 296-303
- HOLCENBERG JS, ROSEN SW (1965). Enzymic sulfation of steroids by bovine tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 110, 551-557
- HONDOH T, YOKOYAMA K, SUZUKI T, HIRATO K, KADOFUKU T, SAITOH H, YANAIHARA T (1994). Purification and properties of steroid sulfotransferase in human fetal liver. *Endocrinol. J. (Suppl.)*, 77-84
- IWAMORI M, MOSER HW, KISHIMOTO Y (1976). Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from rat liver: characterization of estrone sulfatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 199-208
- JANSZEN BPM, BEVERS MM, VAN TOL HTM, DIELEMAN SJ, VAN DER WEIJDEN GC, TAVERNE MAM (1995). Oestrogen sulphatase activity in endometrium and foetal membranes of late gestational and parturient cows. *Anim. Reprod. Sci.* 37, 251-256
- JAY B, BLACH RK, WELLS RS (1968). Ocular manifestations of ichthyosis. *Br. J. Ophthalmol.* 52, 217-226

- KAWANO J, KOTANI T, OHTAKI S, MINAMINO N, MATSUO H, OINUMA T, AIKAWA E (1989). Characterization of rat and human steroid sulfatases. *Biochim. Biophys. Acta* 997, 199-205
- KIESENHOFER E (1987). In vitro-Untersuchungen über die Aktivität von Aromatasen, Sulfatase und Sulfotransferasen in der Plazenta des Rindes sub partu. Diss. med. vet., Veterinärmedizinische Universität Wien
- KLAASSEN CD, LIU L, DUNN RT (1998). Regulation of sulfotransferase mRNA expression in male and female rats of various ages. *Chem. Biol. Interact.* 109, 299-313
- KUSS E (1994). The fetoplacental unit of primates. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 135-165
- LYKKESFELDT G, HOYER H, LYKKESFELDT AE, SKAKKEBAEK NE (1983). Steroid sulphatase deficiency associated with testis cancer. *Lancet* 2 (8365-66), 1456
- LYKKESFELDT G, HOYER H, IBSEN HH, BRANDRUP F (1985a). Steroid sulphatase deficiency disease. *Clin. Genet.* 28, 231-237
- LYKKESFELDT G, MÜLLER J, SKAKKEBAEK NE, BRUUN E, LYKKESFELDT AE (1985b). Absence of testicular steroid sulfatase activity in a boy with recessive X-linked ichthyosis and testicular maldescent. *Eur. J. Pediatr.* 144, 273-274
- MATAMOROS RA, CAAMANO L, LAMB SV, REIMERS TJ (1994). Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biol. Reprod.* 51, 486-492
- MATTIOLI M, GAIANI R, BONO G, CHIESA F (1984). Estrone to estrone sulfate conversion and viceversa in bovine placenta. *Archivio Veterinario Italiano* 35, 22-26
- MEHL E, JATZKEWITZ H (1968). Cerebroside-3-sulfate as a physiological substrate of arylsulfatase A. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 619-627
- MEYERS SA, LOZON MM, COROMBOS JD, SAUNDERS DE, HUNTER K, CHRISTENSEN C, BROOKS SC (1983). Induction of porcine uterine estrogen sulfotransferase activity by progesterone. *Biol. Reprod.* 28, 1119-1128
- MÖSTL E, KIESENHOFER E, BAMBERG E (1986). Östrogenproduktion in der Rinderplazenta in vitro. *Zuchthygiene* 21, 159
- MOORE SS, THOMPSON EOP, NASH AR (1988). Estrogen sulfotransferase: isolation of a high specific activity species from bovine placenta. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 333-341
- MUNROE DG, CHANG PL (1987). Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isoenzymes and steroid sulfatase. *Am. J. Hum. Genet.* 40, 102-114
- NASH AR, GLENN WK, MOORE SS, KERR J, THOMPSON AR, THOMPSON EOP (1988). Oestrogen sulfotransferase: molecular cloning and sequencing of cDNA for the bovine placental enzyme. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 507-516
- NOEL H, BEAUREGARD G, POTIER M, BLEAU G, CHAPDELAIN A, ROBERTS KD (1983). The target sizes of the in situ and solubilized forms of the human placental steroid sulfatase as measured by radiation inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 758, 88-90
- PASQUALINI JR, SCHATZ B, VARIN C, NGUYEN BL (1992). Recent data on estrogen sulfatases and sulfotransferase activities in human breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 323-329
- PARENTI G, MERONI G, BALLABIO A (1997). The sulfatase gene family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 386-391
- PEPE GJ, ALBRECHT ED (1995). Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr. Rev.* 16 (5), 608-648
- PUCHE RC, NES WR (1962). Binding of dehydroepiandrosterone sulfate to serum albumin. *Endocrinology* 70, 857-863

- PUROHIT A, DAUVOIS S, PARKER M, POTTER BVL, WILLIAMS GJ, REED MJ (1995). The hydrolysis of oestrone sulphate and dehydroepiandrosterone sulphate by human steroid sulphatase expressed in transfected COS-1 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50, 101-104
- RICHERT-HANAUER U, FAILING K, HOFFMANN B, MÖLLMANN U (1988). Untersuchungen zum Verlauf der Cortisolwerte im Blut beim Schaf während des Zyklus und der Trächtigkeit. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 95, 374-376
- ROBERTSON HA, KING GJ (1979). Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 55, 463-470
- ROSSIER G, PIEREPOINT CG (1974). Oestrogen metabolism in sheep myometrium. *J. Reprod. Fert.* 37, 43-49
- RUOFF BM, DANIEL WL (1991). Comparative biochemistry of mammalian arylsulfatase C and steroid sulfatase. *Comp. Biochem. Biophys.* 98B, 313-322
- SACHS L (1982). Applied statistics. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin
- SAITOH H, HIRATO K, TAHARA R, OGAWA K, NOGUCHI Y, YANAIHARA T, NAKAYAMA T (1984). Enhancement of human amniotic phospholipase A2 activity by steroid-sulphate derived from the foeto-placental unit. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 107, 420-424
- SALIDO EC, YEN PH, BARAJAS L, SHAPIRO LJ (1990). Steroid sulfatase expression in human placenta: immunocytochemistry and in situ hybridization study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 1564-1567
- SANTNER SJ, FEIL PD, SANTEN RJ (1984). In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 29-33
- SAUNDERS DE, LOZON MM, COROMBOS JD, BROOKS SC (1989). Role of porcine endometrial estrogen sulfotransferase in progesterone mediated downregulation of estrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* 32, 749-757
- SCHAMS D, HOFFMANN B, FISCHER S, MÄRZ E, KARG H (1972). Simultaneous determination of LH and progesterone in peripheral bovine blood during pregnancy, normal and corticoid-induced parturition and the post partum period. *J. Reprod. Fert.* 29, 37-48
- SCHMITT B (1994). Charakterisierung der Umsetzung von Androstendion in Östrogene durch die Plazenta beim Rind. *Diss. med. vet., Giessen*
- SCHULER G, HARTUNG F, HOFFMANN B (1994). Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 169-174
- SHANKARAN R, AMEEN M, DANIEL W, DAVIDSON RG, CHANG PL (1991). Characterization of arylsulfatase C isoenzymes from human liver and placenta. *Biochim. Biophys. Acta* 1078, 251-257
- SHAPIRO LJ, MOHANDAS T, WEISS R, ROMEO G (1979). Non-inactivation of an x-chromosome locus in man. *Science* 204, 1224-1226
- SIMARD JP, AMEEN M, CHANG PL (1985). Biochemical characterization of arylsulfatase-C isoenzymes in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 1388-1394
- SONG W-C, MOORE R, McLACHLAN JA, NEGISHI M (1995). Molecular characterization of a testis-specific estrogen sulfotransferase and aberrant liver expression in obese and diabetogenic C57BL/KsJ-db/db mice. *Endocrinology* 136, 2477-2484
- SONG W-C, QUIAN Y, SUN X, NEGISHI M (1997). Cellular localization and regulation of expression of testicular estrogen sulfotransferase. *Endocrinology* 138, 5006-5012
- STEIN C, HILLE A, SEIDEL J, RIJNBOUT S, WAHEED A, SCHMIFT B, GEUZE H, VON FIGURA K (1989). Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 13865-13872
- STROTT CA (1996). Steroid sulfotransferases. *Endocr. Rev.* 17, 670-697

- TAYLOR NF (1982). Review: placental sulphatase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 5, 164-174
- TSENG L, LIU HC (1981). Stimulation of arylsulfotransferase activity by progestins in human endometrium in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 418-421
- TSENG L, LEE LY, MAZELLA J (1985). Estrogen sulfotransferase in the human placenta. *J. Steroid Biochem.* 22, 611-615
- WANG DY, BULBROOK RD, ELLIS F, COOMBS MM (1967a). Metabolic clearance rates of pregnenolone, 17-acetoxypregnenolone and their sulphate esters in man and in rabbit. *J. Endocrinol.* 38, 395-403
- WANG DY, BULBROOK RD, SNEDDON A, HAMILTON T (1967b). The metabolic clearance rates of dehydroepiandrosterone, testosterone and their sulphate esters in man, rat and rabbit. *J. Endocrinol.* 38, 307-318
- WEBB EC (1992). *Enzyme nomenclature*. Academic Press, New York pp 299-303
- WEBSTER D, FRANCE JT, SHAPIRO LJ, WEISS R (1978). X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. *Lancet* 14, 70-72
- WEINSHILBOUM RM, OTTERNESS DM, AKSOY IA, WOOD TC, HER C, RAFTOGIANIS RB (1997). Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J.* 11, 3-14
- WEISS E, TEIFKE JP (1999). Haut. In: *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere* (Hrsg.: E. Dahme, E. Weiss), 5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 484-561
- WENGLE B (1966). Distribution of some steroid sulfokinases in foetal human tissues. *Acta Endocrinol.* 52, 607-618
- WHITNALL MH, DRISCOLL WJ, LEE YC, STROTT CA (1993). Estrogen and hydroxysteroid sulfotransferases in guinea pig adrenal cortex: cellular and subcellular distributions. *Endocrinology* 133, 2284-2291
- WILLEMSSEN R, KROOS M, HOOGEVEEN AT, VAN DONGEN JM, PARENTI G, VAN DER LOOS CM, REUSER AJ (1988). Ultrastructural localization of steroid sulphatase in cultured human fibroblasts by immunocytochemistry: a comparative study with lysosomal enzymes and the mannose 6-phosphate receptor. *Histochem. J.* 20, 41-51
- WILLIAMS K, HENRY D, LAYNE DS, COLLINS DC (1968). Metabolism of 4-<sup>14</sup>C-17 $\beta$ -estradiol-17 $\alpha$  and 16-<sup>14</sup>C-17 $\alpha$ <sup>3</sup>H-Estradiol-17 $\beta$  by the rabbit. *Endocrinology* 83, 113-117
- YANG Q, CHRISTENSEN MJ (1998). Selenium regulates gene expression for estrogen sulfotransferase and alpha 2U-globulin in rat liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64, 239-244
- ZHU BT, FU JH, XU S, KAUFFMAN FC, CONNEY AH (1998). Different biochemical properties of nuclear and microsomal estrone-3-sulfatases: evidence for the presence of a nuclear isoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 45-49

**KAPITEL III**

**BESTIMMUNGEN ENDOGENER STEROIDKONZENTRATIONEN  
IN KOTYLEDONEN- UND KARUNKELGEWEBE**

## INHALTSVERZEICHNIS

3.1.	Untersuchungsziele.....	141
3.2.	Material und Methoden.....	141
3.2.1.	Progesteronbestimmung .....	141
3.2.2.	Bestimmung von Estradiol-17 $\alpha$ , Estradiol-17 $\beta$ und Estron mittels HPLC-RIA.....	142
3.2.2.1.	Enzymatische Hydrolyse, Extraktion und chromatographische Vorreinigung des Probenmaterials .....	142
3.2.2.2.	HPLC-Trennung .....	142
3.2.2.3.	Radioimmunologische Bestimmungen der Östrogenkonzentrationen .....	143
3.2.2.4.	Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer .....	144
3.2.2.4.1.	Chemikalien .....	144
3.2.2.4.2.	<sup>3</sup> H-markierte Steroide .....	144
3.2.2.4.3.	Materialien und Geräte .....	144
3.2.2.4.4.	Puffer .....	145
3.3.	Ergebnisse .....	146
3.3.1.	Progesteronkonzentrationen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe .....	146
3.3.2.	Ergebnisse der Östrogenbestimmungen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe .....	146
3.4.	Diskussion .....	149
3.5.	Literatur .....	150

### 3.1. Untersuchungsziele

Im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung der plazentaren Östrogene und des plazentaren Progesterons als auto- bzw. parakrine Faktoren mit Wirkung in den Plazentomen selbst ist die lokale Verfügbarkeit dieser Steroide von besonderer Bedeutung. Periphere maternale Plasmaspiegel lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die in den Plazentomen vorhandenen Steroidkonzentrationen und biologischen Aktivitäten zu, da sie möglicherweise starken Veränderungen durch Verdünnung, Metabolisierungen und Ausscheidungsprozesse unterworfen sind und auch durch das plazentare Wachstum beeinflusst werden. So sind beispielsweise im Fall des Progesterons durch die Überlagerung mit dem bei weitem überwiegenden lutealen Progesteron aus den maternalen Plasmaspiegeln direkt keine Rückschlüsse auf die plazentare Produktion möglich. Trotz einer Anzahl von Untersuchungen zu Östrogen- und Progesteronkonzentrationen im fetalen bzw. maternalen Kreislauf (s. Kapitel I, Abschnitt 1.1.5.) lagen zu Beginn der eigenen Untersuchungen in der zur Verfügung stehenden Literatur keine Informationen über Östrogen- bzw. Progesteronkonzentrationen in Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe vor. Ziel der in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen war es daher, entsprechende Daten für die eigenen Versuchstiere, welchen auch das in den Kapiteln II und IV-VI verwendete Probenmaterial entstammte, zu erhalten.

### 3.2. Material und Methoden

Für die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen wurden als Probenmaterial die in Kapitel II beschriebenen Homogenate aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe von 150, 220, 240 und 270 Tage graviden Rindern verwendet, wobei jedoch nur von einem Teil der Versuchstiere Probenmaterial für die im folgenden beschriebenen Bestimmungen verfügbar war. Die Probenentnahme sowie die Präparation des Gewebes und Herstellung der Homogenate wurden in den Abschnitten 2.3.1., 2.3.2. und 2.3.3. dargestellt.

#### 3.2.1. Progesteronbestimmung

Zur Progesteronbestimmung in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe wurden jeweils 0.1 ml der Gewebekomponente im Doppelansatz zweimal mit je 2 ml Hexan extrahiert. Die gepoolten Extrakte der beiden Extraktionsschritte wurden im Vortex-Evaporator (Haake-Buchler, Saddle Brook, USA) niedertrocknet und in 0.1 ml BSA-Phosphatpuffer zurückgelöst. Die radioimmunologische Bestimmung wurde nach dem von HOFFMANN et al. (1973) beschriebenen Gleichgewichtstest durchgeführt.

### 3.2.2. Bestimmung von Estradiol-17 $\alpha$ , Estradiol-17 $\beta$ und Estron mittels HPLC-RIA

#### 3.2.2.1. Enzymatische Hydrolyse, Extraktion und chromatographische Vorreinigung des Probenmaterials

Die Bestimmung von Estradiol-17 $\alpha$ , Estradiol-17 $\beta$  und Estron erfolgte mittels der von HOFFMANN et al. (1997) für die Messung freier bzw. konjugierter Östrogene im Blutplasma beschriebenen HPLC-RIA-Verfahren. In den eigenen Untersuchungen wurden freie und konjugierte Formen gemeinsam erfaßt. Zur enzymatischen Hydrolyse der konjugierten Östrogene wurden jeweils 0.4 ml der Gewebehomogenate zunächst mit 150  $\mu$ l 625 mM Azetatpuffer pH 4.8 und 20  $\mu$ l der mit 0.15 M NaCl-Lösung 1:4 verdünnten  $\beta$ -Glucuronidase-Arylsulfatase-Präparation aus *Helix pomatia*<sup>1</sup> (Serva, Heidelberg) versetzt. Die Proben wurden dann im Wärmeschüttelbad (Köttermann, Ütze/Hänigsen) bei 37°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wie in Kapitel I, Abschnitt 1.2.2.3.4. beschrieben extrahiert, niedergetrocknet und rückgelöst. In Abweichung zu dem dort dargestellten Verfahren wurden die niedergetrockneten Extrakte in 35%igem anstelle von 40%igem Methanol rückgelöst, da sonst bei der anschließenden, in Abschnitt 1.2.2.3.5. beschriebenen chromatographischen Vorreinigung (Baker spe-10\* Column Processing System, Baker spe-Trennsäulen C<sub>18</sub> - Baker, Groß Gerau) der Proben ein Teil der Analyten bereits beim Auftragen eluierte. Nach Abschluß der chromatographischen Vorreinigung wurden die Proben in 0.22 ml 20%igem Acetonitril (v/v) aufgenommen.

#### 3.2.2.2. HPLC-Trennung

Ziel der den radioimmunologischen Bestimmungen vorgeschalteten HPLC-Trennung war es, durch die Überwindung der kreuzreaktiven Eigenschaften der Östrogen-Antisera die Spezifität der Messung zu sichern. Aus jeder der in 220  $\mu$ l 20%igem Acetonitril (v/v) vorliegenden Probe wurden 2 x 100 $\mu$ l aufgetrennt. Zur HPLC-Trennung wurde die in Kapitel I Abschnitt 1.2.2.3.6. beschriebene Anlage verwendet. Vor jeder Chromatographie wurde die Anlage 10 Minuten lang mit einer 30%igen wäßrigen Acetonitril-Lösung (v/v) bei einer Flußrate von 0.5 ml/min äquilibriert. Nach der Probeninjektion wurden die für die Äquilibrierung genannten Bedingungen über die 46-minütige Dauer der Chromatographie beibehalten. Danach wurde zur Reinigung der stationären Phase der Acetonitril-Anteil der mobilen Phase für 10 Minuten auf 100% erhöht und anschließend das Chromatographiesystem für die nächste Trennung äquilibriert. Durch die Chromatographie <sup>3</sup>H-markierter Standardsubstanzen wurden für Estradiol-17 $\beta$ , Estradiol-17 $\alpha$  und Estron die jeweiligen Retentionszeiten bestimmt, anhand derer die Einstellung des Fraktionssammlers erfolgte (s. Abbildung 1). Die den einzelnen Östrogenen entsprechenden Eluate wurden jeweils als komplette Peaks aufgefangen, im Vaku-

---

<sup>1</sup> entspricht 0.1 Standardeinheiten Arylsulfatase pro Ansatz

umtrockenschrank (Haereus, Hanau) bei 40°C unter Vakuum niedertrocknet und nach dem Rücklösen in 200 µl BSA-Phosphatpuffer der radioimmunologischen Bestimmung zugeführt, wobei 100 µl der aufbereiteten Proben in die radioimmunologischen Testverfahren eingesetzt wurden.

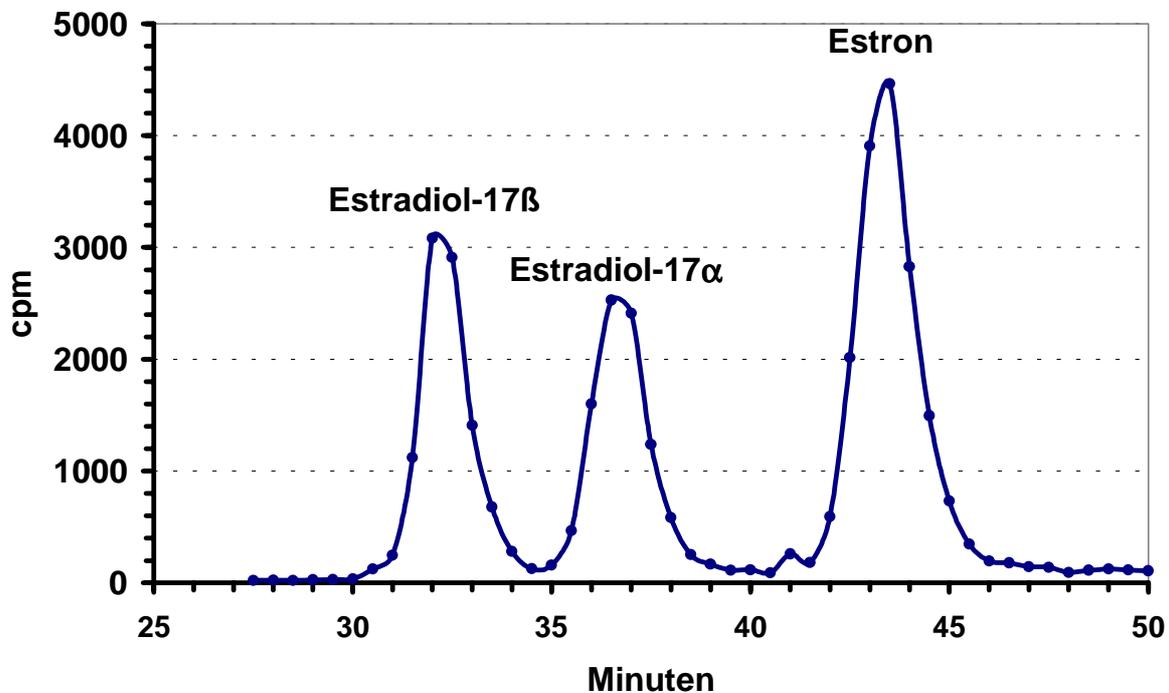


Abbildung 1: Trennung von Östrogenen mittels HPLC vor der radioimmunologischen Bestimmung - Chromatographie <sup>3</sup>H-markierter Standardsubstanzen (Eichchromatogramm).

Vorsäule: LiChrospher RP18, 30 mm x 3 mm (E. Merck, Darmstadt)  
 Säule: LiChrosorb RP18, 150 mm x 3 mm (E. Merck, Darmstadt)  
 Mobile Phase: Acetonitril/H<sub>2</sub>O = 3:7 (v/v)  
 Flußrate: 0.5 ml/min.  
 Temperatur: 40°C

### 3.2.2.3. Radioimmunologische Bestimmungen der Östrogenkonzentrationen

Estradiol-17α wurde wie bei HOFFMANN et al. (1997) beschrieben mit einem gegen 17β-Estradiol-17-Hemisuccinat-BSA gerichteten Antiserum bestimmt. Der Intra- bzw. Interassay-Variationskoeffizient betrug 6.5% bzw. 6.3%. Estradiol-17β wurde nach dem bei HOFFMANN et al. (1992) beschriebenen Sequenztest mit anschließender Trennung im Ungleichgewicht gemessen. Der Intra- bzw. Interassay-Variationskoeffizient lag bei 7.7% bzw. 13.7%. Die Bestimmung von Estron erfolgte nach dem von HOFFMANN et al. (1996) beschriebenen Verfahren. Der Intra- bzw. Interassay-Variationskoeffizient betrug 5.0% bzw. 11.7%. Aus den beiden aus jeder Originalprobe hervorgegangenen Messwerten (s.o.) wurde der Mittelwert gebildet.

### 3.2.2.4. Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer

#### 3.2.2.4.1. Chemikalien

##### **Mallinckrodt Baker B.V., 7412 VA Deventer, Holland**

Acetonitril HPLC Ultra Gradient Grade

##### **E. Merck, D-64271 Darmstadt**

Hexan p.a.

Methanol für die Chromatographie

Toluol p.a.

Wasser für die Chromatographie

##### **Serva Feinbiochemica GmbH&Co., D-69155 Heidelberg**

Beta-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*

#### 3.2.2.4.2. $^3\text{H}$ -markierte Steroide

##### **Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg**

(2,4,6,7- $^3\text{H}$ )-Estron

##### **DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH, D-63383 Dreieich**

(6,7- $^3\text{H}$ )-Estron

(2,4,6,7- $^3\text{H}$ )-Estradiol

(1,2,6,7- $^3\text{H}$ )-Progesteron

(6,7- $^3\text{H}$ )-Estradiol-17 $\alpha$ : Eigene Synthese nach dem von WILLIAMS et al. (1968) beschriebenen Verfahren durch Inkubation von (6,7- $^3\text{H}$ )-Estron mit Rindererythrozyten, wobei die Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estradiol-17 $\alpha$  durch die 17 $\alpha$ -Reduktase der Rindererythrozyten katalysiert wird. Die Reinigung des gebildeten  $^3\text{H}$ -Estradiol-17 $\alpha$  erfolgte nach Extraktion mittels Toluol und chromatographischer Vorreinigung (s. Abschnitt 3.2.2.1) nach dem in Abschnitt 3.2.2.2. beschriebenen HPLC-Verfahren.

#### 3.2.2.4.3. Materialien und Geräte

##### **Baker Inc., D-64521 Groß-Gerau**

Baker spe-10\* Column Processing System

Bakerbond spe-Trennsäulen C<sub>18</sub>, 1 ml

##### **Haake Buchler, Saddle Brook, N.J., USA**

HBI Vortex-Evaporator

##### **Haereus, D-63450 Hanau**

Vakuumtrockenschrank

**Köttermann GmbH&Co. KG, D-31311 Uetze/Hänigsen**

Wärmeschüttelbad Typ 3047

**E. Merck, D-64271 Darmstadt**

LiChrospher RP18 Glaskartuschen 30-3

LiChrosorb RP18 Glaskartuschen 150-3

**3.2.2.4.4. Puffer****625 mM Azetatpuffer pH 4.8 (Hydrolysepuffer)**1N CH<sub>3</sub>COOH 500 ml

1N NaOH 300 ml

**Phosphatpuffer pH 7.2**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.357 gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.686 gNaN<sub>3</sub> 0.325 g

Aqua dest. ad 1l

**BSA-Phosphatpuffer**

1 l Phosphatpuffer pH 7.2 + 1 g BSA

### 3.3. Ergebnisse

#### 3.3.1. Progesteronkonzentrationen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe

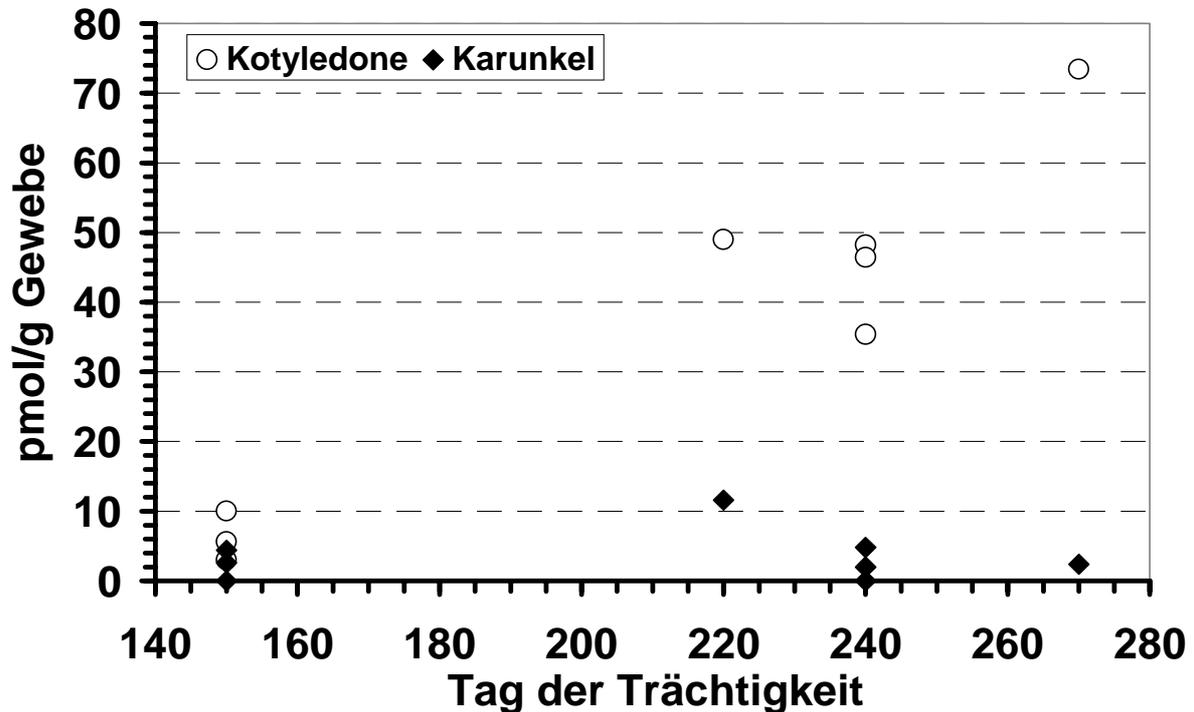


Abbildung 2: Ergebnisse der Progesteronbestimmungen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Verteilung der Einzelwerte).

Die Ergebnisse der Progesteronbestimmungen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe sind in Abbildung 2 dargestellt. Am 150. Graviditätstag sind keine Unterschiede zwischen fetalem und maternalem Teil erkennbar, die Progesteronkonzentrationen liegen auf gleichermaßen niedrigem Niveau. Mit dem 220. Graviditätstag ist ein deutlicher Anstieg der Meßwerte in den Kotyledonen erkennbar, wobei der höchste Wert bei einem 270 Tage graviden Tier gemessen wurde. Die Progesteronkonzentrationen in den Karunkeln lassen dagegen keine Veränderungen gegenüber dem 150. Graviditätstag erkennen.

#### 3.3.2. Ergebnisse der Östrogenbestimmungen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe

In den Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe der 150, 220 und 240 Tage graviden Kühe (n=3 Tiere pro Graviditätsstadium) lagen die Gewebekonzentrationen von Estradiol-17 $\alpha$  unter oder im Bereich der Nachweisgrenze von 1.8 pmol/g Gewebe. Aus der am 270. Graviditätstag untersuchten Versuchsgruppe lag nur die Probe eines Tieres zur Bestimmung der Gewebekonzentrationen vor. Hier wurde in den Kotyledonen 23.4 pmol/g Gewebe und in den Karunkeln 13.6 pmol/g Gewebe gemessen.

Für Estradiol-17 $\beta$  ergaben sich Gewebekonzentrationen im Bereich von 1.2 bis 38.3 pmol/g Gewebe, wobei in den Karunkeln im Durchschnitt höhere Konzentrationen gemessen wurden

als in den Kotyledonen (Abbildung 3). Sowohl in den Karunkeln als auch in den Kotyledonen ist nach niedrigen Meßwerten am 150. und 220. Graviditätstag ein Anstieg der Gewebekonzentrationen am 240. und 270. Tag erkennbar.

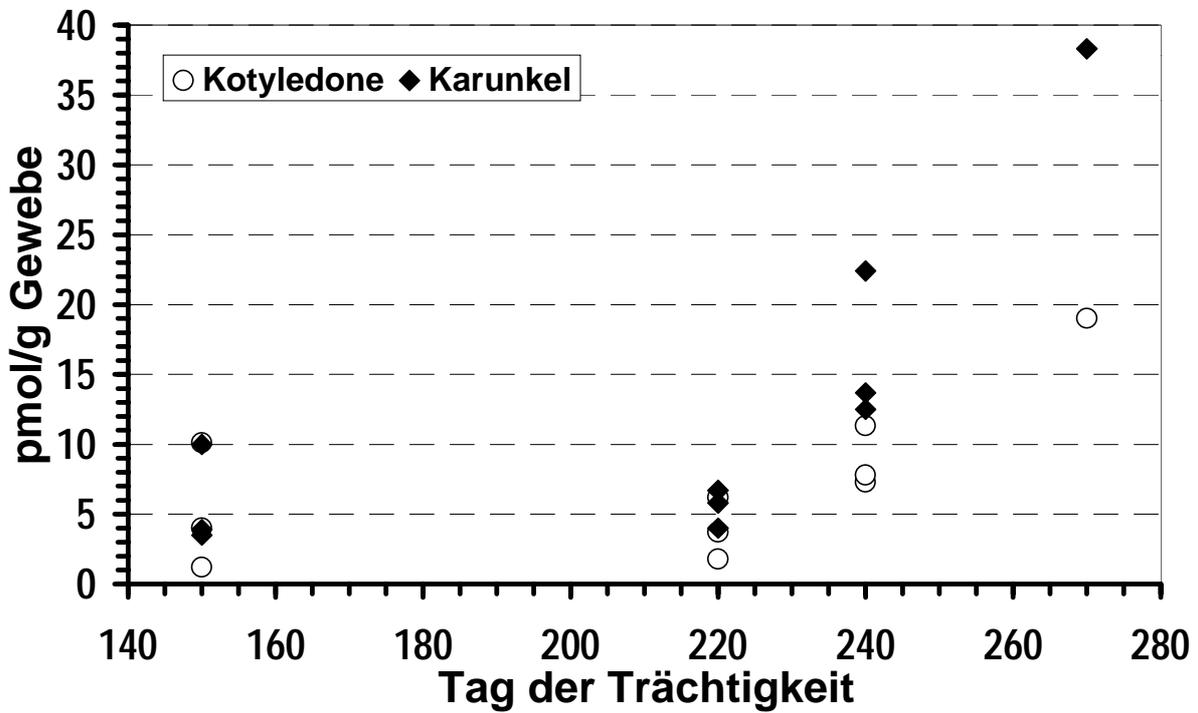


Abbildung 3: Ergebnisse der Estradiol-17β-Bestimmungen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Verteilung der Einzelwerte).

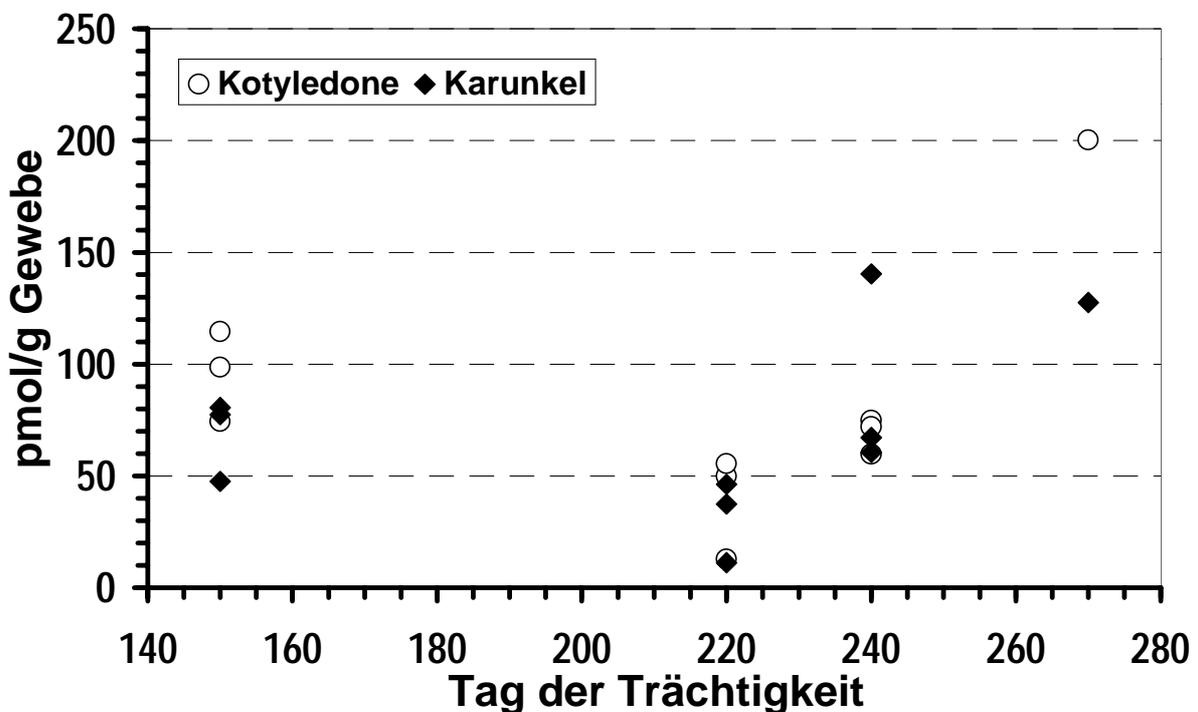


Abbildung 4: Ergebnisse der Estronebestimmungen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe (Verteilung der Einzelwerte).

Estron wurde in etwa zehnfach höheren Konzentrationen als Estradiol-17 $\beta$  nachgewiesen, wobei kein Unterschied zwischen den Konzentrationen im fetalen bzw. maternalen Teil der Plazentome erkennbar war (s. Abbildung 4). Sowohl in den Kotyledonen als auch in den Karunkeln fallen die Estronkonzentrationen am 220. gegenüber dem 150. Graviditätstag deutlich ab und steigen zum Ende der Gravidität hin erneut erheblich an.

### 3.4. Diskussion

Ziel der in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen war es, Informationen über die lokalen Gewebekonzentrationen an Progesteron und Östrogenen in den Plazentomen des Rindes zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag zu erhalten. Aufgrund der Beschaffenheit des Probenmaterials erschien es wenig sinnvoll, freie und konjugierte Östrogene getrennt zu erfassen, da aufgrund der hohen Sulfataseaktivität (s. Kapitel II) von vornherein mit einer erheblichen Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der freien Östrogene gerechnet werden musste. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Probenmaterial für die Bestimmung endogener Steroidkonzentrationen haben diese Untersuchungen eher den Charakter einer Orientierungsstudie. Dennoch lassen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse bezüglich der lokalen Verfügbarkeit plazentarer Steroide ziehen. Eine weitere wesentliche Bedeutung der hier erhaltenen Ergebnisse besteht darin, daß sie die zwischenzeitlich von TSUMAGARI et al. (1993, 1994) publizierten Daten zu Progesteron- und Östrogenkonzentrationen in den Plazentomen des Rindes vom 4. Trächtigtkeitsmonat bis zur Geburt bestätigen und somit Bezüge der eigenen Ergebnisse, insbesondere der in Kapitel V zur Zellproliferation in den Plazentomen erhaltenen Resultate, erlauben.

Wie bereits aufgrund der peripheren maternalen Plasmakonzentrationen zu vermuten (HOFFMANN et al., 1997), stellt Estron bzw. Estronsulfat das Hauptöstrogen der Plazenta dar. Estradiol-17 $\alpha$  war in den meisten Proben nicht bzw. nur in Spuren nachweisbar. Auch Estradiol-17 $\beta$  wird nur in vergleichsweise geringen Mengen nachgewiesen. Ein Befund von möglicherweise erheblicher Bedeutung (s. Kapitel V) ist der Verlauf der Estronkonzentrationen in den Plazentomen. Nach hohen Konzentrationen im 5. Graviditätsmonat kommt es in der folgenden Phase zu einem deutlichen Abfall der Gewebespiegel. Nach dem 220. Trächtigtkeitstag erfolgt dann mit fortschreitender Dauer der Gravidität ein ausgeprägter Anstieg. Ein entsprechender Verlauf wurde auch von TSUMAGARI et al. (1993) gefunden. Offensichtlich wird der temporäre Abfall der plazentaren Östrogenproduktion zwischen dem ca. 150.-240. Graviditätstag, der vermutlich auf einer Herunterregulierung der plazentaren Aromataseaktivität beruht (TSUMAGARI et al., 1993) und zeitlich mit der „plazentaren Progesteronphase“ korreliert, im peripheren maternalen Plasma durch das plazentare Wachstum überlagert, da dort die Östrogenkonzentrationen im entsprechenden Zeitraum weiter stetig ansteigen (HOFFMANN et al., 1997; zu den Estronkonzentrationen im Blutplasma der eigenen Versuchstiere s. Kapitel II, Abschnitt 2.4.1.).

Wie der Verlauf der Progesteronkonzentrationen zeigt, kommt es in den Kotyledonen nach dem 150. Graviditätstag zu einem deutlichen Anstieg, gefolgt von konstant hohen Werten bis unmittelbar vor die Geburt. Diese Daten bestätigen die in Kapitel I bezüglich der plazentaren Progesteronproduktion erhaltenen Ergebnisse, nach denen kein erheblicher Unterschied in der plazentaren Progesteronproduktion zwischen dem 220. und 270. Graviditätstag besteht, sowie den von TSUMAGARI et al. (1994) in den Kotyledonen gemessenen Verlauf der Progesteron-

ronkonzentrationen in der zweiten Hälfte der Gravidität. Somit ist, wie bereits in Kapitel I diskutiert, die erneute Abhängigkeit der Gravidität von Progesteron lutealen Ursprungs in der Spätphase der Trächtigkeit (CHEW et al., 1979) nicht durch eine Reduktion der plazentaren Progesteronproduktion bedingt. Der steile Anstieg der Progesteronkonzentrationen in den Kotyledonen geht nach eigenen Ergebnissen nicht, nach denen von TSUMAGARI et al. (1994) nur in geringem Ausmaß mit einem entsprechenden Anstieg in den Karunkeln einher. Dennoch erscheint es kaum als wahrscheinlich, daß die Verteilung des plazentaren Progesteron auf das fetale Kompartiment beschränkt bleibt, da in diesem Fall die Plazenta überhaupt keine Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Gravidität in Abwesenheit des lutealen Progesterons besitzen dürfte. Vielmehr ist zu vermuten, daß plazentares Progesteron nach dem Übertritt ins maternale Kompartiment rasch und in erheblichem Ausmaß metabolisiert wird. Der Anstieg graviditätsspezifischer Gestagenmetaboliten im Kot gravider Rinder während der zweiten Graviditätshälfte (E. MÖSTL, persönl. Mitteilung) spricht für diese Vermutung. Insgesamt zeigen die in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen, daß die Steroidhormonkonzentrationen im peripheren maternalen Plasma nur bedingt deren Verfügbarkeit in den Plazentomen widerspiegeln und daß entgegen früheren Annahmen, die auf in vitro-Experimenten zur Bedeutung des lutealen Progesterons beim graviden Rind basierten, die plazentare Progesteronproduktion in der Spätgravidität nicht absinkt.

### 3.5. Literatur

- CHEW BP, ERB RE, FESSLER JF, CALLAHAN CJ, MALVEN, PV (1979). Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens and calving traits. *J. Dairy Sci.* 62, 557-566
- HOFFMANN B, KYREIN HJ, ENDER ML (1973). An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Horm. Res.* 4, 302-310
- HOFFMANN B, HÖVELER R, HASAN SH, FAILING K (1992). Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J. Reprod. Fert.* 96, 837-845
- HOFFMANN B, GENTZ F, FAILING K (1996). Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG-concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 717-723
- HOFFMANN B, GOES DE PINHO T, SCHULER G (1997). Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105, 296-303
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKESHI M (1993). Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fert.* 98, 631-636
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKEISHI M (1994). 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fert.* 102, 35-39
- WILLIAMS K, HENRY D, LAYNE DS, COLLINS DC (1968). Metabolism of 4-<sup>14</sup>C-17 $\beta$ -estradiol-17 $\alpha$  and 16-<sup>14</sup>C-17 $\alpha$ <sup>3</sup>H-Estradiol-17 $\beta$  by the rabbit. *Endocrinology* 83, 113-117

**KAPITEL IV**

**IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN  
VON ÖSTROGEN- UND PROGESTERONREZEPTOREN  
IN DEN PLAZENTOMEN DES RINDES**

## INHALTSVERZEICHNIS

4.1.	Untersuchungsziele .....	154
4.2.	Literaturübersicht.....	154
4.2.1.	Vermittlung von Östrogen- bzw. Progesteronwirkungen .....	154
4.2.2.	Östrogenrezeptoren .....	156
4.2.2.1.	Östrogenrezeptor $\alpha$ .....	157
4.2.2.2.	Östrogenrezeptor $\beta$ .....	161
4.2.3.	Progesteronrezeptor .....	163
4.2.4.	Regulation der Expression von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren .....	164
4.2.5.	Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der Plazenta des Rindes und anderer Spezies .....	166
4.3.	Eigene Untersuchungen .....	168
4.3.1.	Probenmaterial und -aufbereitung.....	168
4.3.2.	Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors .....	169
4.3.3.	Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors .....	170
4.3.3.1.	Untersuchungen zur Auswahl der Primärantikörper .....	170
4.3.3.2.	Färbeprotokoll .....	173
4.3.4.	Quantitative bzw. semiquantitative immunhistologische Erfassung der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptorexpression in den Plazentomen .....	174
4.3.5.	Versuchsaufbau und statistische Auswertungen .....	175
4.3.5.1.	Quantitative Erfassung der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie).....	175
4.3.5.2.	Quantitative Untersuchungen zur Variabilität der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma (horizontale Studie).....	175
4.3.6.	Reagenzien, Chemikalien, Geräte und Lösungen .....	176
4.3.6.1.	Reagenzien und Chemikalien.....	176
4.3.6.2.	Geräte .....	177
4.3.6.3.	Lösungen .....	177
4.4.	Ergebnisse .....	178
4.4.1.	Progesteronrezeptor .....	178

---

4.4.1.1.	Reaktionsmuster des immunhistologischen Progesteronrezeptornachweises in den Plazentomen .....	178
4.4.1.2.	Progesteronrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie) ....	183
4.4.1.3.	Variabilität der Progesteronrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen verschiedenen Plazentomen eines Tieres (horizontale Studie) .....	184
4.4.2.	Östrogenrezeptor .....	186
4.4.2.1.	Reaktionsmuster der N-terminal gerichteten Antikörper 1D5 und AER314 in den Plazentomen .....	186
4.4.2.2.	Reaktionsmuster der C-terminal gerichteten Antikörper AER311 und HT277 in den Plazentomen .....	188
4.4.2.3.	Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie).....	195
4.4.2.4.	Variabilität der Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen verschiedenen Plazentomen eines Tieres (horizontale Studie).....	196
4.5.	Diskussion .....	198
4.6.	Literatur.....	205

## 4.1. Untersuchungsziele

Die Ergebnisse der in Kapitel II durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß in den Plazentomen, insbesondere im fetalen Teil (Kotyledone), hohe Östrogensulfotransferase-Aktivitäten vorhanden sind. Dies spricht dafür, daß - mit Ausnahme des unmittelbaren prä- und intraportalen Zeitraumes - die plazentaren Östrogene zum überwiegenden Teil bereits in den Plazentomen sulfokonjugiert werden. Sieht man von einer Aktivierung in potentiellen Zielzellen außerhalb der Plazentome durch die Einwirkung einer Östrogen-Sulfatase ab, so liegt der Schluß nahe, daß die die Plazentome verlassenden konjugierten Östrogene bereits ihre biologische Funktion erfüllt haben. Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Hypothese, daß plazentare Östrogene beim Rind nicht primär als Hormone im klassischen Sinn fungieren, sondern als parakrine oder autokrine Faktoren wirken, welche an der lokalen Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen innerhalb der Plazentome selbst beteiligt sein könnten. In einem derartigen Konzept könnte auch der plazentare Progesteronproduktion - deren biologische Bedeutung angesichts der über die gesamte Graviditätsdauer bei weitem dominierenden lutealen Progesteronproduktion bisher unklar war - eine Rolle zugeordnet werden, da sie - obwohl für den peripheren maternalen Plasmaspiegel von absolut untergeordneter Bedeutung - durchaus zur Erzeugung hoher lokaler Progesteronkonzentrationen in der Lage ist (s. Kapitel III, Abschnitt 3.3.1.; TSUMAGARI et al., 1994). Diese hohen lokalen Konzentrationen könnten für lokal regulierte Prozesse wie beispielsweise plazentares Wachstum und Differenzierung oder die Schaffung eines besonderen immunologischen Status an der fetomaternalen Kontaktzone von erheblicher Bedeutung sein. Ziel der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen war es daher, durch die immunhistologische Darstellung eventuell vorhandener Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren potentielle Zielzellen der im Trophoblasten gebildeten plazentaren Steroide innerhalb der Plazentome zu identifizieren.

## 4.2. Literaturübersicht

### 4.2.1. Vermittlung von Östrogen- bzw. Progesteronwirkungen

Die klassischen Wirkungen von Östrogenen und Progesteron werden durch spezifische Rezeptoren vermittelt, welche zur Gruppe der Rezeptoren für hydrophobe Ringmoleküle gehören. Zu dieser Rezeptor-Superfamilie gehören neben den Rezeptoren für Sexualsteroid, Glukokortikoide und Mineralokortikoide die Rezeptoren für Schilddrüsenhormone, Vitamin D<sub>3</sub>, Retinolsäure sowie weitere strukturverwandte Moleküle, deren Liganden bisher nicht identifiziert wurden (orphan receptors). Diese Rezeptoren fungieren als Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die als Dimere an Zielsequenzen in regulatorischen Abschnitten (hormone responsive elements, HRE) Hormon-sensitiver Gene binden und deren Expression verstärken oder unterdrücken. An der Aktivierung bzw. Suppression dieser Gene sind neben dem Hormon-Rezeptor-Komplex zusätzlich weitere Kernproteine, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren beteiligt.

Allen Rezeptoren dieser Familie ist die intrazelluläre Lokalisation und eine ähnliche Struktur- und Funktionsorganisation gemeinsam. Sie sind aus strukturellen bzw. funktionellen Untereinheiten (Domänen) zusammengesetzt und besitzen im Allgemeinen einen dreiteiligen Aufbau. In der Mitte des Rezeptormoleküls befindet sich ein hochgradig konservierter DNS-bindender Abschnitt, welcher einen wenig konservierten N-terminalen Teil von einem stärker konservierten C-terminalen Teil trennt. Der DNS-bindende Abschnitt enthält zwei Zinkfinger-Strukturen. Der N-Terminus weist bezüglich Länge und Struktur erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Mitgliedern dieser Rezeptorfamilie auf. Dort ist bei den meisten Vertretern eine konstitutive, transkriptionsaktivierende Funktion 1 (AF1) lokalisiert, welche hormonunabhängig agiert. Der C-Terminus beinhaltet mehrere Funktionen wie die ligand-bindende Domäne, die Funktion für die nukleäre Translokation bzw. für die Dimerisierung sowie eine ligandabhängige transkriptionsaktivierende Funktion 2, welche durch die Bindung des jeweiligen Hormons aktiviert wird (Übersichten bei EVANS, 1988; O'MALLEY, 1990; GRONEMEYER, 1992; MEYER, 1994; TENBAUM und BANIAHMAD, 1997).

Aufgrund ihres lipophilen Charakters können Steroide die Zellmembran ungehindert passieren und in die Zelle eindringen. Nach der Bindung der Steroide an den spezifischen freien Rezeptor (Aporezeptor) kommt es zu dessen Konformationsänderung, welcher zwei wesentliche Effekte zugeschrieben werden: a) Freisetzung von Hitzeschockproteinen, welche mit dem Aporezeptor im Komplex vorliegen, und b) Demaskierung spezifischer funktioneller Bereiche des mit dem Liganden besetzten Steroidrezeptormoleküls. Dadurch bilden sich einerseits Hormon-Rezeptor-Dimere (Holorezeptor) aus, andererseits überträgt sich die Konformationsänderung auf die DNS-Bindungsdomäne, wodurch der Gesamtkomplex mittels Zinkfinger-Strukturen an die spezifischen regulatorischen Elemente der DNS binden kann. Im Verlauf der Aktivierung wird der Rezeptor phosphoryliert (BAGCHI et al., 1992). Am Ende dieser Ereigniskette steht die Ausbildung eines Transkriptionskomplexes durch die Anlagerung weiterer Kernproteine und schließlich die Aktivierung spezifischer Gene. Der Ort der ursprünglichen Steroid-Rezeptor-Interaktion war lang umstritten. Aufgrund früherer Bindungsstudien unter Verwendung von subzellulären Fraktionen wurde postuliert, daß nach Bildung der Steroid-Rezeptor-Komplexe im Zytoplasma diese in den Kern verlagert werden, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Nach neueren, insbesondere immunhistologischen Untersuchungen, befindet sich die überwiegende Mehrzahl der Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren, auch der freien Rezeptoren, im Kern (KING und GREENE, 1984; GREENE et al., 1984; PERROT-APPLANAT et al., 1986; BRENNER et al., 1990; RENOIR et al., 1990; TUOHIMA et al., 1993). Nach GRONEMEYER (1992) beeinflusst die Hormonbindung die intrazelluläre Kompartimentierung von Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor nicht, da diese konstitutionell hochaktive Kernlokalisationssignale besitzen. Beim Glukokortikoidrezeptor wird dagegen die Verlagerung in den Kern erst durch die Bindung des Liganden induziert. Ebenso umstritten ist eine regulatorische Bedeutung der Assoziation des Hitzeschock-

proteins 90 mit dem Aporezeptor und dessen Freisetzung bei der Ligand-Rezeptorbindung „*in vivo*“. Nach TOUHIMAA et al. (1993) handelt es sich bei den Aporezeptor-Hitzeschockprotein 90-Interaktionen um Artefakte, welche durch die Aufhebung der intrazellulären Kompartimentierungen bei bestimmten Gewebepräparationen zustande kommen.

Rezeptoren für Sexualsteroidoide finden sich zwar vorwiegend in den primären und sekundären Geschlechtsorganen, sie sind jedoch darüber hinaus in einer ganzen Reihe weiterer Organe nachweisbar (vergl. Abschnitt 4.2.2.). Offensichtlich unterliegen jedoch nicht ausschließlich Zellen mit einem nachweisbaren Besatz an Rezeptoren für Sexualsteroidoide deren Regulation, da auch Zellen ohne entsprechende Rezeptoren ihren Funktionszustand in Abhängigkeit von Sexualsteroidspiegeln ändern. Dies trifft bei den Östrogenen v.a. auf bestimmte Epithelzellen zu. In diesen Fällen werden Steroid-Effekte offensichtlich durch benachbarte, rezeptorpositive Stromazellen über parakrine Mediatoren vermittelt (BRENNER et al., 1990; COOKE et al., 1997). Unter den beteiligten parakrinen Faktoren kommt den Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle zu (NELSON et al., 1991).

Neben den über die klassischen Steroidrezeptoren vermittelten genomischen Wirkungen werden eine ganze Reihe weiterer Steroideffekte beobachtet, bei denen aus der kurzen Zeitspanne zwischen der Verfügbarkeit des Hormons bis zum Eintreten der Wirkung geschlossen werden kann, daß diese nichtgenomischer Natur sein müssen. Für nichtgenomische Wirkungen spricht in diesen Fällen weiterhin die Tatsache, daß diese nicht durch Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren wie Aktinomycin D bzw. Cycloheximid unterdrückt werden können (Übersichten bei WONG et al., 1996; WEHLING, 1997). Bei den nichtgenomischen Wirkungen können spezifische rezeptorvermittelte sowie unspezifische Wirkungen unterschieden werden.

Unspezifische nichtgenomische Steroidwirkungen ergeben sich bei sehr hohen Steroidhormonkonzentrationen aus Effekten auf Zellmembranen wie Interkalierung in die Lipidmembran, Veränderung der Membranfluidität sowie durch die unspezifische Beeinflussung von Kanälen oder Seifeneffekten (SCHUMACHER, 1990; WEHLING, 1997). Spezifische nichtgenomische Steroidwirkungen werden offensichtlich über Rezeptoren unterschiedlicher Klassen vermittelt. So spielt für die Vermittlung der Wirkungen der Neurosteroidoide eine eigene, bisher nicht näher charakterisierte Steroidbindungsstelle am GABA- $\alpha$ -Rezeptor eine wichtige Rolle (LAN et al., 1990; GEE et al., 1995). Bei der Vermittlung nichtgenomischer Progesteronwirkungen in Spermien sollen zwei unterschiedliche membranständige Rezeptoren beteiligt sein, die bisher allerdings noch kaum charakterisiert sind (MENDOZA et al., 1995; SABEUR et al., 1996; LUCONI et al., 1998). GERDES et al. (1998) berichten über die Klonierung zweier menschlicher steroidbindender Membranproteine, von denen eines bevorzugt in der Plazenta exprimiert wird.

#### 4.2.2. Östrogenrezeptoren

Der Östrogenrezeptor (ER) wurde erstmals von JENSEN und JACOBSEN (1962) als ein uterines Protein beschrieben, welches Estradiol-17 $\beta$  mit hoher Affinität zu binden vermochte. Seit der

Klonierung des ER bei verschiedenen Spezies beginnend Mitte der 90er Jahre bestand zunächst Übereinstimmung darüber, daß nur ein einziges ER-Gen existiert. Zur allgemeinen Überraschung wurde von KUIPER et al. (1996) ein weiteres ER-Gen aus einer Rattenprostata-cDNA-Library kloniert, dessen Produkt große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem "klassischen" Östrogenrezeptor aufweist. Dieser wird seitdem als ER $\alpha$  bezeichnet, der neuentdeckte Subtyp als ER $\beta$  (KUIPER und GUSTAFSSON, 1997). Die Tatsache, daß ER $\alpha$  und ER $\beta$  beim Menschen auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, verdeutlicht, daß es sich hierbei um Produkte separater Gene und nicht um Spleiß-Varianten desselben Gens handelt (ENMARK et al., 1997). Im folgenden Text soll mit "Östrogenrezeptor (ER)" generell der klassische Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) bezeichnet werden. Soweit der ER $\beta$  angesprochen wird, ist dies besonders erwähnt. Östrogenrezeptoren vermitteln Wachstum und Differenzierung regulierende Signale, v.a. im weiblichen Genitaltrakt und in der Milchdrüse. Sie sind darüber hinaus jedoch in einer ganzen Reihe weiterer Organe und Zellen wie z.B. Gehirn (FRIEND et al., 1997; SHUGHRUE et al., 1997), Knochen, Leber, Verdauungstrakt (SALIH et al., 1996), Leukozyten (WILSON et al., 1996), Haut (OH und SMART, 1996) und im kardiovaskulären System (FARHAT et al., 1996) nachweisbar. Die Expression von Östrogenrezeptoren in verschiedenen Zelltypen mit sehr unterschiedlichen Funktionen deutet bereits an, daß die Antwort auf eine östrogene Stimulation nicht uniform erfolgen kann, sondern im Einzelfall durch eine Reihe verschiedener Faktoren moduliert wird. Demnach ist die Antwort auf die Interaktion des ER mit einem Liganden abhängig von 1) dem/den Rezeptortyp(en) (Wildtyp und/oder Varianten), 2) dem Liganden, 3) dem Promotor sowie 4) dem zellulären Kontext (KATZENELLENBOGEN, 1996).

#### 4.2.2.1. Östrogenrezeptor $\alpha$

ER $\alpha$  besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa und ist aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut, die beim Menschen aus 596 Aminosäuren besteht. Das Molekül zeigt den typischen Aufbau eines nukleären Rezeptors und gliedert sich in 6 funktionelle Untereinheiten, die als Domänen A-F bezeichnet werden (s. Tabelle 1). Diese beinhalten eine N-terminale Ligand-unabhängige transkriptionsaktivierende Funktion (AF-1), eine zentrale DNS-Bindungsstelle, eine C-terminale Hormonbindungsstelle und eine zweite, Ligand-abhängige transkriptionsaktivierende Funktion (AF-2). Die DNS-Bindungsstelle, welche den am stärksten konservierten Teil des Moleküls darstellt, ist aus zwei Zinkfingern aufgebaut, in denen jeweils ein Zinkion durch vier Cystein-Reste komplex gebunden ist. Die transkriptionsaktivierenden Funktionen 1 und 2 sind vermutlich Ort der Wechselwirkungen zwischen der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie bzw. zellspezifischer Faktoren und dem ER, wobei AF-1 und AF-2 unabhängig voneinander in Abhängigkeit von spezifischen Promotern bzw. vom zellulären Kontext agieren können. Die für die Dimerisierung und nukleäre Lokalisation verantwortlichen Sequenzen verteilen sich über die DNS-bindende sowie die hormonbindende Domäne. Das ER $\alpha$ -Gen umfaßt 140000 Basenpaare. Die

“reife” mRNA wird aus 8 Exons zusammengesetzt, wobei die Exon-Struktur nicht mit den funktionellen Domänen übereinstimmt (Zusammenfassungen bei KUMAR et al., 1987; PFEFFER et al., 1996; SMITH, 1998).

Tabelle 1: Struktur und funktionelle Organisation des menschlichen Östrogenrezeptors (nach KUMAR et al., 1987; MONTANO et al., 1995; PFEFFER et al., 1996; SMITH, 1998).

Domäne	Aminosäuren	Exon	Funktion(en)
A/B	1-179	1+[2]*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transkription-aktivierende Funktion 1 (Ligand-unabhängig);</li> <li>• Phosphorylierungsstellen Serin<sup>104, 106, 118, 167</sup></li> </ul>
C	180-262	[2]+3+[4]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimerisierung</li> <li>• DNS-Bindung (2 Zinkfinger)</li> <li>• Nukleäre Lokalisation</li> </ul>
D	263-301	[4]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bindungsstelle für Hitzeschock-Protein 90</li> </ul>
E	301-552	[4]+5+6+7+[8]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ligand-Bindungsstelle</li> <li>• Transkription-aktivierende Funktion 2 (Ligand-abhängig)</li> <li>• Dimerisierung</li> <li>• Phosphorylierungsstelle Tyrosin<sup>537</sup></li> </ul>
F	553-596	[8]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulation der transkriptionellen Aktivität</li> </ul>

\* Angaben in [ ]: das betreffende Exon überlappt benachbarte Domänen

In der klassischen Signalkaskade bindet der ligandgebundene ER als Homodimer an das klassische Estrogen Response Element (ERE), welches die palindromische Consensus Sequenz 5'-GGTCAnnnTGACC besitzt. Die beiden Halbpalindrome sind hierbei durch ein Zwischenstück (Spacer) verbunden, welches aus nichtkonservierten Nukleotiden besteht. Außer über diesen klassischen Signalweg kann der ER jedoch auch die Transkription von Genen über ein Activator Protein 1 (AP1) Enhancer Element aktivieren. Für diesen alternativen Weg der Genaktivierung, welcher als Transkriptional Crosstalk bezeichnet wird und im Gegensatz zum klassischen Signalübertragungsweg auf Protein-Protein-Interaktionen beruht, werden neben dem ER und dem AP1 Enhancer Element ein östrogenen Ligand sowie ein Heterodimer aus den Transkriptionsfaktoren FOS und JUN benötigt (GRONEMEYER, 1992; PAECH et al., 1997; GOTTLICHER

et al., 1998), wobei der ligandbesetzte ER die Bindung des Jun/Fos-Heterodimers an das AP1 Enhancer Element verstärkt. Obwohl das Vorhandensein der DNS-Bindungsdomäne des ER für diese Art der Genaktivierung essentiell ist, kommt es hierbei offensichtlich nicht zu einer direkten Bindung des ER an die DNS (UMAYAHARA et al., 1994). Möglicherweise hängt es auch von der Art des Liganden am ER ab, welcher der beiden Signalübertragungswege aktiviert wird (GOTTLICHER et al., 1998).

Neben dem klassischen Östrogenrezeptor ("Wildtyp"; wtER) wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Varianten beschrieben. Viele dieser Varianten wurden auf RNA-Ebene nachgewiesen und charakterisiert. Es ist in vielen Fällen noch unklar, inwieweit diese mRNA-Varianten translatiert werden. Offensichtlich handelt es sich nur teilweise um spontane Mutationen, da ein Teil dieser zunächst vorwiegend in östrogenabhängigen Tumoren beschriebenen Varianten (CHADARUN et al., 1997; HUANG et al., 1997; MURPHY et al., 1997) auch in nichtneoplastischen Geweben gefunden wurde (PFEFFER et al., 1996; SALIH et al., 1996; KANG et al., 1997; MURPHY et al., 1997; RICE et al., 1997). Als Mechanismen zur Bildung von ER-Varianten wurden Verkürzungen ("truncated forms", s.u.) und auf mRNA-Ebene v.a. Deletionen einzelner oder mehrerer kompletter Exons durch alternatives Splicing beschrieben (MIKSICEK et al., 1993; HU et al., 1996; FASCO, 1997; RICE et al., 1997). Die Deletionsvarianten des Östrogenrezeptors werden als ER<sub>X</sub> bezeichnet, wobei X für die Nummer des deletierten Exons steht. In einem bestimmten Gewebe können eine oder mehrere Variante(n) zusammen mit dem wtER nachweisbar sein (FRIEND et al., 1997). Die Bedeutung dieser Deletionsvarianten ist unklar, da sie mit entsprechenden Nachweismethoden zwar auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden können, der Nachweis auf Proteinebene jedoch umstritten ist (DOWSETT et al., 1997; MADSEN et al., 1997). Besondere Varianten stellen die in der Hypophyse isolierten **Truncated Estrogen Receptor Products** (TERP-1 und TERP-2) dar. Die Transkription dieser ER-Varianten wird von einem Startcodon begonnen, welches sich von dem des wtER unterscheidet. Die mRNA von TERP-1 besteht daher aus einem ersten alternativen Exon, gefolgt von den Exons 5-8 des wtER. Das TERP-1-Protein ist daher deutlich kleiner als der wtER und besitzt ein Molekulargewicht von nur ca. 20 kDa. Bei TERP-2 befindet sich zwischen dem alternativen Exon am 5'-Ende und Exon 5 eine Insertion von 31 Basenpaaren. TERP-mRNA wurde in großen Mengen in Hypophysen weiblicher Ratten nachgewiesen, nicht jedoch in den Hypophysen männlicher Tiere sowie im Uterus. In den Hypophysen männlicher Tiere wurde TERP-mRNA nach Estradiol-Applikation deutlich aufreguliert (FRIEND et al., 1995; FRIEND et al., 1997). Die Expression von ER-Varianten kann bei der Anwendung unterschiedlicher ER-Nachweismethoden, wie zum Beispiel immunhistologischer/-cytologischer Verfahren unter Verwendung von Primärantikörpern gegen Epitope im N- bzw. C-terminalen Bereich, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (HUANG et al., 1997; KANG et al., 1997).

Die biologischen Aktivitäten der ER-Varianten sind bisher noch wenig charakterisiert. Auch ist zu beachten, daß die Aktivität von ER-Varianten vermutlich Ligand-, Zell- und Promoter-

spezifisch ist. Soweit bisher erkennbar, kann die Aktivität von ER-Varianten je nach Typ erhebliche Unterschiede aufweisen. Ein Teil der Varianten ist offensichtlich nicht in der Lage, die Expression ER-abhängiger Gene zu stimulieren (DOTZLAW et al., 1992; FUQUA et al., 1992; KOEHORST et al., 1994). Eine Aktivität dieser Varianten kann sich jedoch möglicherweise über Interaktionen mit dem wtER ergeben (McGUIRE et al., 1991; WANG und MIKSICEK, 1991; FUQUA et al., 1992). Eine weitere Kategorie von ER-Varianten sind solche ohne Fähigkeit zur Hormonbindung, jedoch konstitutioneller transkriptionsaktivierender Aktivität (FUQUA et al., 1991; LESLIE et al., 1992), d.h. diese Varianten sind in Abwesenheit von Liganden aktiv.

Die biologische Bedeutung der Expression von ER-Splice-Varianten ist unklar. In Tumoren wird die Expression von ER-Varianten mit dem veränderten Wachstums- und Differenzierungsverhalten in Verbindung gebracht. Die dazu vorhanden Informationen sind bisher nicht eindeutig. Während beispielsweise HU et al. (1996) beim Menschen keine Korrelation zwischen der Expression von ER-Splice-Varianten und dem Auftreten von Uterustumoren fanden, beschrieben CHAIDARUN et al. (1997) in humanen Hypophysenadenomen die Expression von ERA2 bzw. ERA5 als tumorspezifisch. Die biologische Bedeutung in nichtneoplastischen Geweben ist unklar. Es gibt jedoch erste Hinweise, daß die gewebespezifische Koexpression von wtER und ER-Splice-Varianten von Bedeutung für die Aufrechterhaltung des normalen biologischen Verhaltens ist (WILSON et al., 1996; PFEFFER et al., 1997).

Die klassische durch Östrogene induzierte Signalkaskade verläuft über die intrazelluläre Ligand-Rezeptor-Bindung, Ausbildung von Ligand-Rezeptor-Dimeren, Bindung an spezifische DNS-Bereiche, Ausbildung des Transkriptions-Komplexes und letztendlich die Expression ER-abhängiger Gene. Wie neuere Untersuchungen zeigen, läuft dieser Prozess jedoch nicht stets isoliert von anderen intrazellulären Informationsübertragungsprozessen ab. Vielmehr existieren multiple Verknüpfungen (engl.: Cross-Talk) zwischen den ER-abhängigen intrazellulären Ereignissen und den von Rezeptoren anderer Mediatorsystemen induzierten intrazellulären Signalkaskaden. Synergistische Wechselwirkungen wurden insbesondere mit IGF-I und EGF/TGF $\alpha$  nachgewiesen. Die beiden letztgenannten Wachstumsfaktoren induzieren bzw. verstärken z.B. in einer humanen ER-positiven Zelllinie die Transkription ER-abhängiger Gene, wobei dieser Effekt nicht durch eine Steigerung der ER-Expression bedingt ist und durch den ER-Rezeptorantagonisten ICI 164384 gehemmt wird (NELSON et al., 1991; IGNAR-TROWBRIDGE et al., 1992, 1993, 1996). Die Mechanismen des Cross-Talk werden noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Ein wesentlicher Verknüpfungspunkt zwischen ER und Wachstumsfaktoren scheint die Phosphorylierung spezifischer Stellen in der N-terminalen A/B-Domäne zu sein. So führt die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) bzw. die Hemmung von Protein-Phosphatasen zu einer ligand-unabhängigen Aktivierung des ER. Von besonderer Bedeutung für die ligand-unabhängige Aktivierung des ER ist die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signaltransduktionskaskade. So initiiert beispielsweise EGF nach Bindung an seinen spezifischen membranständigen Rezeptor u.a. eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade, an

deren Ende die Aktivierung der MAPK steht. Die aktivierte MAPK kann schließlich über die Phosphorylierung des ER dessen transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Hierbei spielt offensichtlich die Phosphorylierung des ER an Serin<sup>118</sup> eine besondere Rolle. Zur Bedeutung des Cross-Talks zwischen dem ER und Wachstumsfaktoren liegen zur Zeit kaum gesicherte Erkenntnisse vor. Es werden u.a. folgende Funktionen diskutiert (SMITH, 1998):

- Wachstumsfaktoren unterhalten eine basale ER-abhängige Transkriptionsaktivität in Zeiten niedriger Östrogenkonzentrationen
- Modulation der Transkriptionsaktivität des ligandbesetzten ER; Steigerung der Expression ER-abhängiger Zielgene
- Positive Rückkopplung: Östrogene induzieren die verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren, diese wiederum verstärken die Transkription des ER
- "Sensibilisierung" des ER: Induktion biologischer Signale unter Bedingungen, unter denen der Ligand allein nicht zur Erzeugung eines biologischen Signals in der Lage ist.

#### 4.2.2.2. Östrogenrezeptor $\beta$

Der Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) wurde bei verschiedenen Spezies wie Mensch (MOSELMAN et al., 1996), Ratte (KUIPER et al., 1996), Maus (TREMBLAY et al., 1997) und Rind (ROSENFELD et al., 1999) nachgewiesen und charakterisiert. Obwohl die menschlichen Gene für ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind und das ER $\beta$ -Gen mit ca. 40 kb gegenüber dem ER $\alpha$ -Gen mit 140 kb vergleichsweise klein ist, weisen sie eine identische Intron/Exon-Struktur auf. Die strukturelle und funktionelle Untergliederung des ER $\beta$ -Moleküls in die Domänen A-F ist ebenfalls identisch. Im translatierten Teil weisen die beiden Gene eine Homologie von 47% auf, wobei die Homologie in der DNS-bindenden Domäne C mit 96% und in der ligandbindenden Domäne E mit 58% am höchsten ist, während die übrigen Bereiche deutlich weniger konserviert sind (MOSELMAN et al., 1996; ENMARK et al., 1997; OGAWA et al., 1998). Ähnliche Werte ergaben sich auch auf Aminosäureebene bei der Ratte (KUIPER et al., 1996). Beim Menschen ist ER $\beta$  mit 530 Aminosäuren etwas kleiner als ER $\alpha$  mit 596 Aminosäuren. Dementsprechend ergaben sich bei der *in vitro*-Translation von ER $\beta$  zwei Banden von 60 bzw. 57 kDa (OGAWA et al., 1998). Der ER $\beta$  des Rindes besteht aus 527 Aminosäuren (ROSENFELD et al., 1999).

ER $\alpha$  und ER $\beta$  weisen ein unterschiedliches, jedoch überlappendes Verteilungsmuster auf. Auf mRNA-Ebene ist in vielen Organen die Co-Expression von ER $\alpha$  und ER $\beta$  nachweisbar, wobei das Verhältnis zwischen ER $\alpha$ /ER $\beta$  je nach Organ und Zelltyp in weiten Grenzen variieren kann. Organe mit überwiegender ER $\alpha$ -Expression sind beim Menschen z.B. das Endometrium und die Milchdrüse, während in den Granulosazellen ausschließlich ER $\beta$  exprimiert wird. Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen deuten auf die Möglichkeit ausgeprägter speziesspezifischer Unterschiede im ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Expressionsmuster hin (MOSELMAN et al., 1996; BRANDENBERGER

et al., 1997; COUSE et al., 1997; ENMARK et al., 1997; SAUNDERS et al., 1997; SHUGHRUE et al., 1997). Beim Rind wurden ER $\beta$ -mRNA bzw. -Protein mittels in situ-Hybridisierung bzw. Immunhistologie in den Granulosazellen antraler Follikel nachgewiesen (ROSENFELD et al., 1999).

Ähnlich wie beim ER $\alpha$  gibt es auch bei ER $\beta$  Varianten. So wurde in humanen Mammatumoren ER $\beta$ -mRNA mit einer Deletion eines Abschnitts beschrieben, der dem Exon 5 von ER $\alpha$  entspricht (VLADUSIC et al., 1998). Bei der Ratte wurde eine Variante mit einer Insertion von 18 Aminosäuren in der Hormonbindungsdomäne (CHU und FULLER, 1997) sowie die Deletion des Exons 3 (PETERSEN et al., 1998) identifiziert.

Hinsichtlich der Aktivierung durch Liganden deuten bisherige Untersuchungen Unterschiede zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  an. Beide Rezeptortypen vermögen beim Menschen zwar Estradiol-17 $\beta$  mit hoher Affinität zu binden. Die halbmaximale Aktivierung eines ERE-abhängigen Reporter-Gens wurde über ER $\alpha$  jedoch bei niedrigeren Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen erreicht als über ER $\beta$ . Weiterhin war die durch Estradiol-17 $\beta$  induzierte Transaktivierung via ER $\alpha$  deutlich höher als via ER $\beta$  (MOSELMAN et al., 1996).

Zur biologischen Bedeutung von ER $\beta$  liegen zur Zeit noch wenige konkrete Informationen vor. Der hohe Homologiegrad in der DNS-bindenden Domäne läßt vermuten, daß beide Rezeptortypen ihre Wirkungen über dieselben responsiven DNS-Elemente vermitteln. Dennoch erscheint es möglich, daß die beiden Rezeptortypen unterschiedliche Sätze von Zielgenen aktivieren. Dies ergibt sich v.a. aus den sehr unterschiedlichen A/B-Domänen im Hinblick auf die Funktion der dort lokalisierten ligandunabhängigen transkriptionsaktivierenden Funktion 1 und auf deren Wechselwirkungen mit Co-Aktivatoren bzw. -Repressoren (MOSELMAN et al., 1996; PACE et al., 1997). Weiterhin haben Untersuchungen an Zellkulturen gezeigt, daß am klassischen ERE Östrogene und Antiöstrogene via ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  gleichgerichtete östrogene bzw. antiöstrogene Effekte hervorrufen. Dagegen wurden am alternativen Signalübertragungsweg via AP1 Enhancer Element durch ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  nach Bindung von Östrogenen bzw. Antiöstrogenen teilweise entgegengesetzte Effekte beobachtet (PAECH et al., 1997). Alternativen zum bisher bekannten Signalübertragungsmechanismus über den ER $\alpha$  ergeben sich neben der Bildung von ER $\beta$ -Homodimeren auch durch die Formation von ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Heterodimeren (PACE et al., 1997; OGAWA et al., 1998). Daten aus Experimenten an Individuen mit defektem ER $\beta$ -Gen (Spontanmutationen, KO-Mäuse) liegen zur Zeit nicht vor. Experimente mit ER $\alpha$ -KO-Mäusen haben gezeigt, daß dieser Gendefekt die pränatale Entwicklung und die Gesundheit der Tiere kaum beeinträchtigt. Effekte waren lediglich im Bereich der Fertilität erkennbar (LUBAHN et al., 1993; EDDY et al., 1996; RISSMAN et al., 1997). Dies läßt vermuten, daß ein Teil der Östrogeneffekte tatsächlich über ER $\beta$  vermittelt wird und die Inaktivierung des ER $\alpha$ -Gens via ER $\beta$  in vielen Organsystemen kompensiert werden kann (KUIPER und GUSTAFSSON, 1997).

### 4.2.3. Progesteronrezeptor

Der Progesteronrezeptor (PR) besitzt eine dem Östrogenrezeptor sehr ähnliche strukturelle Organisation. Das lineare Molekül ist beim Menschen aus 933 Aminosäuren aufgebaut. Das entsprechende Gen umfaßt ca. 90000 Basenpaare. Aus dem Primärtranskript wird die reife mRNA durch Splicing von 8 Exons zusammengesetzt. Die funktionellen Untereinheiten werden als Domänen A-E bezeichnet. Exon 1 entspricht der 5'-nicht-kodierenden Region und der N-terminalen A/B-Domäne des Rezeptors, welche die Spezifität für die Zielgene bestimmt und die ligandunabhängige transkriptionsaktivierende Funktion 1 (AF1) enthält. Exon 2 und 3 kodieren jeweils für eine Zink-Finger-Struktur und bilden offensichtlich eine gemeinsame strukturelle Untereinheit, die DNS-bindende Domäne C. Exon 4 kodiert für die verbindende Domäne D sowie für den N-terminalen Bereich der Hormonbindungsdomäne. Exon 4 enthält weiterhin die Information für die nukleäre Lokalisation. Die Exons 5-8 kodieren den restlichen Teil der Hormonbindungsdomäne, welche zusätzlich die transkriptionsaktivierende Funktion 2 (AF2) sowie eine dimerisierende Funktion enthält (MISRAHI et al., 1987; GRONEMEYER, 1992; MISRAHI et al., 1993). Der C-Terminus enthält offensichtlich weiterhin eine Repressor-Funktion (Aminosäuren 917-928), welche für die Unterschiede bezüglich der PR-abhängigen Transkription in Abhängigkeit von der Bindung des PR mit Progesteron bzw. mit dem Antigestagen RU38486 verantwortlich ist (XU et al., 1996).

Der Progesteronrezeptor des Menschen und anderer Spezies kommt in zwei Isoformen, PR-A und PR-B, vor (SCHOTT et al., 1991). PR-A ist beim Menschen gegenüber PR-B am N-Terminus um 164 Aminosäuren verkürzt. Dieses 164 Aminosäuren umfassende Segment soll beim menschlichen PR Sitz einer dritten transkriptionsaktivierenden Funktion (AF3) sein (SARTORIUS et al., 1994). Hinsichtlich der Bildung der beiden Isoformen wurden zwei verschiedene Mechanismen beschrieben: a) Start der Transkription von unterschiedlichen Promotern eines einzigen Gens bzw. b) Verwendung alternativer Startkodons bei der Translation. Welcher der beiden genannten Wege beschritten wird, hängt vermutlich von der Spezies ab (CONNELLY et al., 1987; KASTNER et al., 1990). Die biologischen Aktivitäten von PR-A und PR-B sind noch nicht vollständig charakterisiert. Bisherige Untersuchungen lassen jedoch erkennen, daß sie sich in Abhängigkeit von der Spezies, Zelltyp und Promoter erheblich unterscheiden können. Während PR-B im allgemeinen überwiegend als Aktivator der Transkription fungiert, wirkt PR-A in Abhängigkeit von der Spezies als Aktivator oder Repressor. Eine transkriptionsaktivierende Wirkung von PR-A wurde für das Huhn beschrieben, während er beim Menschen die Transkription progesteronabhängiger Gene unterdrückt (GIANGRANDE et al., 1997). Die transkriptionssinhibierende Wirkung von PR-A erfolgt unabhängig von der DNS-Bindung und erstreckt sich nicht nur auf die PR-B-vermittelte Transkription, sondern die Aktivität aller Steroidhormonrezeptoren. Für die Funktion des PR-A als Transkriptionsrepressor ist dessen DNS-Bindung nicht erforderlich. Es handelt sich hierbei um einen nichtkompetitiven Mechanismus, der zur Zeit noch weitgehend unklar ist. Vermutlich liegen ihm Wechselwirkungen mit Steroidrezeptor-

spezifischen Transkriptionsfaktoren bzw. Adapterproteinen oder mit Bestandteilen der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie zugrunde (VEGETO et al., 1993; WEN et al., 1994). Das Verhältnis der beiden Rezeptorisoformenten ist offensichtlich von erheblicher Bedeutung für die adäquate zelluläre Antwort auf einen gestagenen Stimulus (DUFFY et al., 1997; SHYAMALA et al., 1998).

Eine C-terminal weiter verkürzte Variante mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDA wurde von WEI et al. (1996, 1997) beschrieben und als PR-C bezeichnet. Sie entsteht vermutlich durch die Translation von einem weiter C-terminal gelegenen Startcodon. PR-C fehlt der erste Zinkfinger. Die Hormonbindungsdomäne sowie die Sequenzen für die Dimerisierung und die nukleäre Lokalisation sind jedoch vorhanden. Da der erste Zinkfinger fehlt, ist PR-C vermutlich nicht zur DNS-Bindung in der Lage und allein ohne transkriptionsaktivierende Aktivität. PR-C kann jedoch mit den größeren PR-Isoformen Heterodimere ausbilden und deren Transkriptionsaktivität verstärken. Auch in der Decidua basalis der Ratte wurde PR-C nachgewiesen (OGLE et al., 1997, 1998a). Die relative Abundanz dieser kürzesten PR-Isoform nimmt in der Spätgravidität gegenüber PR-A und -B zu. Die Dominanz von PR-C wird mit dem Entzug der Progesteronwirkung auf die Zellen der Decidua basalis in Verbindung gebracht. Nach PFEFFER et al. (1996) ist die Bildung von Varianten durch alternatives Splicing des Primärtranskripts innerhalb der Superfamilie der nukleären Rezeptoren nur beim ER nachweisbar. Auf mRNA-Ebene wurden jedoch ebenfalls sowohl in neoplastischen als auch in nichtneoplastischen Geweben Deletionsvarianten des Progesteronrezeptors beschrieben (LEYGUE et al., 1996). Über die biologische Bedeutung dieser Varianten liegen zur Zeit keine Informationen vor.

#### 4.2.4. Regulation der Expression von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren

Die Regulation der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren ist in mehrfacher Weise miteinander verknüpft, da sowohl Östrogene als auch Progesteron neben der Regulation des eigenen Rezeptors auch die Expression des jeweiligen anderen Rezeptors beeinflussen können. Sehr komplex wird die Situation dadurch, daß die Art dieser Beeinflussung in Abhängigkeit von einer Vielzahl verschiedener Faktoren wie Spezies, Organ, Zelltyp, Lokalisation der Zelle im Gewebeverband, endokrinem Milieu sowie Höhe und Dauer der Ligandexposition variieren kann. Hieraus ergibt sich, daß Östrogene und Progesteron sowohl synergistisch als auch antagonistisch wirken können.

In vielen bisher untersuchten Zielgeweben bzw. -zellen induzieren Östrogene sowohl die Expression ihres eigenen Rezeptors (WESTLEY und MAY, 1988; VARRIALE und TATA, 1991; BERGMAN et al., 1992; WU et al., 1996; ING und TORNESI, 1997) als auch des Progesteronrezeptors (MAY et al., 1989; ARONICA und KATZENELLENBOGEN, 1991; KRAUS und KATZENELLENBOGEN, 1993; ING und TORNESI, 1997). Es wird aber auch die Suppression des Östrogenrezeptors durch seinen Liganden beobachtet (KRAUS und KATZENELLENBOGEN, 1993; MEREDITH et al., 1994; BORRAS et al., 1996; SIMERLY et

al., 1996). Abweichungen von der Estradiol-17 $\beta$ -stimulierten Steigerung der ER-Expression ergaben sich ferner beim Einsatz supraphysiologischer Östrogendosen (BERGMAN et al., 1992). Das PR-Gen wird allgemein als ER-abhängig angesehen (SAVOURET et al., 1991; KRAUS et al., 1994). Dies beinhaltet, daß für die Vermittlung von Gestagenwirkungen über den klassischen Signalweg eine vorausgehende Östrogenexposition ("Östrogen-Priming") Voraussetzung ist. Die Expression des Progesteronrezeptors steht jedoch nicht unter alleiniger Kontrolle von Östrogenen. Vielmehr unterliegt die Steuerung der Progesteronrezeptorkonzentration einer multifaktoriellen Kontrolle, die sich aus dem Cross-Talk des ER mit intrazellulären Signalübertragungswegen ergibt. So verstärken beispielsweise Aktivatoren der Proteinkinasen A bzw. C sowie der Tyrosinkinasen über die direkte Phosphorylierung des ER oder weiterer beteiligter Faktoren die durch Estradiol-17 $\beta$  mittels des Östrogenrezeptors aktivierte Transkription abhängiger Gene. So sind auch Wachstumsfaktoren, insbesondere IGF-I, in der Lage, eine Erhöhung der Progesteronrezeptorkonzentration hervorzurufen. Die Bedeutung zusätzlicher Faktoren zeigte sich in serumfreien Kulturen von Mammakarzinomzellen, in denen Östrogene allein nicht in der Lage waren, die Expression von Progesteronrezeptoren zu induzieren (KATZENELLENBOGEN und NORMAN, 1990; ARONICA und KATZENELLENBOGEN, 1991; KATZENELLENBOGEN, 1996). Progesteron unterdrückt im allgemeinen die Expression von Östrogenrezeptoren (HSUEH et al., 1975; EVANS und LEAVITT, 1980) sowie die Expression bzw. ER-vermittelte Aufregulierung seines eigenen Rezeptors (KRAUS und KATZENELLENBOGEN, 1993; WU et al., 1996). Die Mechanismen der Suppression sind noch nicht vollständig geklärt und offensichtlich sehr komplex (KATZENELLENBOGEN, 1996).

Die suppressive Wirkung von Progesteron auf ER und PR ist jedoch nicht in allen Zelltypen zu beobachten. Eine Ausnahme stellen hier v.a. endometriale Stromazellen dar. Während in der Lutealphase die Progesteronrezeptoren in den epithelialen Anteilen herunterreguliert werden, sind sie in den Stromazellen weiterhin nahezu unvermindert vorhanden (LESSEY et al., 1988). Nach länger dauernder Progesterondominanz, wie z.B. während der Gravidität, unterliegen ER und PR offensichtlich teilweise anderen Regelmechanismen. So unterhält und stimuliert Progesteron in Deziduazellen der Ratte die Expression des wtER, während die Kombination Progesteron + Östrogene die Expression einer 49 kDa-ER-Varianten zu Lasten des wtER induziert (OGLE und GEORGE, 1995). Auch wird die Expression des Progesteronrezeptors in diesen Zellen durch Progesteron unterhalten, während Östrogenen in dieser Hinsicht weder allein noch in Kombination mit Progesteron ein Effekt zuzuordnen war (OGLE et al., 1990, 1998a). Die Stimulation der Expression von Progesteronrezeptoren durch Progesteron zeigte sich auch in Kulturen humaner endometrialer Stromazellen, wiederum erst nach längerdauernder Progesteronexposition (TSENG und ZHU, 1997). Während also ein Teil der progesteronresponsiven Zellen bei länger dauernder Progesteroneinwirkung durch Herunterregulieren des Progesteronrezeptors refraktär wird, behalten andere Zellpopulationen den Progesteronrezeptor und scheinen unter diesen Bedingungen neue Regulationsmechanismen zu erwerben. Das veränderte regulative Ver-

halten dieser Zellen ist vermutlich u.a. auch auf den modulierenden Einfluß lokaler Mediatoren zurückzuführen (OGLE und GEORGE, 1990; OGLE et al., 1990; TSENG und ZHU, 1997).

#### **4.2.5. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der Plazenta des Rindes und anderer Spezies**

Bisherige Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) in der Plazenta ergeben ein z.T. recht uneinheitliches Bild. Dies ist offensichtlich nur teilweise auf die Unterschiede bezüglich der Plazentation der untersuchten Spezies zurückzuführen. Vermutlich beeinflussen eine ganze Reihe weiterer Faktoren, wie das untersuchte Stadium der Gravidität, die Herkunft und Zusammensetzung des Probenmaterials (Lokalisation der Probenahme, Ausmaß der Trennung von fetalem und maternalem Kompartiment) sowie die Sensitivität der jeweiligen Nachweismethode das Ergebnis. Da bisherige Untersuchungen zur Expression von ER und PR in der Plazenta v.a. beim Menschen durchgeführt wurden, liegen diesbezüglich Ergebnisse im wesentlichen nur für die Frühgravidität, für den späten Zeitraum der Schwangerschaft sowie für den Zeitraum der Geburt vor. Beim Menschen besteht weitgehende Übereinstimmung hinsichtlich der ER- (KHAN-DAWOOD und DAWOOD, 1984; HILL et al., 1990) bzw. PR-Expression (KHAN-DAWOOD und DAWOOD, 1984; HILL et al., 1990; WANG et al., 1992, 1994, 1996) im maternalen Teil der Plazenta bzw. in der Dezidua. Nach PERROT-APPLANAT et al. (1994) entspricht immunhistologisch die PR-Expression im Endometrium des frühgraviden Uterus der Expression im Endometrium in der Lutealphase des Zyklus und bleibt über die gesamte Dauer der Gravidität im wesentlichen unverändert. Die ER-Expression in der Dezidua ist in der Frühgravidität gering und in der Spätgravidität kaum noch nachweisbar, wobei die fortschreitende Herunterregulierung des ER offensichtlich auf die im Verlauf der Gravidität stark ansteigenden Progesteronkonzentrationen zurückzuführen ist (PERROT-APPLANAT et al., 1994).

Auch bei verschiedenen anderen Spezies wie Pavian (HILD-PETITO et al., 1992), Kaninchen (GUERNE und STUTINSKY, 1978) und Ratte (OGLE et al., 1990, 1998a) wurden unter Anwendung unterschiedlicher Methoden im maternalen Teil der Plazenta Progesteronrezeptoren nachgewiesen. Östrogenrezeptoren konnten außer beim Menschen auch in der maternalen Plazenta von Kaninchen (GUERNE und STUTINSKY, 1978), Rhesusaffe (HALUSKA et al., 1990) und Ratte (OGLE und GEORGE, 1995; OGLE et al., 1998a) nachgewiesen werden.

Auch zur ER- bzw. PR-Expression im fetalen Teil der Plazenta stammen die bisher vorliegenden Informationen zum großen Teil vom Menschen. Hierbei ergeben sich z.T. erhebliche Widersprüche. Während ein Teil der Untersucher (RIVERA und CANO, 1989; SHI et al., 1993; WANG et al., 1996; ROSSMANITH et al., 1997; SHANKER et al., 1997) aus ihren Ergebnissen auf das Vorkommen von Progesteronrezeptoren im fetalen Teil der Plazenta schlossen, waren diese in den immunhistologischen Untersuchungen von PERROT-APPLANAT et al. (1994) und

TADDEI et al. (1996) sowie in den Ligand-Bindungsstudien von McCORMICK et al. (1981) sowie KHAN-DAWOOD und DAWOOD (1984) dort nicht nachweisbar. YOUNES et al. (1981), KNEUSSL et al. (1982), KHAN-DAWOOD und DAWOOD (1984) sowie LAMINSKI und HAMMOND (1985) berichten über den Nachweis von Östrogenrezeptoren in fetalen Anteilen der Plazenta mittels Ligandbindungsstudien, während die unter Anwendung verschiedener Methoden (ELISA, Ligandbindungsassay, Immunhistologie sowie Nachweis der ER-spezifischen mRNA mittels RT-PCR) durchgeführten Untersuchungen von RIVERA und CANO (1989), PERROT-APPLANAT et al. (1994), TADDEI et al. (1996) sowie ROSSMANITH et al. (1997) mit negativem Ergebnis verliefen. Nach RIVERA und CANO (1989) sind Ligandbindungsstudien im fetalen Teil der Plazenta aufgrund methodischer Schwierigkeiten und den dort allenfalls in äußerst niedrigen Konzentrationen vorkommenden Steroidrezeptoren nicht als alleinige Methode zur Darstellung von ER und PR in diesem Gewebe geeignet. Besondere Bedeutung ist daher den Untersuchungen von ROSSMANITH et al. (1997) sowie SHANKER et al. (1997) beizumessen, welche PR-spezifische mRNA in der fetalen Plazenta mittels RT-PCR nachweisen konnten, während sich der Northern-Blot als nicht ausreichend sensitiv erwies (SHANKER et al., 1997). Die Expression von PR in niedrigen Konzentrationen in Verbindung mit unterschiedlichen Nachweisgrenzen der angewandten Methoden kann somit als eine mögliche Erklärung für die z.T. widersprüchlichen Befunde angesehen werden. Der Nachweis ER-spezifischer mRNA im fetalen Teil der Humanplazenta mittels RT-PCR verlief dagegen mit negativem Ergebnis (ROSSMANITH et al., 1997). Somit kann eher das Vorkommen des PR als das des ER im fetalen Teil der Humanplazenta als gesichert angesehen werden. BILLIAR et al. (1997) konnten nach Kultur humaner Syncytiotrophoblasten in einem Medium mit niedrigen Östrogen- und Gestagenkonzentrationen in deren Kernen immunhistologisch Östrogenrezeptoren nachweisen, was an frisch entnommenem Gewebe nicht gelungen war. Dieser Befund spricht dafür, daß diese Zellpopulation prinzipiell Östrogenrezeptoren exprimieren kann, diese aber in vivo - wenn überhaupt - in sehr niedrigen Mengen exprimiert werden. Im Gegensatz zum menschlichen Chorion sind in Kulturen menschlicher Chorionkarzinomzellen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene ER eindeutig nachweisbar (JIANG et al., 1997). Unbeschadet der nach wie vor unsicheren Befundlage v.a. hinsichtlich des ER im fetalen Teil der Humanplazenta legen die Ergebnisse von in vitro-Versuchen nahe, daß dieses Gewebe östrogenresponsiv ist. Als wesentlicher Effekt von Östrogenen und Progesteron auf die Plazenta wird die Autoregulation der plazentaren Steroidbiosynthese (SHANKER und RAO, 1997) sowie die Regulation der plazentaren Freisetzung von GnRH und HCG (Literatur bei ROSSMANITH et al., 1997) angesehen. Aufgrund der Schwierigkeiten hinsichtlich eines eindeutigen Nachweises von ER angesichts eindeutiger Östrogeneffekte im fetalen Teil der Humanplazenta wird daher auch die Vermittlung dieser Effekte über nichtklassische Signalübertragungswege diskutiert (ROSSMANITH et al., 1997). Zur Expression des ER $\beta$  in der Plazenta des Menschen oder anderer Spezies liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Informationen zur Expression von ER und PR im fetalen Teil der Plazenta liegen bei anderen Spezies als dem Menschen bisher nur sehr spärlich vor. Bei Kaninchen (GUERNE und STUTINSKY, 1978) und Pavian (HILD-PETITO et al., 1992) waren dort keine ER bzw. PR nachweisbar. Beim Schaf wurden in der Spätphase der Gravidität sowie unter der Geburt im fetalen Teil der Plazenta mittels Northern Blot ebenfalls keine ER gefunden (WU et al., 1995). Im Chorion der Maus wurde ein dem ER strukturverwandter Orphan Receptor (s. Abschnitt 3.2.1.) identifiziert, welcher als ER Related Receptor  $\beta$  (ERR- $\beta$ ) bezeichnet wird und an ein ERE bindet. Die Liganden von ERR- $\beta$  sind bisher unbekannt, er wird nicht durch Östrogene aktiviert. ERR- $\beta$  reguliert vermutlich eine Gruppe von Genen, welche sich mit den durch Östrogene regulierten überlappt. ERR- $\beta$  ist in Chorionvorläuferzellen der Maus nur zwischen dem 6. und 8. Tag p. coitum nachweisbar. Die Inaktivierung des ERR- $\beta$ -Gens führt zu schweren Entwicklungsstörungen der Plazenta, welche mit einer gesteigerten Produktion von Trophoblastriesenzellen und dem Verschwinden der diploiden Chorionzellen einhergehen (PETTERSON et al., 1996; LUO et al., 1997).

Untersuchungen zum Vorkommen von Steroidrezeptoren in der Plazenta des Rindes liegen bisher nur punktuell vor. SAUERWEIN et al. (1989) fanden zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt mit einem modifizierten Ligand-Bindungs-Assay niedrige ER-Konzentrationen im Karunkelgewebe, während im fetalen Teil der Plazentome keine ER nachweisbar waren. KATOH (1992) fand im Ligand-Bindungstest bei 5-6 Monate graviden Kühen im Vergleich zum "gravidem Uterus" in Karunkel und Kotyledonen gleichermaßen extrem niedrige nukleäre ER-Konzentrationen. Die zytosolischen ER-Konzentrationen waren in Karunkeln, Kotyledonen und "gravidem Uterus" sehr ähnlich. Aufgrund fehlender Angaben zur Signifikanz der ermittelten Meßwerte sind diese jedoch kaum interpretierbar.

### **4.3. Eigene Untersuchungen**

#### **4.3.1. Probenmaterial und -aufbereitung**

Die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren in den Plazentomen wurden an 150, 220, 240 und 270 Tage trächtigen Rindern sowie an Tieren zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt durchgeführt. Die Gruppengröße betrug jeweils 3 Tiere. Die Plazentome von trächtigen Rindern wurden bei Schlachtungen von Tieren mit bekanntem Besamungsdatum gewonnen. Unmittelbar nach Betäubung mittels Bolzenschußapparat wurde der Uterus entfernt, eröffnet und bei einzelnen, zufällig ausgewählten, mittelgroßen, im Bereich des Fetus lokalisierten Plazentomen eine Kotyledonenarterie katheterisiert und die zugehörige Kotyledone mit 10%igem PBS-gepuffertem, neutralem Formalin perfundiert. Nach der Perfusion wurden die Plazentome entfernt und anschließend in demselben Fixans für 24 Stunden immersionsfixiert. Im Rahmen von Schnittentbindungen wurden einzelne Plazentome zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt (n=3 Tiere unmittelbar nach der Entwicklung reifer, vitaler Kälber entnommen. Die Geburt war in allen Fällen spontan nach Ablauf einer physiologischen

Gravidität eingetreten. Die Indikation für die Schnittentbindungen lautete in allen Fällen relativ bzw. absolut zu große Frucht. Die unter der Geburt gewonnenen Plazentome wurden ausschließlich immersionsfixiert. Nach Abschluß der Fixierung wurden von allen Plazentomen keil- bzw. trapezförmige Gewebestücke, welche sich über die gesamte Höhe der Plazentome erstreckten, in Paraffinersatz (Histo-Comp – Vogel, D-36396 Giessen) eingebettet.

#### 4.3.2. Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors

Zur immunhistologischen Darstellung des Progesteronrezeptors wurde als Primärantikörper der murine monoklonale Antikörper 10A9 (Immunotech, D-20010 Hamburg) eingesetzt, welcher die 12 N-terminalen Aminosäuren 922-933 des humanen PR erkennt. Von den eingebetteten Gewebelöcken wurden ca. 3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf APES-beschichtete Objektträger aufgezogen. Beim Schneiden wurde die Schnittebene so gewählt, daß die keil- bzw. trapezförmigen Schnitte sich über die gesamte Höhe der Plazentome erstreckten. Die Schnitte wurden zunächst über Nacht bei 37°C getrocknet, dann 2 x 15 Minuten in Xylol entparaffiniert und über eine Äthanolreihe rehydriert (Inkubation für 2 x je 10 Minuten in reinem Äthanol, danach je 5 Minuten in 96%igem, 80%igem, 70%igem bzw. 50%igem Äthanol; anschließend Inkubation für jeweils 5 Minuten in Aqua dest. und PBS-Puffer pH 7.2). Zur Demaskierung der Epitope wurde eine Mikrowellenbehandlung der Schnitte angewandt. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten in 10 mM Zitratpuffer pH 6.0 bei Raumtemperatur äquilibriert und anschließend nach Verbringen in Zitratpuffer, welcher zuvor in einem Mikrowellengerät bis zum Kochen vorerhitzt wurde, für 3 x 5 Minuten im Mikrowellengerät bei 800 W erhitzt. In den Pausen wurde der durch Verdunstung verlorene Anteil des Zitratpuffers durch Aqua dest. aufgefüllt. Nach Abschluß der Mikrowellenbehandlung und einer anschließenden 10-minütigen Abkühlphase wurden die Schnitte zunächst in Aqua dest. (2 x 2 Minuten), dann in PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten) gespült. Zur Inaktivierung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte dann für 20 Minuten in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS pH 7.2 inkubiert. Danach wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch eine 30-minütige Überschichtung mit 10%igem inaktiviertem Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) in PBS blockiert. Nach der Entfernung der Blockierungslösung wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper überschichtet und für 20 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach dem Absaugen und Waschen mit PBS-Puffer (3 x 5 Minuten) wurden der biotinylierte Sekundärantikörper (Pferd-anti-Maus-IgG – Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) 1:200 in PBS verdünnt aufgetragen und die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden sie mit Streptavidin-Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) überschichtet, für 30 Minuten inkubiert und gewaschen (3 x 5 Minuten in PBS Puffer). Danach folgte die 5-minütige Inkubation der Schnitte in der Substratlösung, bestehend aus 0.05% Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Dihydrat und 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM Imidazol-HCl-Puffer pH 7.08. Schließlich wurden die

Schnitte 3 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen, mit Hämatoxylin leicht gegengefärbt und in Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck KGaA, D-64271 Darmstadt) eingedeckt. Als positive Kontrolle diente der Uterus eines Kalbes. Als negative Kontrolle wurden von jedem Block Schnitte im Test mitgeführt, bei denen der Primärantikörper durch PBS pH 7.2 bzw. durch einen irrelevanten monoklonalen Antikörper desselben Isotyps (7TF-1F5 – Coulter Immunotech Diagnostics, D-47807 Krefeld) ersetzt wurde.

### **4.3.3. Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors**

#### **4.3.3.1. Untersuchungen zur Auswahl der Primärantikörper**

In Vorversuchen, deren Ziel die Auswahl eines geeigneten Primärantikörpers zum immunhistologischen Nachweis des ER in Paraffinschnitten von Rinderplazentomen war, wurden aus einer Reihe getesteter Antikörper zunächst die monoklonalen Antikörper HT277<sup>1</sup> und 1D5 (BioGenex/DCS, D-22397 Hamburg) ermittelt, welche im als positive Kontrolle verwendeten Endometrium eines Kalbes spezifische Signale erzeugten (s. Abbildung 1): deutlich positive nukleäre und zytoplasmatische Reaktionen fanden sich in allen Zellen der Drüsenepithelien. Weiterhin waren mäßig bis deutlich positive, jedoch überwiegend nukleäre Signale in einem Teil der endometrialen Stromazellen vorhanden. Bei ersten Versuchen an Plazentomen unter Verwendung dieser beiden Klone fielen dort allerdings erhebliche qualitative Unterschiede im Reaktionsmuster auf (s. Abschnitte 4.4.2.1. und 4.4.2.2.): während sich mit 1D5 positive Reaktionen ausschließlich im Karunkelstroma zeigten, ergaben sich mit HT277 zusätzlich positive Signale in der Mehrzahl der Karunkelepithelzellen. Daher wurde zur Absicherung der Befunde die Palette der Primärantikörper um die gegen den bovinen ER erzeugten monoklonalen Antikörper AER311 und AER314 (NeoMarkers/Dunn Labortechnik, D-53567 Asbach) erweitert. Die Charakteristika aller vier eingesetzten Primärantikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Erste Versuche unter Verwendung von AER311 bzw. AER314 zeigten, daß das Reaktionsmuster von AER311 dem von HT277, das von AER314 dem von 1D5 entsprach. Nachdem die Betrachtung der jeweiligen Epitope der vier Antikörper einen Zusammenhang zwischen deren Lokalisation im ER-Molekül und der Divergenz der Reaktionsmuster vermuten ließ (1D5 und AER311: Lokalisation der Epitope im N-Terminus; HT277 und AER311: Lokalisation der Epitope im C-Terminus), wurden für die weiteren Untersuchungen 1D5 als Vertreter der N-terminal gerichteten Antikörper und AER311 als Vertreter der C-terminal gerichteten Antikörper ausgewählt. Mit diesen beiden Antikörpern wurden von jedem Versuchstier mindestens je ein Plazentom untersucht. Immunhistologische Präparate unter Verwendung der beiden übrigen Antikörper HT277 bzw. AER314 wurden stichprobenartig zu Vergleichszwecken angefertigt.

---

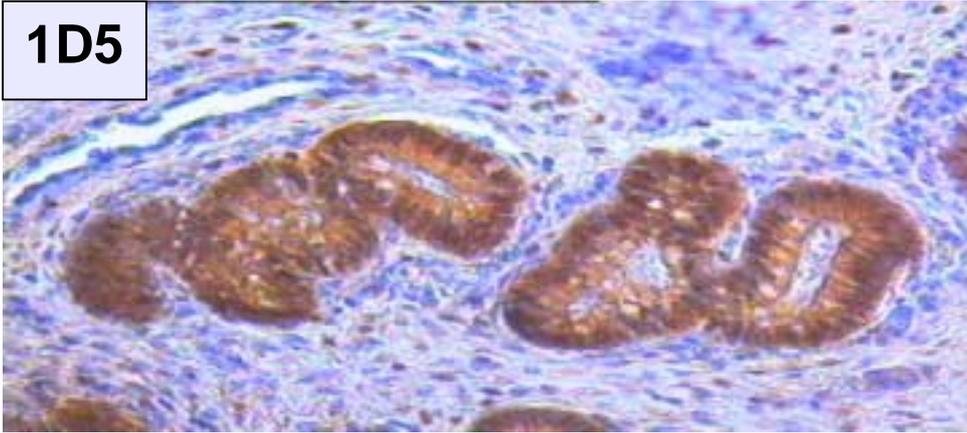
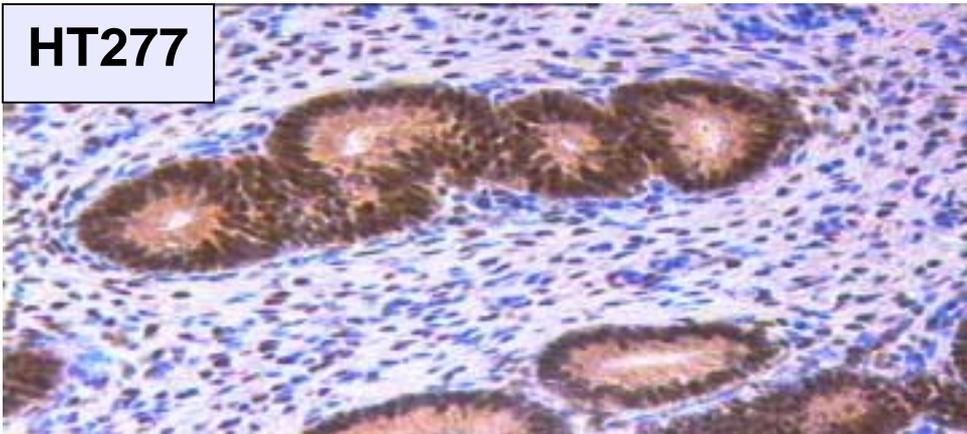
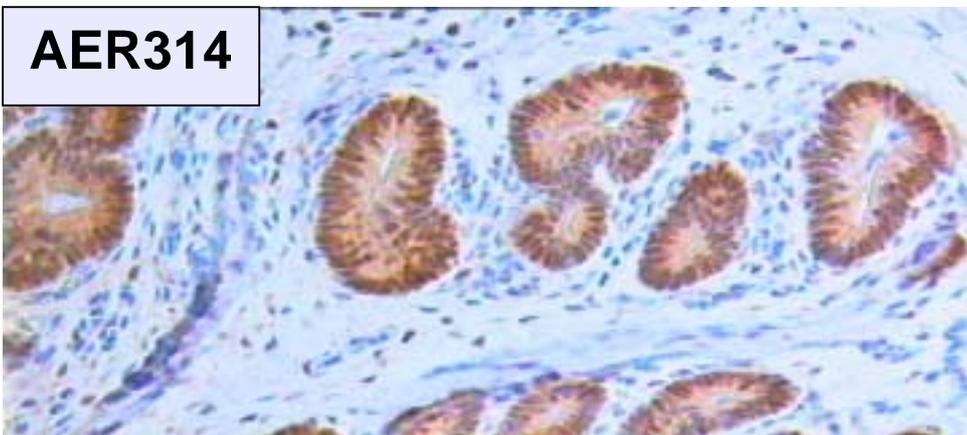
<sup>1</sup> Für die Überlassung des monoklonalen Antikörpers HT277 sei Herrn Dr. Hubert Thole, ehemals Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover, herzlich gedankt.

Tabelle 2: Liste der zur immunhistologischen Darstellung von Östrogenrezeptoren (ER) in den Plazentomen des Rindes eingesetzten Primärantikörper

Antikörper	<b>1D5</b>	<b>AER314</b>	<b>AER311</b>	<b>HT277</b>
Spezies	Maus	Maus	Maus	Maus
Ig-Klasse	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG
Immunogen	rekombinanter humaner ER	SDS-denaturierter ER aus Kalbsuterus	SDS-denaturierter ER aus Kalbsuterus	porciner ER
Epitop	innerhalb der A/B-Domäne <sup>1</sup>	Aminosäuren 120-170 (Domäne B)	Aminosäuren 495-595 (Domäne E/F)	Aminosäuren 532-546 (Domäne E)
Quelle	BioGenex/DCS, D-22397 Hamburg)	NeoMarkers/Dunn Labortechnik, D-53567 Asbach	NeoMarkers/Dunn Labortechnik, D-53567 Asbach	Dr. H. Thole Max-Planck Inst. f. exp. Endokrinol., Hannover

1) AL SAATI et al., 1993

Abb. 1: Reaktionsmuster der vier zur Darstellung des Östrogenrezeptors in den Rinderplazentomen verwendeten monoklonalen Primärantikörper 1D5, HT277, AER311 und AER314 in einem als positive Kontrolle eingesetzten Endometrium eines Kalbes. Übereinstimmend ergaben sich mit allen vier Antikörpern deutlich positive Reaktionen sowohl in epithelialen Zellen als auch in Stromazellen, wobei in den Drüsenepithelzellen das Signal sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert war, während in Stromazellen das nukleäre Signal bei weitem überwog.

**1D5****HT277****AER311****AER314**

#### 4.3.3.2. Färbeprotokoll

Das immunhistologische Verfahren zum Nachweis des ER ist weitgehend identisch mit der in Abschnitt 4.3.2. beschriebenen Methode zur Darstellung des PR und verlief - abgesehen von kleineren Modifikationen - für die vier eingesetzten Primärantikörper analog:

1. Entparaffinierung der ca. 3  $\mu\text{m}$  dicken Gewebeschnitte über 2 x 20 Minuten in Xylol.
2. Rehydrierung der Schnitte in einer Äthanolreihe: Inkubation für 2 x je 10 Minuten in reinem Äthanol, danach je 5 Minuten in 96%igem, 80%igem, 70%igem bzw. 50%igem Äthanol; anschließend Inkubation für jeweils 5 Minuten in Aqua dest. und PBS-Puffer pH 7.2.
3. Mikrowellenbehandlung zur Demaskierung der Epitope:
  - a) Äquilibration für 5 Minuten in 10 mM Zitratpuffer pH 6.0 bei Raumtemperatur.
  - b) Mikrowelleninkubation: 3 x 5 Minuten bei 800 W; in den Inkubationspausen Auffüllen des durch Verdunstung verlorenen Anteils des Zitratpuffers durch Aqua dest.
  - c) Abkühlung auf Raumtemperatur (10 Minuten).
4. Waschen in Aqua dest. (2 x 2 Minuten), dann in PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten; nicht bei den Antikörpern 1D5 und AER314).
5. Inaktivierung der endogenen Peroxidase: 20-minütige Inkubation in PBS/0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HT277) bzw. 5-minütige Inkubation in 2%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /A. dest (1D5, AER311, AER314).
6. Waschen in PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten).
7. Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Inkubation der Schnitte in PBS-Puffer/10% inaktiviertes Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) für 30 Minuten.
8. Auftragen der jeweiligen Primärantikörper in den folgenden Verdünnungen in PBS-Puffer pH 7.2: 1D5: 1:30; AER314: 1:50; AER311: 1:80; HT277: 1:100; anschließend Inkubation für 20 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer.
9. Absaugen und Waschen mit PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten).
10. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers (Pferd-anti-Maus-IgG, Vector Laboratories CA94010 Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.
11. Absaugen der Sekundärantikörper-Lösung und Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in PBS-Puffer pH 7.2).
12. Überschichten der Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Vector Laboratories CA94010 Burlingame, USA) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.
13. Absaugen und Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in PBS-Puffer pH 7.2).
14. Inkubation der Schnitte in der Substrat-Lösung (0.05% Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Dihydrat/0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 50 mM Imidazolpuffer pH 7.08).
15. Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in A. dest).
16. Leichte Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin.
17. Eindecken in Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck KgaA, D-64271 Darmstadt).

Als negative Kontrolle wurden von jedem Block Schnitte im Test mitgeführt, bei denen der jeweilige Primärantikörper durch PBS pH 7.2 bzw. durch einen irrelevanten monoklonalen Antikörper desselben Isotyps ersetzt wurde. Als Kontrollantikörper für die Klone AER314, HT277 und 1D5 wurde ein muriner monoklonaler IgG1-Antikörper eingesetzt, welcher gegen das  $\alpha$ -Toxin von *Clostridium perfringens* gerichtet war<sup>2</sup>. Als Isotypenkontrolle für den Klon AER311 diente der murine IgG1-Antikörper 7TF-1F5 (Coulter Immunotech Diagnostics, D-47807-Krefeld).

#### **4.3.4. Quantitative bzw. semiquantitative immunhistologische Erfassung der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptorexpression in den Plazentomen**

Zur quantitativen Erfassung der PR- bzw. ER-Expression im Karunkelstroma wurde für die beiden Rezeptortypen jeweils die prozentuale Verteilung in positive bzw. –negative Karunkelstromazellen (KSZ) bestimmt. Dazu wurden von jedem Plazentom drei Schnitte nach den in den Abschnitten 4.3.2. bzw. 4.3.3.2.<sup>3</sup> beschriebenen immunhistologischen Verfahren gefärbt und wie im folgenden beschrieben analysiert. Um den Einfluß der Lokalisation innerhalb des Plazentomes zu untersuchen, erfolgte die Auswertung der die gesamte Höhe der Plazentome umfassenden Schnitte getrennt nach drei gleich breiten, parallel zur Oberfläche des Plazentoms gezogenen Zonen, die wie folgt definiert wurden:

Z I: oberflächliche Zone, der Chorionplatte am nächsten gelegen;

Z II: intermediäre Zone;

Z III: tiefe Zone, dem Karunkelstiel am nächsten gelegen.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung, wobei die Einstufung der KSZ als positiv bzw. negativ durch dieselbe Person in allen Fällen unter Hinzuziehung des entsprechenden negativen Kontrollschnittes erfolgte. In jedem Schnitt wurden pro Zone zunächst zwei willkürlich ausgewählte Gesichtsfelder ausgewertet, indem die Zahl der positiven KSZ sowie die Gesamtzahl der KSZ ausgezählt wurden. Unterschritt in einer Zone die so ermittelte Gesamtzahl der KSZ die Zahl 200, so wurde die Zahl der vollständig ausgewerteten Gesichtsfelder solange erhöht, bis diese Grenze überschritten wurde. Aus der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen und der Anzahl der positiven Zellen wurde der Prozentsatz der positiven Zellen errechnet. Eine semiquantitative Beurteilung der Östrogenrezeptorexpression im Karunkelepithel, in dem sich mit Ausnahme der in unmittelbarer Nähe der Chorionplatte bzw. von großen Chorionzotten gelegenen Bereichen positive Reaktionen in allen Zellen maternalen Ursprungs fanden, wurde unter Verwendung des Antikörpers AER311 durchgeführt. Dazu wurde für jedes Tier die mittlere Färbeintensität der ER-positiven Karunkelepithelzellkerne an drei von je einem Plazentom ent-

---

<sup>2</sup> Dieser Antikörper wurde freundlicherweise vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, bereitgestellt.

<sup>3</sup> Für die quantitative immunhistologische Erfassung der ER-Expression in den Karunkelstromazellen wurde der Primärantikörper 1D5 verwendet.

stammenden Schnitten bei 200-facher Vergrößerung visuell beurteilt und einer der folgenden Kategorien zugeordnet: +++ = intensives Signal; ++ = deutliches Signal; + = schwaches Signal.

#### **4.3.5. Versuchsaufbau und statistische Auswertungen**

##### **4.3.5.1. Quantitative Erfassung der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie)**

Zur quantitativen Erfassung des Verlaufs der PR- bzw. ER-Expression im Karunkelstroma in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe sowie der Lokalisation innerhalb des Plazentoms (Zone I-III) wurde von jedem der jeweils 3 Versuchstiere des 150., 220., 240. und 270. Graviditätstages sowie von 3 Tieren unter der termingerechten Geburt je ein willkürlich ausgewähltes Plazentom wie in Abschnitt 4.3.4. beschrieben analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde entsprechend dem Versuchsaufbau eine vierfache hierarchische Varianzanalyse nach dem gemischten Modell (BMDP8V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) durchgeführt, welche folgende vier Haupteffekte beinhaltet:

- a) Versuchsgruppe (G) - fixer Effekt;
- b) Tier innerhalb der Versuchsgruppe (T[G]) - zufälliger Effekt;
- c) Schnitt innerhalb des Tieres (S[TG]) - zufälliger Effekt;
- d) Zone (Z) - fixer Effekt.

Weiterhin wurde folgende Wechselwirkungen in das statistische Modell einbezogen:

- a) G x Z (fixer Effekt);
- b) T[G] x Z (zufälliger Effekt);
- c) S[TG] x Z (zufälliger Effekt).

##### **4.3.5.2. Quantitative Untersuchungen zur Variabilität der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma (horizontale Studie)**

Bedingt durch die begrenzte Verfügbarkeit von Probenmaterial wurde in Abschnitt 4.3.5.1. pro Tier nur jeweils ein Plazentom quantitativ analysiert. Zur Abschätzung der Variabilität hinsichtlich des Prozentsatzes PR- bzw. ER-positiver KSZ zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums wurden von einer 270 Tage tragenden Kuh 5 Plazentome wie in Abschnitt 4.3.1. beschrieben entnommen und fixiert. Bei der Probenentnahme wurden deren maximaler Durchmesser und die Lokalisation innerhalb des Uterus registriert. Jedes dieser fünf Plazentome wurde nach dem im Abschnitt 4.3.4. beschriebenen Verfahren analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde zunächst eine Varianzzerlegung mittels dreifaktorieller hierarchischer Analyse nach dem gemischten Modell (BMDP8V - DIXON, 1993) durchgeführt, welche folgende drei Effekte beinhaltet:

- a) Plazentom (P) - zufälliger Effekt;
- b) Schnitt innerhalb des Plazentoms (S[P]) - zufälliger Effekt;

c) Zone (Z) - fixer Effekt.

Im Fall einer signifikant positiven Streuung der Meßwerte zwischen den Plazentomen wurde mittels einer Kovarianzanalyse mit der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser* auf einen Zusammenhang zwischen der Plazentomgröße und dem Prozentsatz positiver KSZ untersucht.

#### **4.3.6. Reagenzien, Chemikalien, Geräte und Lösungen**

##### **4.3.6.1. Reagenzien und Chemikalien**

###### **BioGenex/DCS, D-22397 Hamburg**

Monoklonaler anti-Östrogenrezeptor (Mensch)-Antikörper 1D5

###### **Carl Roth GmbH + Co, D-76185 Karlsruhe**

Äthanol 99.6% DAB10

###### **Coulter Immunotech Diagnostics, D-47807 Krefeld**

Isotypspezifischer monoklonaler Kontrollantikörper 7TF-1F5 (Maus-IgG1)

###### **Fluka Chemie AG, CH-9471 Buchs**

3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)

###### **Immunotech, D-20010 Hamburg**

Monoklonaler anti-Progesteronrezeptor (Mensch)-Antikörper 10A9

###### **Merck KgaA, D-64271 Darmstadt**

Kaisers Glyzerin-Gelatine

Wasserstoffperoxid 30%

###### **Merck-Schuchardt, D-85662 Hohenbrunn**

Xylol zur Synthese

###### **Neomarkers/Dunn-Labortechnik, D-53567 Asbach**

Monoklonaler anti-Östrogenrezeptor (Rind)-Antikörper AER311

Monoklonaler anti-Östrogenrezeptor (Rind)-Antikörper AER314

###### **SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, D82039 Deisenhofen**

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid Dihydrat

###### **Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA**

Pferd-anti-Maus-IgG, biotinyliert

Pferde-Normalserum S-2000

Streptavidin-Peroxidase-Komplex

###### **Vogel, D-63396 Giessen**

Histo-Comp (Paraffinersatz)

**4.3.6.2. Geräte****Moulinex GmbH, D-42719 Solingen**

Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50

**4.3.6.3. Lösungen****PBS-Puffer pH 7.2**

NaCl	7.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43
Aqua dest.	ad 1000 ml

**PBS-gepuffertes neutrales Formalin**

Formol (40%)	500 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32.5 g
Aqua dest.	ad 5000 ml

**50 mmol Imidazolpuffer pH 7.08**

Imidazol	8.51 g
Aqua dest.	ad 2000 ml

pH-Wert mit HCl auf 7.08 einstellen.

**DAB-Substratlösung**

50 mmol Imidazolpuffer pH 7.08	200 ml
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	0.1 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% ig)	70 µl

Direkt frisch vor Gebrauch ansetzen und filtrieren.

**10 mmol Zitratpuffer pH 6.0**

Lösung A:

C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.101 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Lösung B:

C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.941 g
Aqua dest.	ad 100 ml

9 ml Lösung A und 41 ml Lösung B mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen.

#### 4.4. Ergebnisse

##### 4.4.1. Progesteronrezeptor

##### 4.4.1.1. Reaktionsmuster des immunhistologischen Progesteronrezeptornachweises in den Plazentomen

Zu allen Untersuchungsstadien zeigten sich in einem Teil der Zellen des Karunkelstromas positive Reaktionen, wobei das Antigen fast ausschließlich in den Kernen lokalisiert war. Die Abbildungen 2-5 zeigen repräsentative Beispiele aus einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes. Gleichartige Reaktionsmuster fanden sich in allen Plazentomen gravider Tiere. Die positiven Reaktionen erstreckten sich auf alle Stroma-Anteile der Karunkeln inklusive Karunkelstiel. PR-positive bzw. -negative Karunkelstromazellen waren im Lichtmikroskop morphologisch nicht zu unterscheiden. Hinsichtlich der durchschnittlichen Färbeintensität der Kerne PR-positiver Karunkelstromazellen waren visuell keine Veränderungen in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium feststellbar. Unter der Geburt erschien das Signal hinsichtlich der Intensität homogener und intensiver (s. Abbildung 6). Außer in den Bindegewebszellen des Karunkelstromas waren PR-positive Reaktionen zu allen Untersuchungsstadien in den Kernen von sichelförmigen Zellen nachweisbar, welche in maternalen Septen den dort vorhandenen Kapillaren unmittelbar angelagert waren (s. Abbildung 4). Diese Reaktionen waren v.a. in den freien Rändern oberflächlich gelegener Karunkelsepten regelmäßig anzutreffen. Hierbei handelt es sich offensichtlich um Perizyten. In den Kapillarendothelien selbst waren dagegen keine eindeutig positiven Reaktionen nachweisbar. Unter der Geburt fanden sich zusätzlich positive nukleäre Reaktionen in den Wänden von Arterien (s. Abbildung 7), wobei das Signal sowohl bezüglich der Intensität als auch der Häufigkeit von innen nach außen zunahm. Im fetalen Teil der Plazentome waren keine positiven Reaktionen nachweisbar.

Abbildung 2: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes. Diagonal durch den Bildausschnitt verläuft ein primäres Karunkelseptum. Beiderseits sind Anschnitte vor Chorionzotten, umgeben von feinen Karunkelsepten, erkennbar. Positive Reaktionen finden sich ausschließlich in Kernen von Zellen des Karunkelstromas (Vergrößerung: x200).

Abbildung 3: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes. Abgebildet ist der Querschnitt einer Chorionzotte, ringförmig umgeben von feinen Karunkelsepten. Positive Reaktionen finden sich ausschließlich in Kernen von Zellen des Karunkelstromas, während das Karunkel epithel, die Hauptzellen des Trophoblasten, die Trophoblastriesenzellen und das Zottenstroma negativ reagieren (SC = Stroma der Chorionzotte; \* = Trophoblastriesenzellen; ↓ = Karunkel epithel; Vergrößerung: x360).

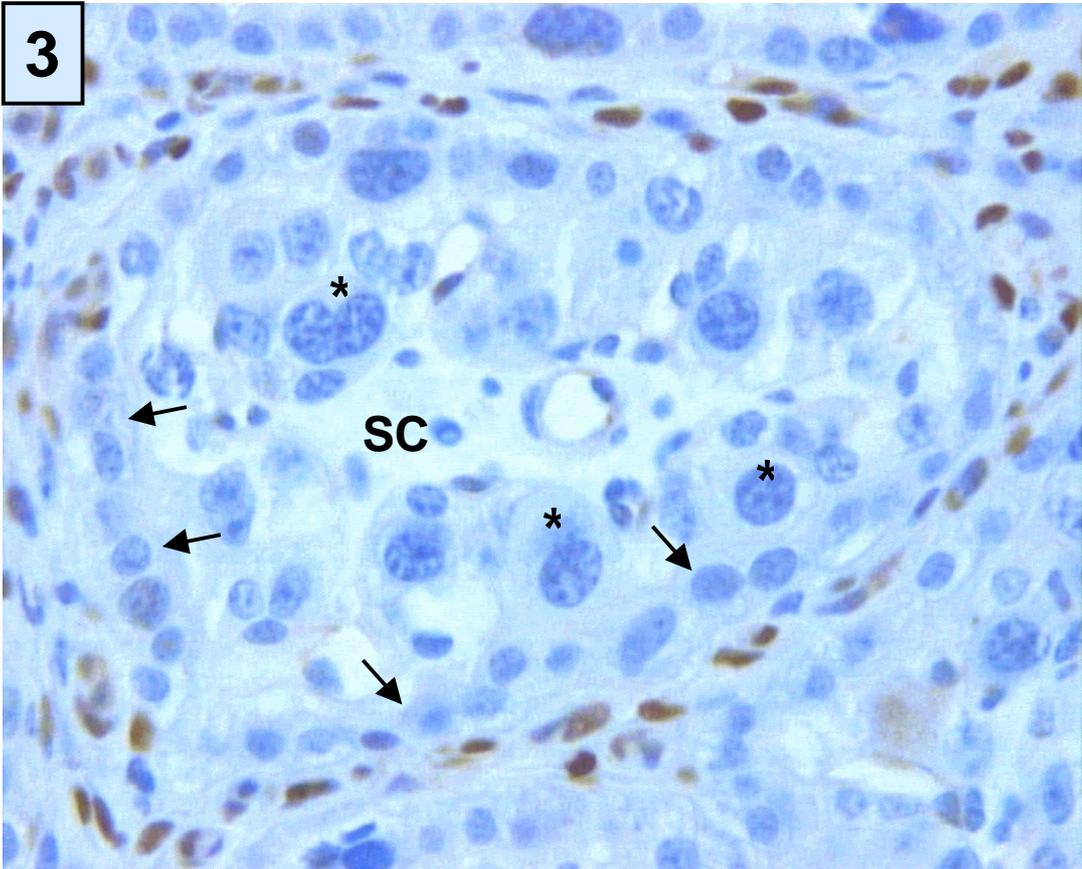
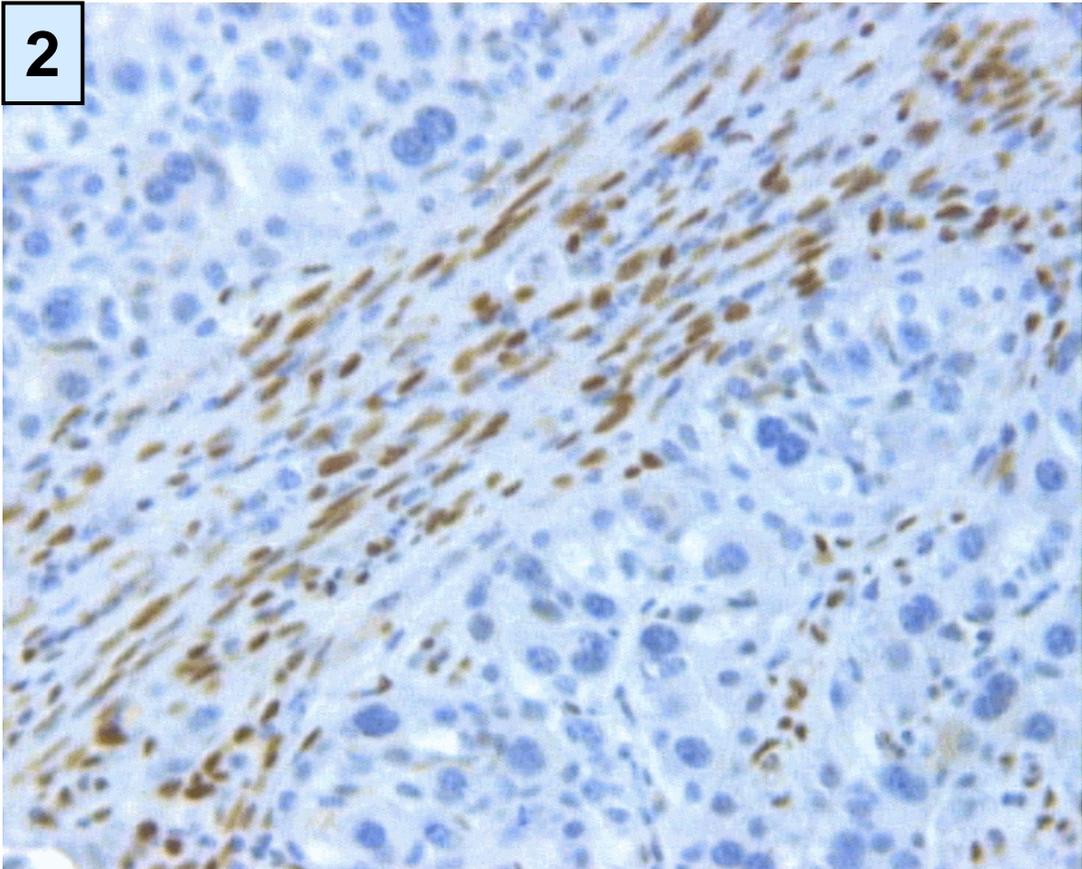
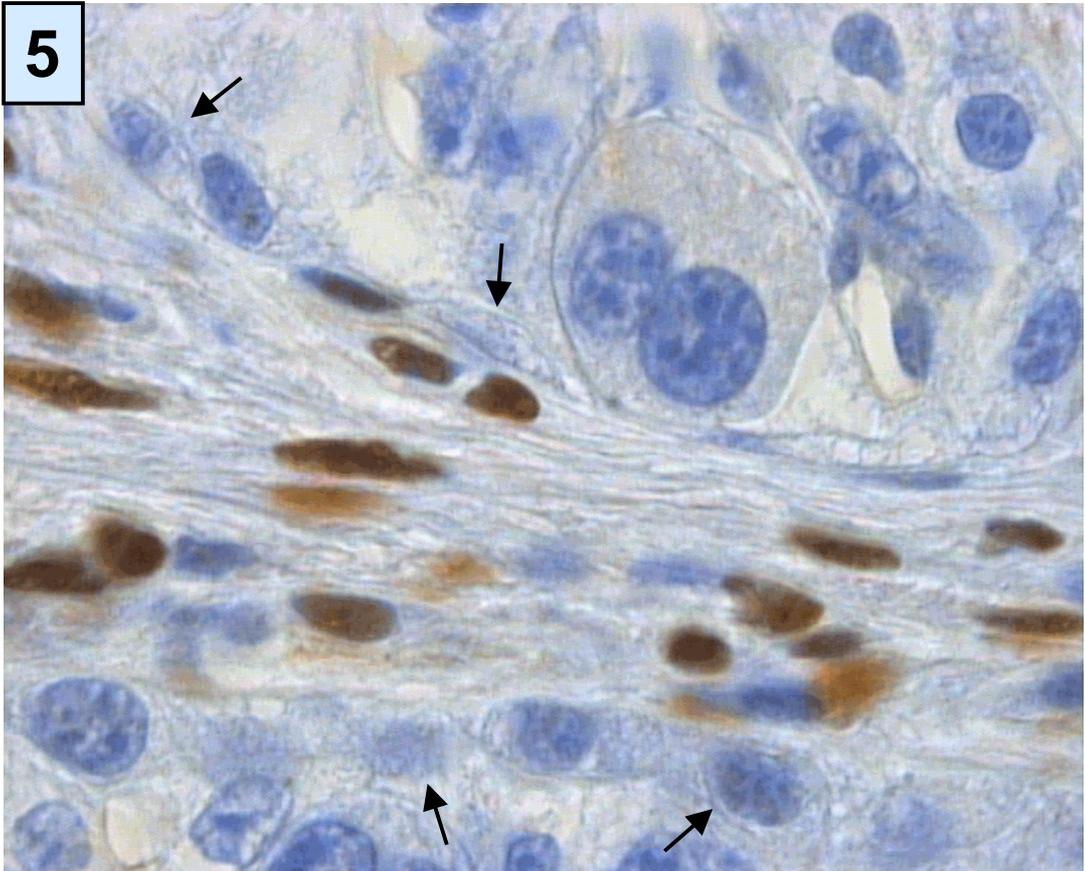
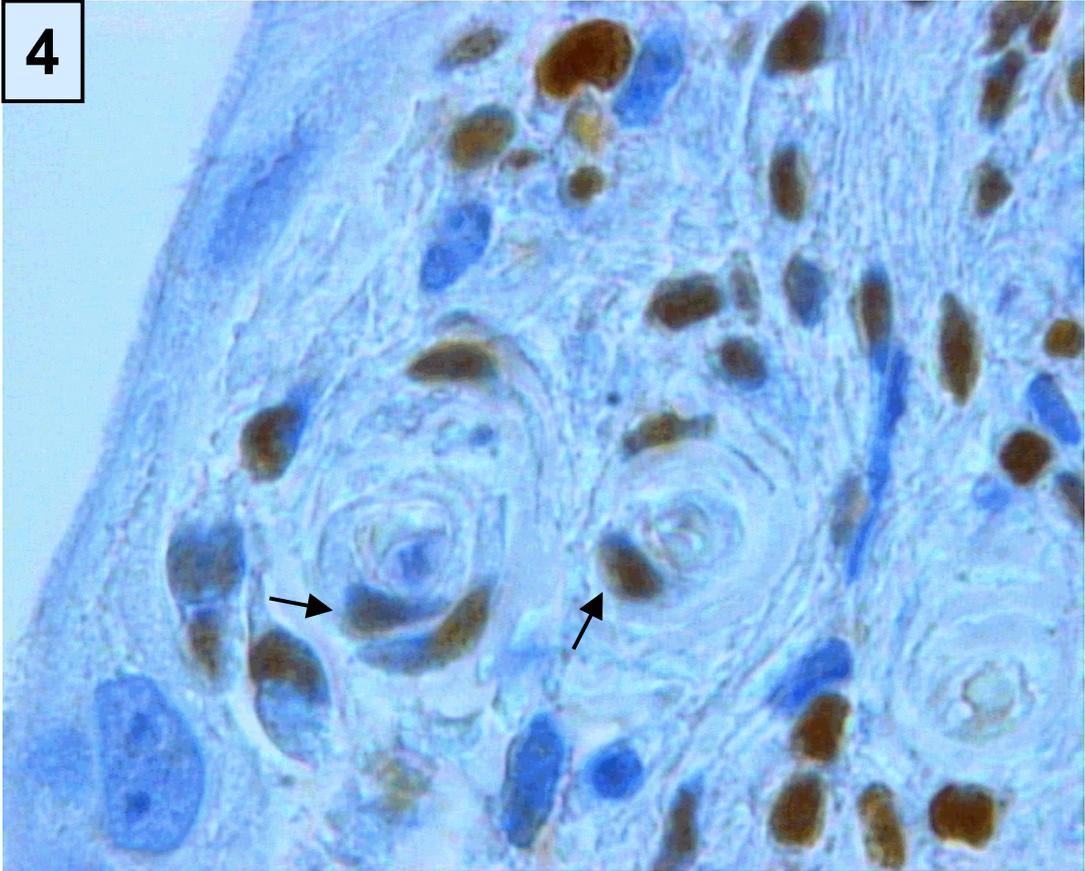
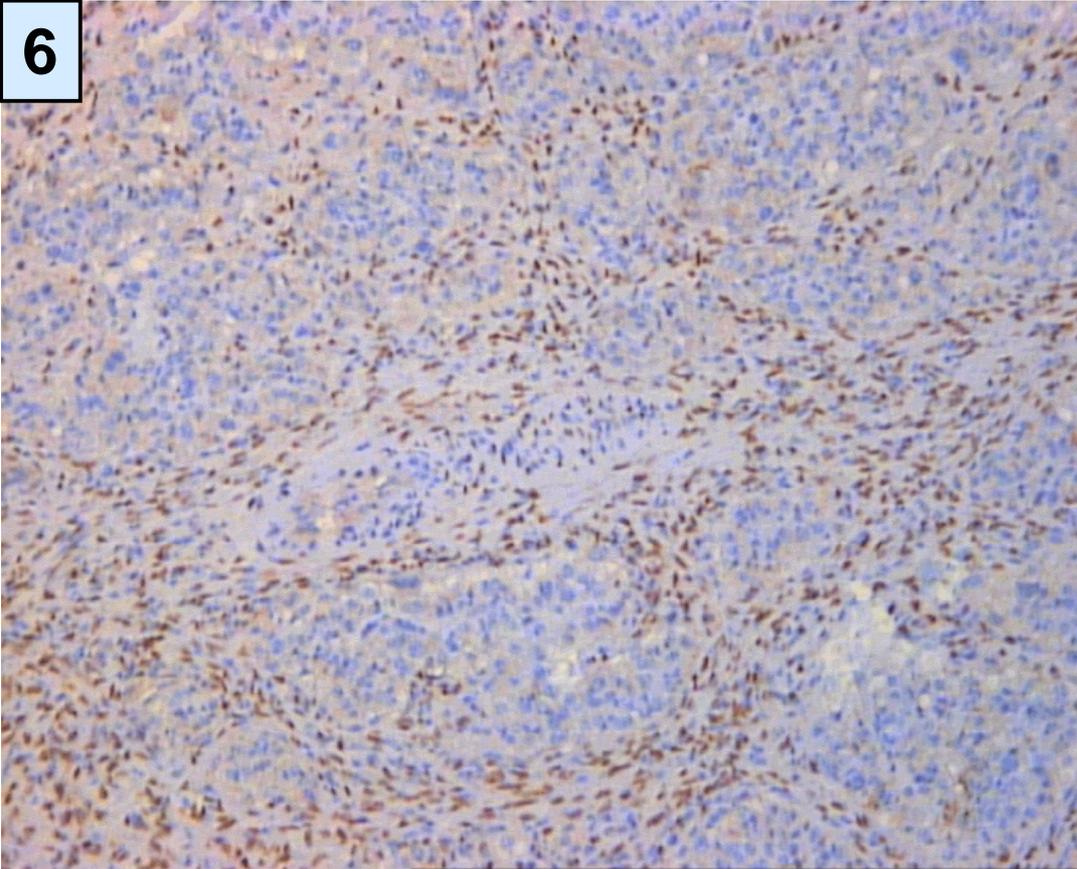


Abbildung 4: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes. Positive nukleäre Reaktionen (↓) in Perizyten von Kapillaren im verbreiterten freien Rand eines oberflächlich gelegenen Karunkelseptums (Vergrößerung: x1100, Ölimmersion).

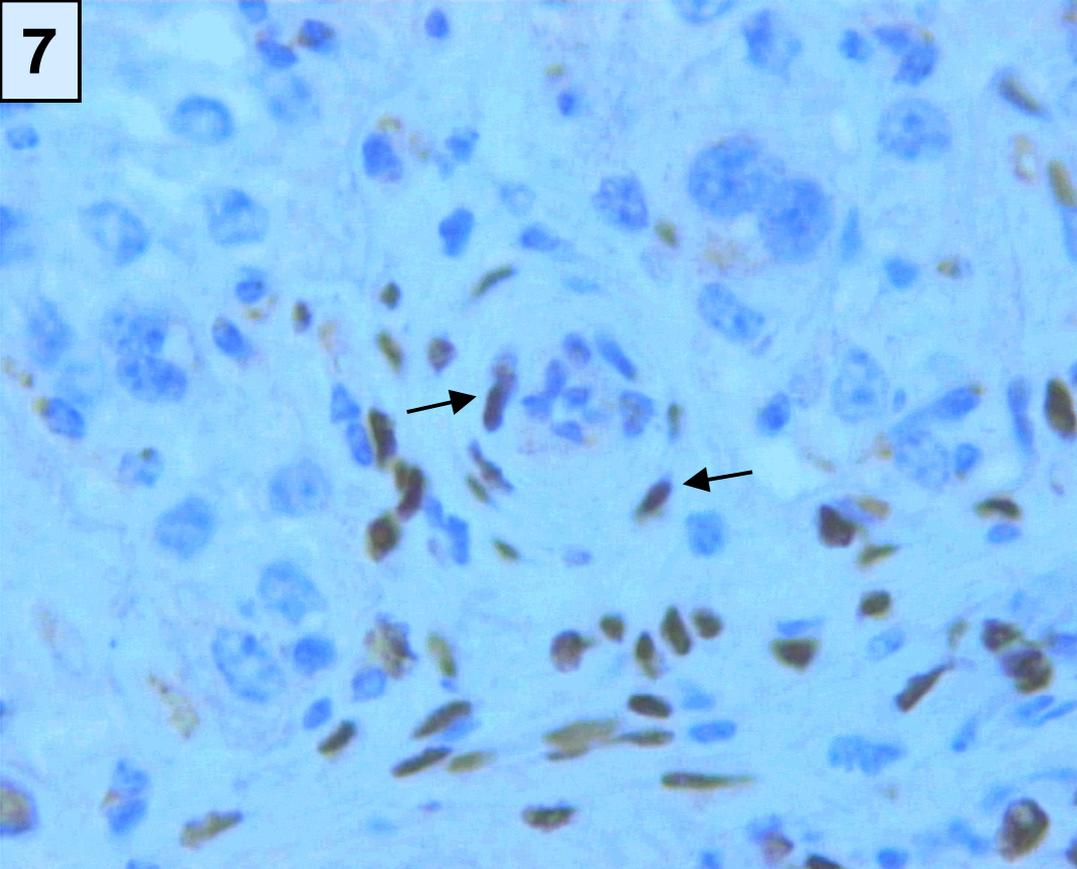
Abbildung 5: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes. Quer durch den Bildausschnitt verläuft ein feines Karunkelseptum mit positiven nukleären Signalen in den Stromazellen. Oberhalb der Bildmitte ist eine ins Karunkelepithel eingewanderte zweikernige Trophoblastriesenzelle mit direktem Kontakt zur Basalmembran des Karunkelepithels erkennbar (↓ = Karunkelepithel; Vergrößerung: x800, Ölimmersion).



6



7



#### 4.4.1.2. Progesteronrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie)

Der Anteil PR-positiver Karunkelstromazellen stieg über die Zonen I-III gemittelt vom 150. Graviditätstag zur Geburt hin geringfügig von  $51.8 \pm 2.6\%$  auf  $58.9 \pm 1.8\%$  an (s. Abbildung 8). Statistisch ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zonen absichern ( $p < 0.01$ ; s. Tabelle 3), wobei der Prozentsatz PR-positiver Karunkelstromazellen in der Zone II niedriger war als in den Zonen I und III. Zwischen den Versuchsgruppen ergab sich jedoch in der vierfaktoriellen Varianzanalyse kein statistisch signifikanter Unterschied. Da die statistische Signifikanz möglicherweise durch die getrennte Betrachtung der Zonen verfehlt wurde, wurden die Daten der Zonen I-III gepoolt und eine Kovarianzanalyse mit Meßwiederholung im Faktor Zone (BMDP2V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) und der Trächtigkeitsdauer als Kontrollvariable durchgeführt. Dies war trotz des statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den Zonen zulässig, da der Zonenunterschied unabhängig vom Untersuchungsstadium war ( $p$  (Versuchsgruppe x Zone)  $> 0.05$ ). Die Geburtsgruppe musste aus dieser Analyse aufgrund der natürlichen Streuung der Trächtigkeitsdauer ausgeschlossen werden. Bei dieser statistischen Analyse ergab sich für den Zeitraum zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag ein signifikanter Einfluß des Trächtigkeitsstadiums auf den Prozentsatz PR-positiver KSZ ( $p < 0.05$ ), wobei ein linearer Trend mit einem Steigungsfaktor von  $0.048\%/Tag$  bestätigt werden konnte.

Tabelle 3: Quantitative Erfassung der Progesteronrezeptor-Expression im Karunkelstroma: Ergebnisse der vierfaktoriellen Varianzanalyse (s. Abschnitt 4.3.5.1.).

Einflußgröße/Wechselwirkung	p-Wert
Versuchsgruppe	0.1838
Zone	0.0048
Tier	0.0001
Versuchsgruppe x Zone	0.8724

Abbildung 6: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors in einem Plazentom eines Rindes zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt. Deutlich erkennbar sind positive nukleäre Reaktionen im Stroma der unter der Geburt erheblich verbreiterten Karunkelsepten (Vergrößerung: x80).

Abbildung 7: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors in einem Plazentom eines Rindes zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt. Neben den Bindegewebszellen des Karunkelstromas und den Kapillarperizyten (im Bildausschnitt nicht vorhanden) weisen unter der Geburt auch die Wände kleinerer Arterien gelegentlich positive nukleäre Reaktionen (↓) auf (Vergrößerung: x440).

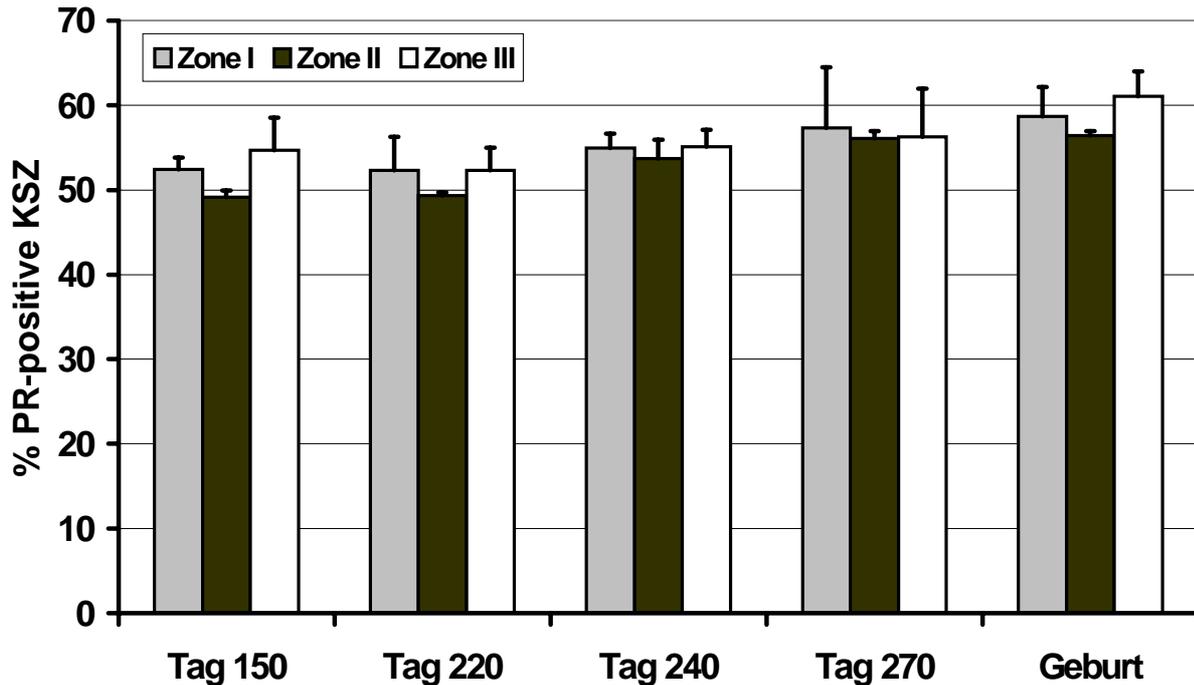


Abbildung 8: Quantitative Erfassung des Anteils immunhistologisch Progesteronrezeptor (PR)-positiver Karunkelstromazellen (KSZ) in Abhängigkeit vom Untersuchungsstadium und von der Lokalisation (Zone I-III) innerhalb des Plazentoms.

Zone I: oberflächliche Zone, der Chorionplatte am nächsten gelegen

Zone II: intermediäre Zone

Zone III: tiefe Zone, dem Karunkelstiel am nächsten gelegen

#### 4.4.1.3. Variabilität der Progesteronrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen verschiedenen Plazentomen eines Tieres (horizontale Studie)

Zur Abschätzung der Variabilität des Prozentsatzes Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellen zwischen den Plazentomen eines Individuums wurden fünf Plazentomen unterschiedlicher Größe und Lokalisation einer 270 Tage trächtigen Kuh analysiert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Varianzzerlegung ergab eine signifikant positive Streuung ( $p < 0.001$ ) zwischen den Plazentomen. Signifikante Unterschiede zwischen den Zonen I-III konnten im Gegensatz zur longitudinalen Studie (vergl. Abschnitt 4.4.1.2.) bei den fünf Plazentomen dieses Einzeltieres nicht festgestellt werden, sodaß bei der Kovarianzanalyse mit der Kontrollvariablen „maximaler Plazentomdurchmesser“ auf eine getrennte Betrachtung der Zonen verzichtet werden konnte. Die Kovarianzanalyse ergab eine signifikante Abhängigkeit des Prozentsatzes PR-positiver Karunkelstromazellen vom maximalen Plazentomdurchmesser ( $p < 0.05$ ), wobei zwischen den beiden Größen eine negative Korrelation mit einem Regressionskoeffizienten von  $-0.68\%/cm$  vorhanden war (s. Tabelle 5).

Tabelle 4: Variabilität im Prozentsatz Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellen zwischen 5 Plazentomen verschiedener Größe und Lokalisation einer 270 Tage trächtigen Kuh. Dargestellt sind die Meßwerte aus 3 Schnitten (S1-S3) pro Plazentom sowie die daraus errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD).

Plazentom/Lokalisation	$\varnothing_{\max}$ (cm)	S1	S2	S3	$\bar{x} \pm SD$
1) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	18	53.7	51.5	52.9	52.7±0.9
2) Spitze des fruchttragenden Horns	12	53.7	48.9	53.9	52.2±2.3
3) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	10	56.8	60.3	54.7	57.3±2.3
4) Spitze des nicht-fruchttragenden Horns	4	62.1	59.4	61.7	61.1±1.1
5) nicht-fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	4	63.3	58.6	62.1	61.4±2.0

$\varnothing_{\max}$  = maximaler Durchmesser des Plazentoms

Tabelle 5: Statistische Auswertung zur Variabilität des Prozentsatzes Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellen in fünf verschiedenen Plazentomen unterschiedlicher Größe und Lokalisation einer 270 Tage graviden Kuh (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 4.3.5.2.).

a) Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse.

Einflußgröße bzw. Wechselwirkung	p-Wert
Plazentom	0.0009
Zone	0.6494
Plazentom x Zone	0.0700

b) Ergebnis der Kovarianzanalyse auf das Vorliegen eines linearen Trends des Prozentsatzes Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellen bezüglich der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser*.

	p-Wert
Zone (Einflußgröße)	0.6494
max. Plazentomdurchmesser	0.0298

## 4.4.2. Östrogenrezeptor

### 4.4.2.1. Reaktionsmuster der N-terminal gerichteten Antikörper 1D5 und AER314 in den Plazentomen

Im Gegensatz zur Reaktion in dem als positive Kontrolle eingesetzten Endometrium eines Kalbes, in dem sich stark positive Reaktionen auch in epithelialen Zellen fanden (s. Abbildung 1), waren mit den Primärantikörpern 1D5 und AER314 in den Plazentomen unabhängig vom Gravitätsstadium positive Reaktionen lediglich in einem Teil der Zellen des Karunkelstromas nachweisbar (s. Abbildungen 9 und 10), wobei das Antigen fast ausschließlich im Kern lokalisiert war und sich die positiven Reaktionen über das gesamte Karunkelstroma inklusive Karunkelstiel verteilten. Als einzige Ausnahme waren mit dem Antikörper 1D5 bei einem der 150 Tage trächtigen Tiere schwache nukleäre Reaktionen in wenigen Lokalisationen des Karunkelepithels zu erkennen. Trotz der qualitativen Übereinstimmung hinsichtlich des Reaktionsmusters ergaben sich bezüglich der Reaktionsstärke und des Anteils ER-positiver Karunkelstromazellen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern. Während sich mit dem Antikörper 1D5 zum Teil deutlich positive Reaktionen fanden und bis zur Hälfte der Karunkelstromazellen ein positives Signal zeigten, waren mit AER314 nur vereinzelt und in schwacher Intensität positive Reaktionen nachweisbar. Vergleichbar dem Reaktionsmuster des immunhistologischen Progesteronrezeptornachweises (s. Abschnitt 4.4.1.1.) fanden sich unter den ER-positiven Zellen des Karunkelstromas auch Perizyten von Kapillaren. Eindeutig positive Reaktionen in Gefäßendothelien oder Gefäßwänden waren dagegen nicht nachweisbar. Plazentome von Tieren zum Geburtszeitpunkt zeigten mit 1D5 ausschließlich positive nukleäre Reaktionen in Zellen des Karunkelstromas (s. Abbildung 14A). Gegenüber der Trächtigkeit erschien die Intensität des Signals im Durchschnitt schwächer. Positive Reaktionen nahmen vom Karunkelstiel zur Plazentomoberfläche in Häufigkeit und Intensität ab. Untersuchungen an Plazentomen zum Zeitpunkt der Geburt wurden mit AER314 nicht durchgeführt.

---

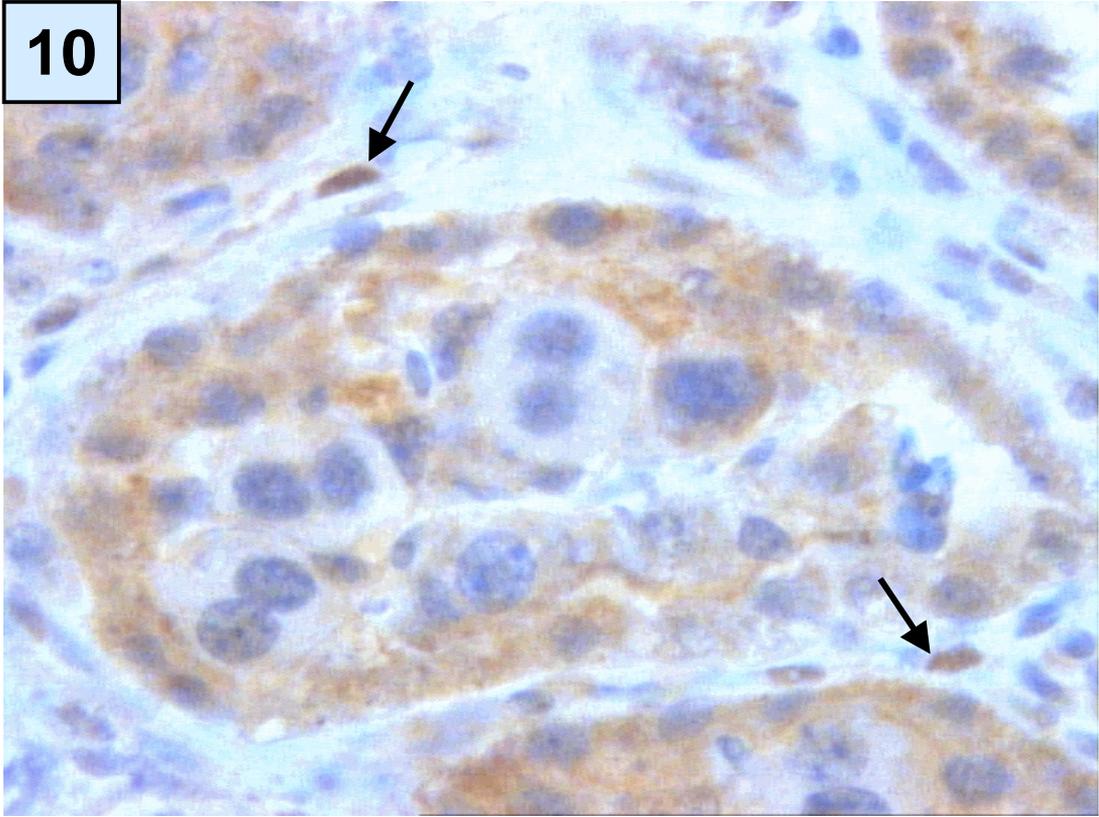
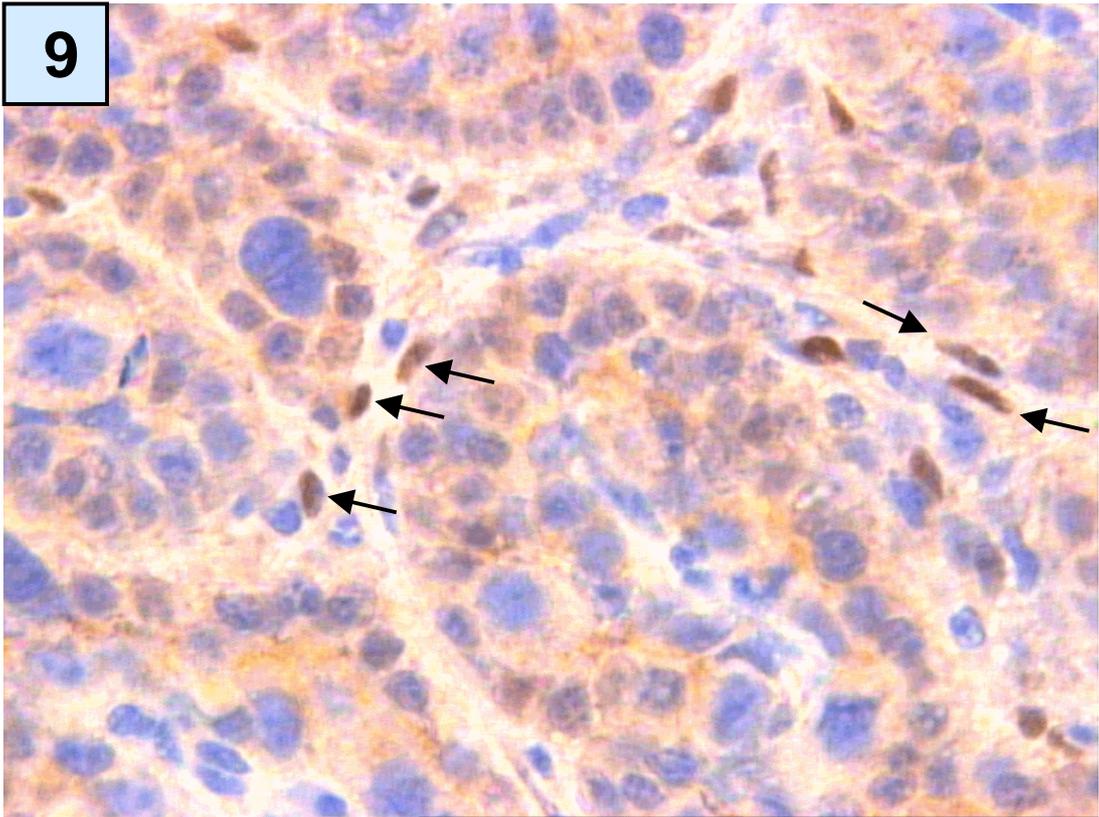
Seite 187

Abbildung 9: Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors in einem Plazentom eines 150 Tage graviden Rindes<sup>4</sup> unter Verwendung des N-terminal gerichteten Primärantikörpers 1D5. Im Karunkelstroma zwischen den Anschnitten mehrerer Chorionzotten finden sich positive nukleäre Reaktionen (↓) (Vergrößerung: x440).

Abbildung 10: Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors in einem Plazentom eines 270 Tage graviden Rindes unter Verwendung des N-terminal gerichteten Primärantikörpers (AER314). Abgebildet ist der Querschnitt einer Chorionzotte mit ringförmig umgebenden Karunkelsepten. Positive nukleäre Reaktionen (↓) sind ausschließlich im Karunkelstroma und dort lediglich in geringer Anzahl und Intensität vorhanden (Vergrößerung: x440).

---

<sup>4</sup> Die Abbildungen 9 und 11-13 entstammen demselben Gewebematerial



#### 4.4.2.2. Reaktionsmuster der C-terminal gerichteten Antikörper AER311 und HT277 in den Plazentomen

Wie bereits in Abschnitt 4.3.3.1. berichtet, stimmten in der Positivkontrolle (Endometrium eines Kalbes) die von den beiden gegen den C-Terminus des Östrogenrezeptormoleküls gerichteten Antikörpern AER311 und HT277 erzeugten Reaktionsmuster qualitativ mit den Reaktionsmustern der N-terminal gerichteten Antikörper AER314 und 1D5 überein (s. Abbildung 1). In den Plazentomen ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Reaktionsmustern der beiden Antikörpergruppen. Während im Karunkelstroma das Färbeverhalten von AER311 und HT277 qualitativ mit dem Reaktionsmuster von 1D5 und AER314 übereinstimmte und quantitativ etwa dem Färbeverhalten von 1D5 entsprach (s. Abbildungen 11B, 12B und 13D), erzeugten die beiden C-terminal gerichteten Antikörper zusätzlich bei allen untersuchten Tieren übereinstimmend positive, z.T. intensive, überwiegend nukleäre Signale im Karunkelepithel (s. Abbildungen 11-13), wobei tendenziell die stärkste Reaktivität in dieser Zellpopulation in der Gruppe der 150 Tage trächtigen Tiere gefunden wurde (s. Tabelle 6). Die Ketten der perlschnurartig angeordneten ER-positiven Karunkelepithelzellkerne wurden lediglich stellenweise durch die ER-negativen Kerne eingewanderter Trophoblastriesenzellen unterbrochen (s. Abbildung 13A). Bezüglich der Stärke der Färbereaktion zeigte sich im Karunkelepithel sowohl bei Verwendung von HT277 als auch bei AER311 (s. Abbildung 12A) ein deutlicher kontinuierlicher Gradient entlang mittlerer bzw. feinerer Karunkelsepten. Hierbei war das Signal an deren Basis an großen maternalen Septen bzw. in der Nähe von Chorionzottenspitzen am kräftigsten, während es dort, wo maternale Septen an primäre Chorionzotten grenzten, teilweise vollständig verschwand. Das Signal im Karunkelstroma ließ dagegen keine derartige Abhängigkeit von der Lokalisation erkennen.

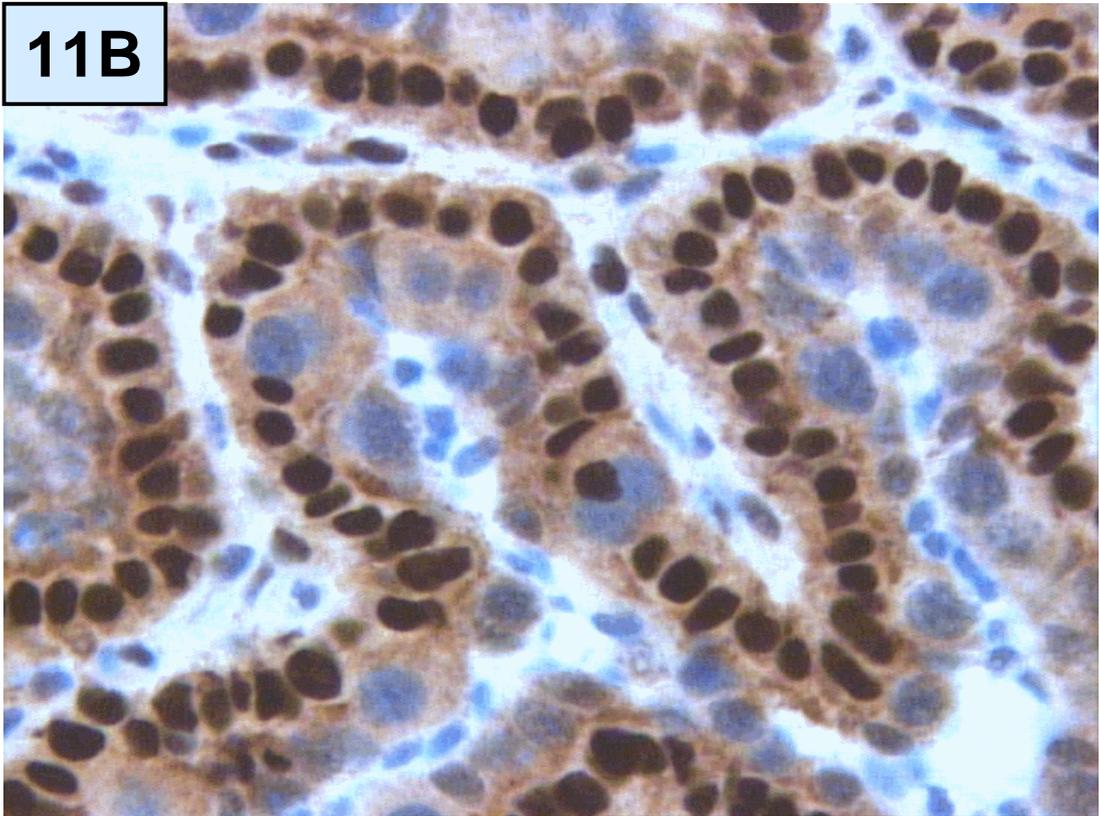
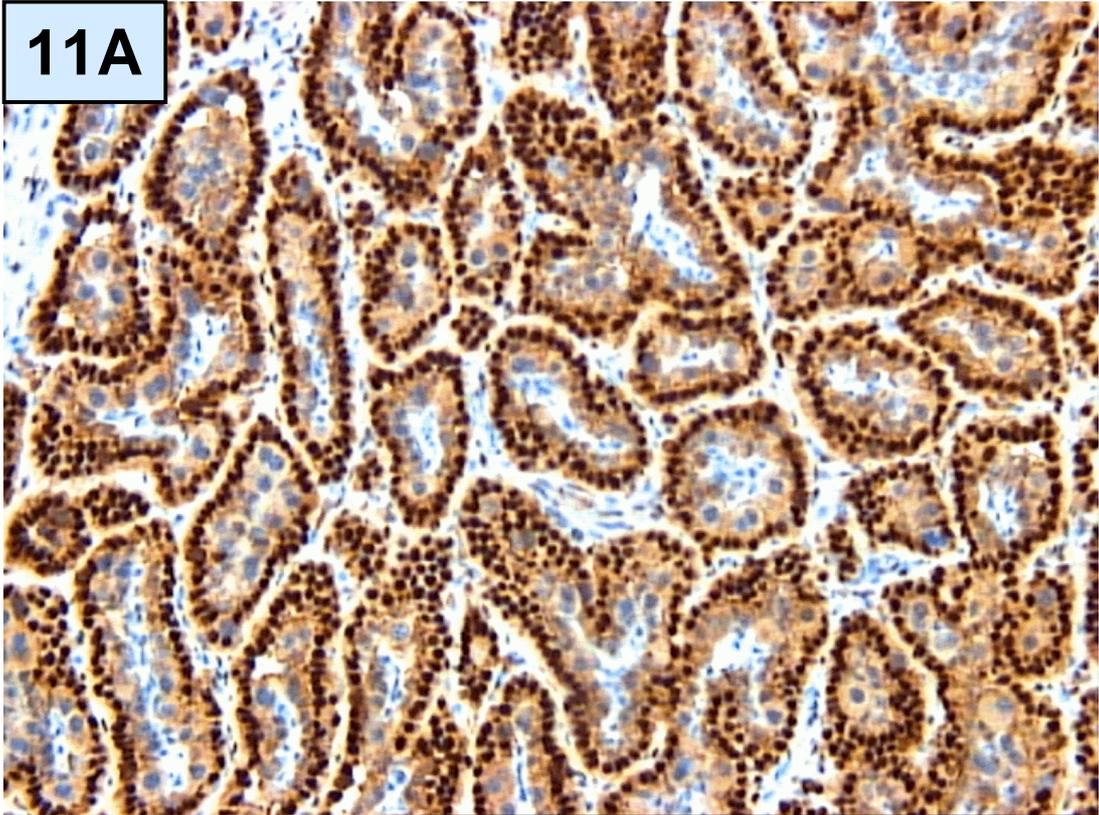
---

Seite 189

Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors in einem Plazentom eines 150 Tage graviden Rindes unter Verwendung des N-terminal gerichteten Primärantikörpers HT277.

- A) Übersicht. Intensive, überwiegend nukleäre Reaktionen sind in allen Karunkelepithelzellen des Bildausschnitts vorhanden (Vergrößerung: x110).
- B) Neben den intensiven Signalen in den Kernen des Karunkelepitheles sind positive nukleäre Reaktionen mäßiger bis mittlerer Intensität im Karunkelstroma zu erkennen (↓). In der Bildmitte befindet sich eine fetomaternal Hybridzelle mit drei Kernen, von denen nur der dem Karunkelepithel entstammende Zellkern eine deutlich positive Reaktion zeigt (Vergrößerung: x400).

KS= Karunkelstroma; SC= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblast.



Häufig fanden sich an der fetomaternalen Grenzlinie dreikernige Zellen, von deren Kernen zwei größere ER-negativ reagierten und ein kleinerer Kern ER-positiv (s. Abbildung 11B und 13C). Bei diesen Zellen handelte es sich offensichtlich um fetomaternalen Hybridzellen, deren ER-positiver Zellkern dem Karunkelepithel entstammte. An zahlreichen Lokalisationen konnte das Abschilfern ER-positiver Karunkelepithelzellen beobachtet werden, welche mehr oder weniger stark ausgeprägte Anzeichen der Degeneration aufwiesen (s. Abbildungen 13A und 13B). Unter der Geburt waren in den wenigen Resten des Karunkelepithels weiterhin deutlich positive nukleäre Reaktionen nachweisbar (s. Abbildung 14B). Die Reaktionen von HT277 und AER311 im Karunkelstroma entsprachen unter der Geburt derjenigen des Antikörpers 1D5.

Tabelle 6: Mittlere Färbeintensität in den Kernen des Karunkelepithels nach immunhistologischer Darstellung des Östrogenrezeptors unter Verwendung des C-terminal gerichteten monoklonalen Antikörpers AER311 als Primärantikörper in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium sowie unter der Geburt (n=3 Tiere/Gruppe).

Tier-Nr.:	Untersuchungsstadium				
	Tag 150	Tag 220	Tag 240	Tag 270	Geburt *
1	+++	++(+)	++(+)	++	++(+)
2	++(+)	+(+)	++	+(+)	++
3	++	+	++	(+)	++

\* Reaktionen in vereinzelt Resten des Karunkelepithels

Färbeintensität: +++ = intensives Signal; ++ = deutliches Signal; + = schwaches Signal

Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors in einem Plazentom eines 150 Tage graviden Rindes unter Verwendung des N-terminal gerichteten Primärantikörpers AER311.

- A) Übersicht (Vergrößerung: x100). Im rechten oberen Bildbereich befindet sich der Anschnitt einer größeren Chorionzotte, in deren Umgebung das nukleäre Signal in den Karunkelepithelzellen zunehmend schwächer wird und schließlich vollständig verschwindet.
- B) Neben den positiven Signalen in den Zellkernen des Karunkelepithels sind positive nukleäre Reaktionen in einem Teil der Karunkelstromazellen zu erkennen (↓).

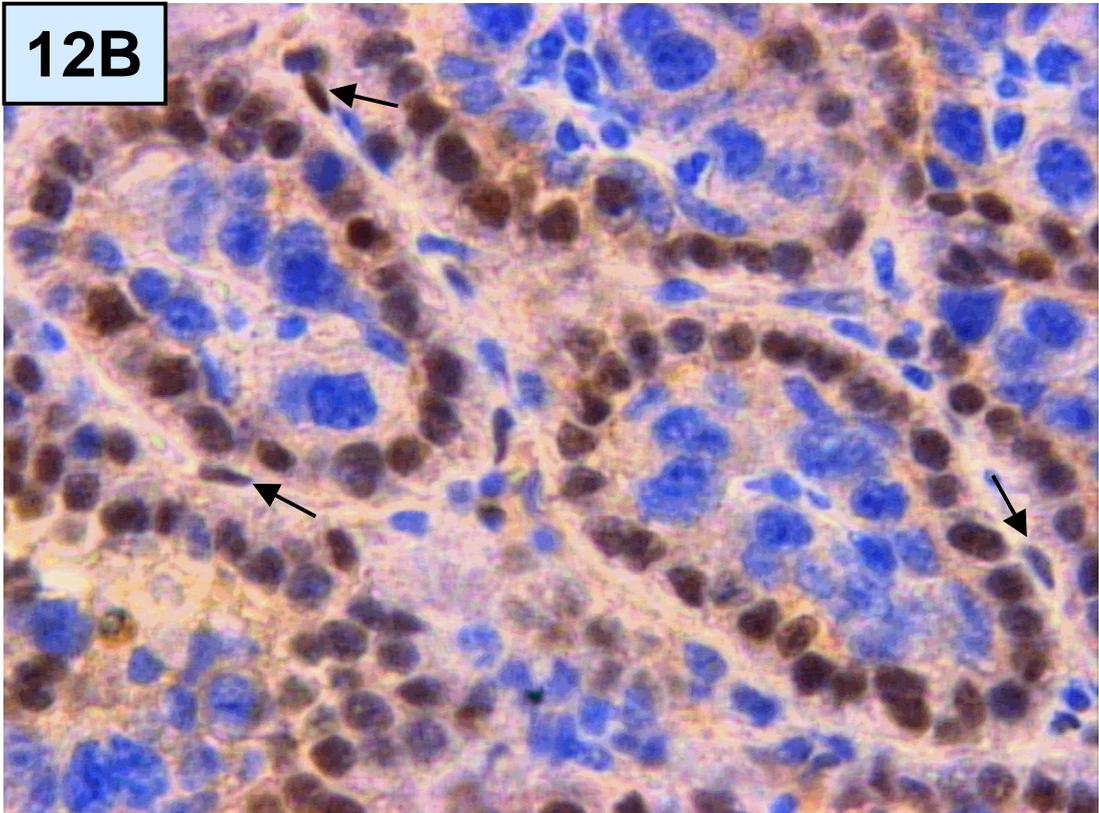
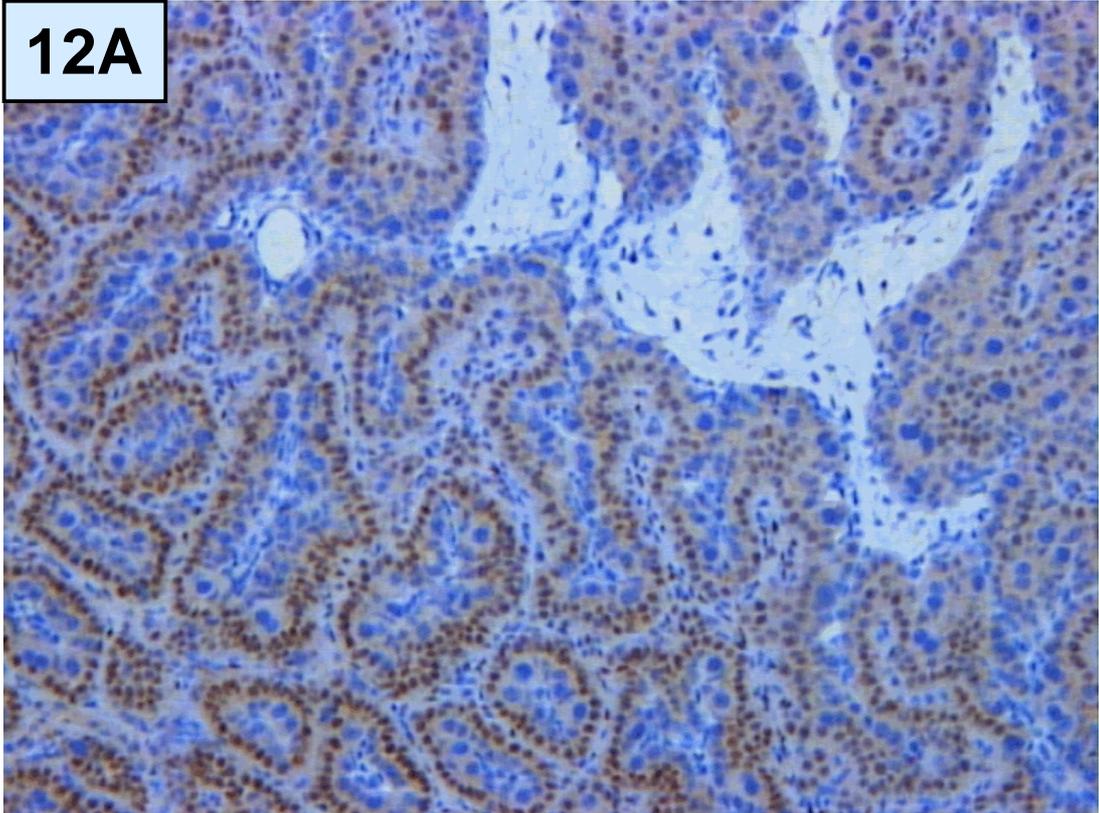


Abbildung 13: Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors in einem Plazentom eines 150 Tage graviden Rindes (Primärantikörper: HT277).

- A) Positive Reaktionen in abschilfernden, degenerierenden Karunkelepithelzellen (↓). Im oberen rechten Bildbereich ist die Reihe der östrogenrezeptorpositiven Karunkelepithelzellen durch eine eingewanderte östrogenrezeptornegative Trophoblastriesenzelle unterbrochen (Vergrößerung: x1000, Ölimmersion).
- B) Positive Reaktionen in abschilfernden, degenerierenden Karunkelepithelzellen (↓) (Vergrößerung: x1000, Ölimmersion).
- C) Trinukleäre fetomaternal Hybridzelle (↓) im Karunkelepithel eines 150 Tage graviden Rindes. Der dem Karunkelepithel entstammende Kern weist ein intensives östrogenrezeptorpositives Signal auf, während die beiden großen Kerne fetalen Ursprungs negativ reagieren. Als Zeichen der beginnenden Degeneration hat die Zelle einen Großteil ihres Zytoplasmas verloren (Vergrößerung: x1100; Ölimmersion).
- D) Positive nukleäre Reaktion eines Kapillar-Perizyten (↓) im verbreiterten freien Rand eines oberflächlich gelegenen Karunkelseptums (Vergrößerung: x1100; Ölimmersion).

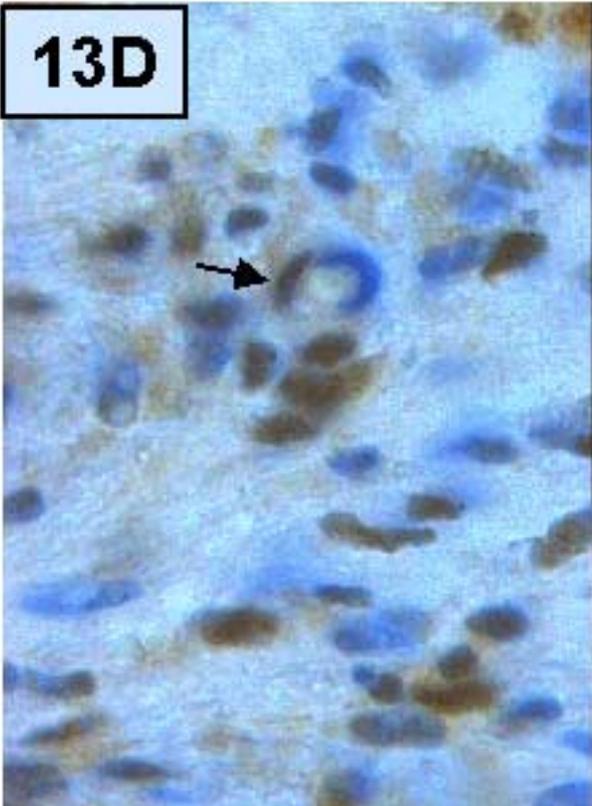
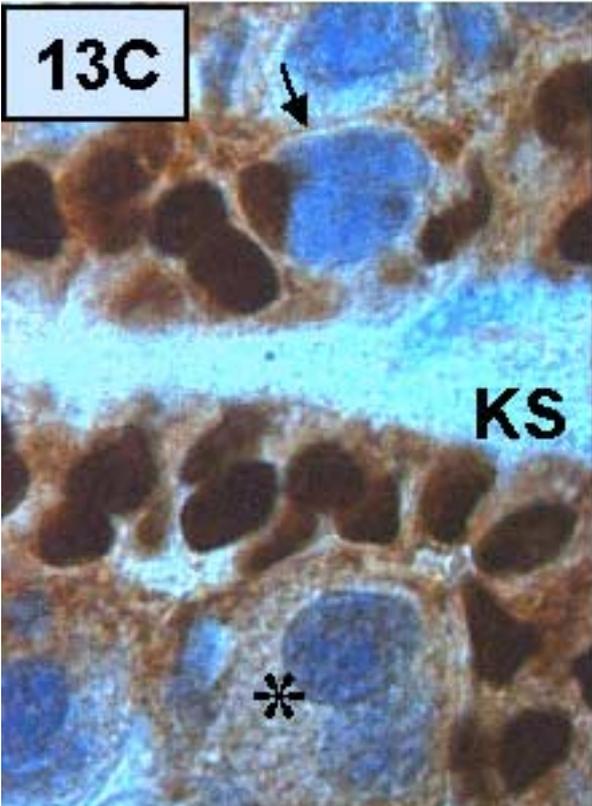
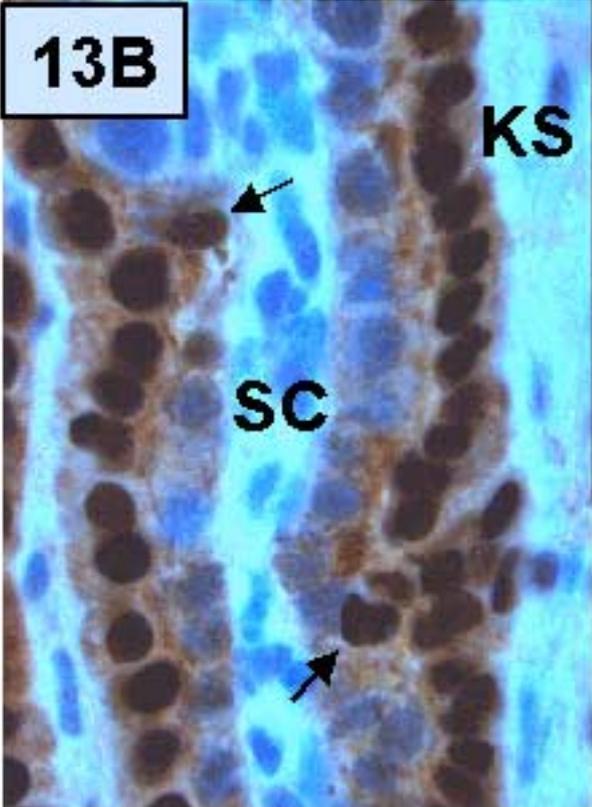
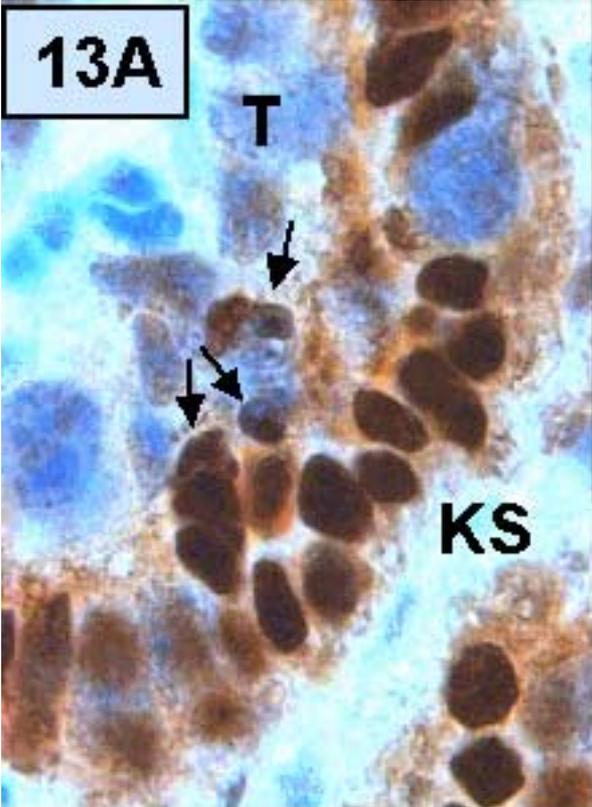
KS= Karunkelstroma; SC= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblast;

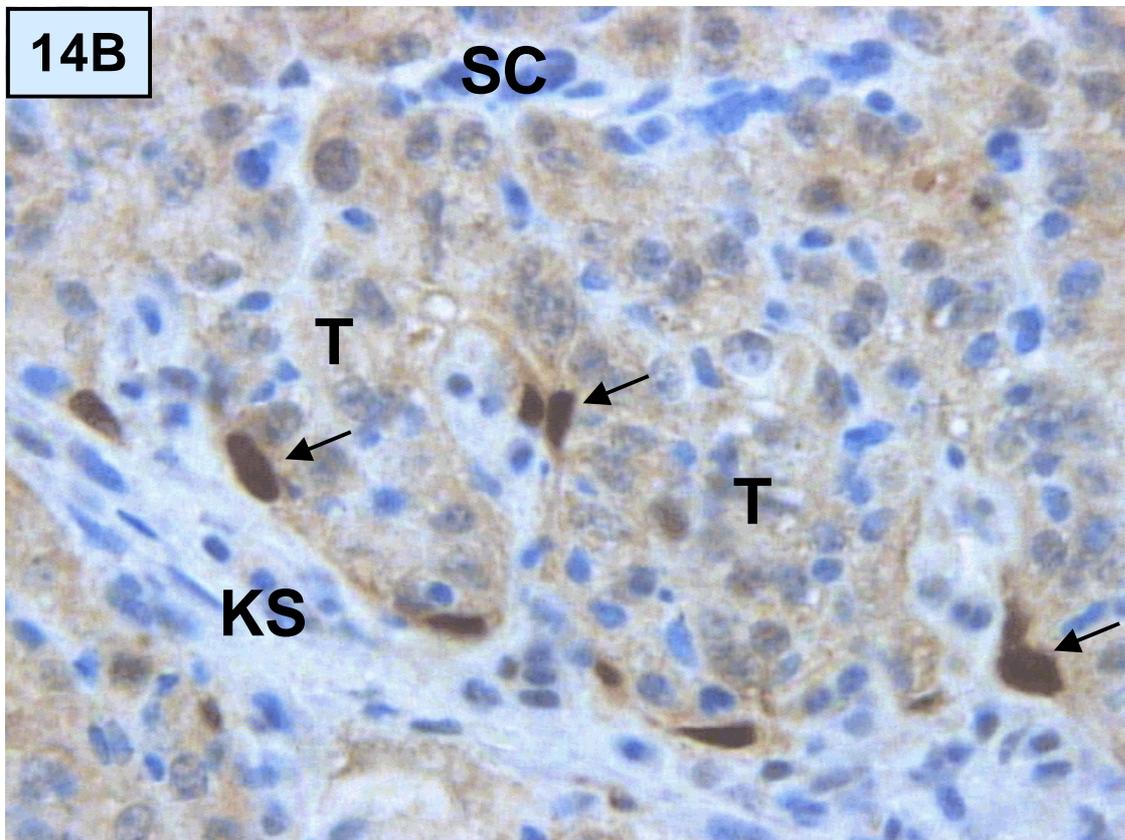
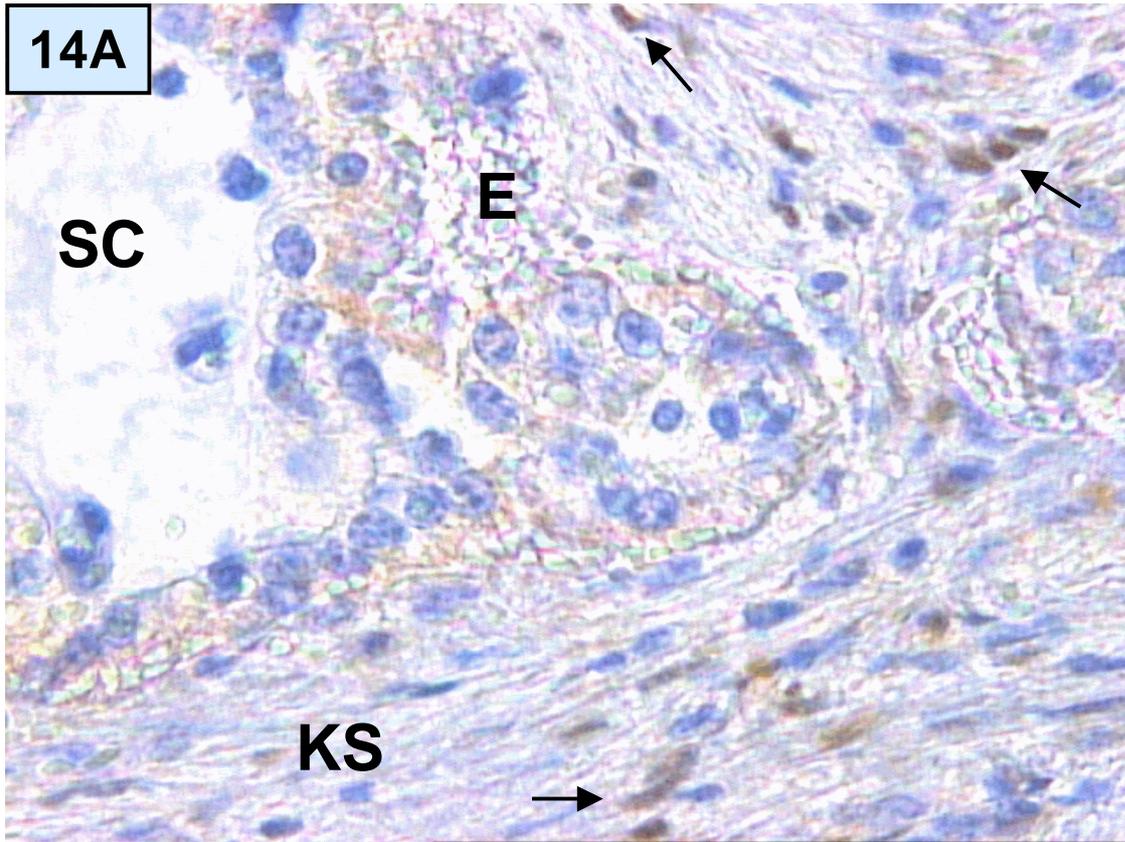
\*= Trophoblastriesenzelle

Abbildung 14: Immunhistologischer Nachweis des Östrogenrezeptors in einem Plazentom eines Rindes zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt (Seite 194).

- A) Positive nukleäre Reaktionen im Karunkelstroma (↓) nahe dem Karunkelstiel (Primärantikörper: 1D5; Vergrößerung: x320).
- B) Der Primärantikörper HT277 markiert intensiv die Kerne in den Überresten des Karunkelepithels (↓) (Vergrößerung: x320).

KS= Karunkelstroma; SC= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblast;  
E= Erythrozyten





#### 4.4.2.3. Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie)

Der Prozentsatz ER-positiver Karunkelstromazellen (KSZ) wird signifikant vom Untersuchungsstadium beeinflusst ( $p < 0.05$ ; s. Tabelle 7 und Abbildung 15). Hierbei weist der Anteil ER-positiver KSZ zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag keine erheblichen Schwankungen auf und liegt im Mittel zwischen 34.0% und 41.9%. Unter der Geburt fällt er jedoch deutlich auf  $17.5 \pm 8.3\%$  ab. Zu diesem Zeitpunkt war zusätzlich eine erhebliche Abnahme der Färbintensität festzustellen. Weiterhin ergab sich ein signifikanter Einfluß der Zone ( $p < 0.01$ ), wobei der Anteil ER-positiver Karunkelstromazellen mit Ausnahme der Gruppe der 220 Tage trächtigen Tiere in der Zone III, d.h. in der Nähe des Karunkelstiels, am höchsten war. Dieser Zonenunterschied war bei den Tieren der Geburtsgruppe besonders ausgeprägt. Statistisch war jedoch eine Abhängigkeit des Zonenunterschieds von der Versuchsgruppe nicht nachweisbar ( $p(\text{Versuchsgruppe} \times \text{Zone}) > 0.05$ ).

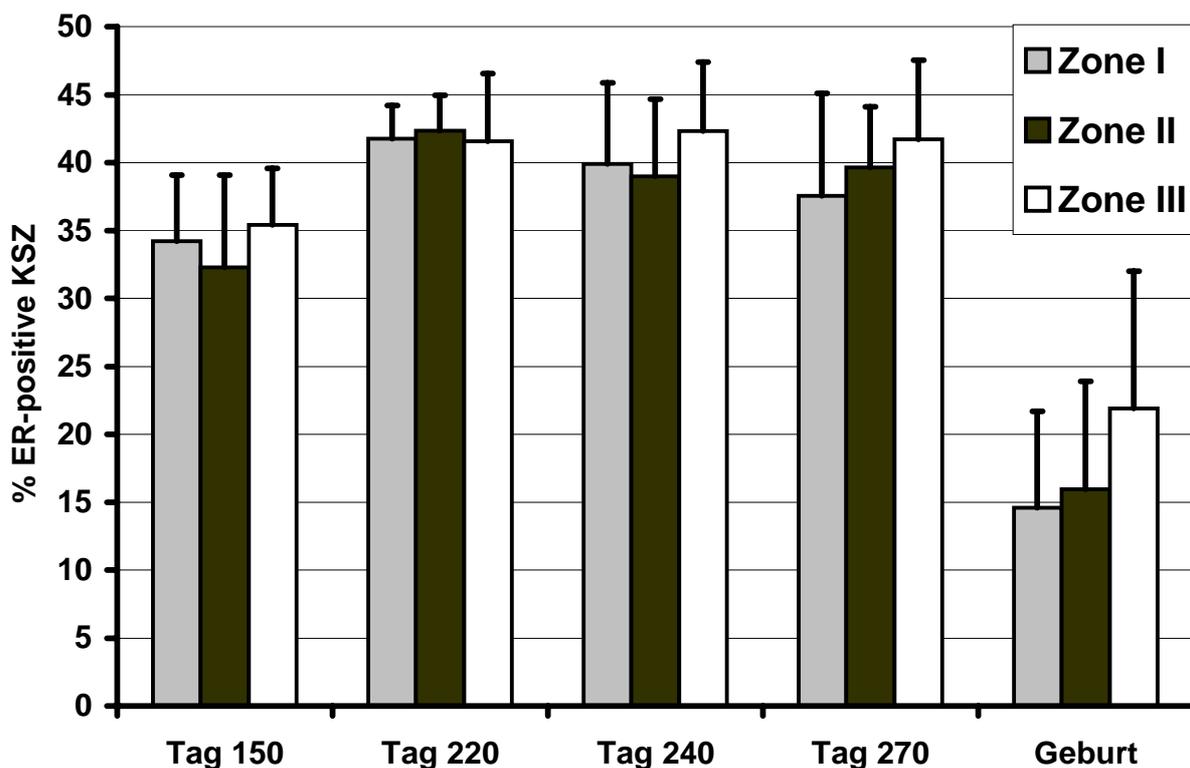


Abbildung 15: Quantitative Erfassung des Anteils immunhistologisch Östrogenrezeptor (ER)-positiver Karunkelstromazellen (KSZ) in Abhängigkeit vom Untersuchungsstadium und von der Lokalisation (Zone I-III) innerhalb des Plazentoms.

Zone I: oberflächliche Zone, der Chorionplatte am nächsten gelegen

Zone II: intermediäre Zone

Zone III: tiefe Zone, dem Karunkelstiel am nächsten gelegen

Tabelle 7: Quantitative Erfassung der Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma: Ergebnisse der vierfaktoriellen Varianzanalyse (s. Abschnitt 4.3.5.1.).

<b>Einflußgröße/Wechselwirkung</b>	<b>p-Wert</b>
Versuchsgruppe	0.0106
Zone	0.0012
Tier	0.0000
Versuchsgruppe x Zone	0.1031

#### **4.4.2.4. Variabilität der Östrogenrezeptor-Expression im Karunkelstroma zwischen verschiedenen Plazentomen eines Tieres (horizontale Studie)**

Bei der quantitativen Erfassung der ER-Expression im Karunkelstroma von fünf Plazentomen unterschiedlicher Größe einer 270 Tage trächtigen Kuh (s. Tabelle 8) ergab sich eine signifikant positive Streuung der Meßgröße zwischen den Plazentomen ( $p < 0.01$ ). Ein signifikanter Einfluß der Zone ließ sich bei den fünf Plazentomen dieses Einzeltieres im Gegensatz zur longitudinalen Studie statistisch nicht absichern. Ein Zusammenhang zwischen dem maximalen Durchmesser der Plazentome und deren Anteil ER-positiver Karunkelstromazellen war statistisch nicht nachweisbar (s. Tabelle 9).

Tabelle 8: Variabilität im Prozentsatz Östrogenrezeptor-positiver Karunkelstromazellen zwischen 5 Plazentomen verschiedener Größe und Lokalisation einer 270 Tage trächtigen Kuh. Dargestellt sind die Meßwerte aus 3 Schnitten (S1-S3) pro Plazentom sowie die daraus errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD).

Plazentom/Lokalisation	$\varnothing_{\max}$ (cm)	S1	S2	S3	$\bar{x} \pm SD$
1) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	18	34.7	36.9	36.5	36.0 $\pm$ 1.0
2) Spitze des fruchttragenden Horns	12	43.4	42.8	39.3	41.9 $\pm$ 1.8
3) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	10	33.1	33.8	36.7	34.6 $\pm$ 1.5
4) Spitze des nicht-fruchttragenden Horns	4	36.0	41.5	37.5	38.3 $\pm$ 2.3
5) nicht-fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	4	40.6	40.1	42.6	41.1 $\pm$ 1.1

$\varnothing_{\max}$  = maximaler Durchmesser des Plazentoms

Tabelle 9: Statistische Auswertung zur Variabilität des Prozentsatzes Östrogenrezeptor-positiver Karunkelstromazellen in fünf verschiedenen Plazentomen unterschiedlicher Größe und Lokalisation einer 270 Tage graviden Kuh (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 4.3.5.2.).

a) Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse.

Einflußgröße bzw. Wechselwirkung	p-Wert
Plazentom	0.0044
Zone	0.1282
Plazentom x Zone	0.5784

b) Ergebnis der Kovarianzanalyse auf das Vorliegen eines linearen Trends des Prozentsatzes Östrogenrezeptor-positiver Karunkelstromazellen bezüglich der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser*.

	p-Wert
Zone (Einflußgröße)	0.1282
max. Plazentomdurchmesser	0.5357

#### 4.5. Diskussion

Für die eigenen Untersuchungen stand kein gegen den PR des Rindes erzeugter Primärantikörper zur Verfügung. In Vorversuchen wurden drei verschiedene, gegen den humanen PR gerichtete Primärantikörper getestet: 10A9, 1A6 (Loxo GmbH, D-69215 Dossenheim) und BGX-PR88 (BioGenex/DCS, D-22397 Hamburg). Mit diesen drei Primärantikörpern ergaben sich an Schnitten von Plazentomen aus unterschiedlichen Stadien der Gravidität qualitativ gleichwertige Resultate. Da mit dem Primärantikörper 10A9 das spezifische Signal am stärksten war, wurde dieser Antikörper für die eigenen Untersuchungen ausgewählt. Das Epitop dieses monoklonalen Antikörpers, welches die letzten 12 Aminosäuren des menschlichen PR umfasst, ist in den bisher sequenzierten Progesteronrezeptoren von Mensch (MISRAHI et al., 1987), Maus (SCHOTT et al., 1991), Huhn (CONNELLY et al., 1986), Kaninchen (LOOSFELT et al., 1986) und Ratte (PARK und MAYO, 1991) vollständig konserviert. Dies spricht dafür, daß die etablierte immunhistologische Methode auch beim Rind den spezifischen Nachweis des PR erlaubt.

Beim Rind konnte bisher dem Progesteron plazentaren Ursprungs keine eindeutige Funktion zugeordnet werden, da das Corpus luteum über die gesamte Dauer der Gravidität die Hauptprogesteronquelle darstellt, während die Plazenta nur temporär und in vergleichsweise geringem Ausmaß zu den peripheren maternalen Plasmakonzentrationen beiträgt. In Abwesenheit von Progesteron lutealen Ursprungs kann die plazentare Progesteronproduktion die Gravidität häufig nur im Zeitraum zwischen dem ca. 180. bis 240. Graviditätstag aufrechterhalten (ESTERGREEN et al., 1967; DAY, 1977; CHEW et al., 1979; JOHNSON et al., 1981; PIMENTEL et al., 1986). Auf diesen Beobachtungen basierte die Auswahl der Versuchsgruppen. Mit den Versuchsgruppen am 150., 220. und 270. Graviditätstag sollte der Zustand vor, in der Mitte und gegen Ende der „plazentaren Progesteronphase“ erfasst werden. Durch die Probenentnahme am 270. Graviditätstag sollte einerseits der Zustand bei herannahender Geburt charakterisiert werden, andererseits durch den Vergleich mit der Geburtsgruppe auf unmittelbare geburtsbedingte Veränderungen untersucht werden. Trotz der experimentell nachweisbaren Veränderungen hinsichtlich der Befähigung der plazentaren Progesteronproduktion zur Aufrechterhaltung der Gravidität in der zweiten Trächtigkeitshälfte ist das immunhistologisch darstellbare Expressionsmuster des PR in den Plazentomen im Zeitraum zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt sehr konstant. Die Ursache und die eventuelle biologische Bedeutung des schwachen, jedoch signifikanten Anstiegs ( $p < 0.05$ ) des Anteils PR-positiver Karunkelstromazellen von 51.8% auf 56.2% zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag und auf 58.9% unter der Geburt ist unklar. Ebenso unklar ist, ob den schwach ausgeprägten, jedoch statistisch hochsignifikanten Zonenunterschieden ( $p < 0.01$ ) eine biologische Relevanz zugrundeliegt. Möglicherweise basieren die festgestellten Zonenunterschiede in der Expression des PR auf lokalen Regulationsmechanismen. In den Karunkelstromazellen sind Progesteronrezeptoren trotz der wahrscheinlich sehr hohen lokalen Ligandkonzentrationen immunhistologisch nachweisbar. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von TSENG und ZHU (1997), nach denen in den Stromazellen des

menschlichen Endometriums Progesteron die Expression des PR unterhält, während in anderen progesteronsensitiven Zelltypen, v.a. in Epithelzellen, der PR durch Gestagene herunterreguliert wird (LESSEY et al., 1988). Die Tatsache, daß PR in der Mehrzahl der Karunkelstromazellkerne zum Zeitpunkt der Geburt immunhistologisch nachweisbar sind, läßt darauf schließen, daß die Plazentome zu diesem Zeitpunkt noch immer progesteronsensitiv sind, wobei über die Art der vermittelten Wirkung zur Zeit keine Aussage getroffen werden kann, da beim Rind keine Informationen über das Vorkommen und die Bedeutung von PR-Isoformen (s. Abschnitt 4.2.3.) vorhanden sind. Dennoch kann vermutet werden, daß ein gestörter oder unvollständiger Entzug des lokalen Progesterons bzw. der Progesteronwirkung auf die Plazentome Ursache von Geburtsstörungen bzw. Nachgeburtsverhaltungen sein kann. Lokal sind in den Plazentomen des Rindes unter der Geburt gegenüber dem 5. Graviditätsmonat deutlich erhöhte Progesteron-Gewebekonzentrationen nachweisbar (TSUMAGARI et al., 1994). Die These einer möglichen Bedeutung eines unvollständigen lokalen Progesteronentzugs für die Retentio secundinarum wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, daß nach Geburtsinduktion mit Antigestagenen beim Rind keine erhöhte Häufigkeit von Nachgeburtsverhaltungen beobachtet wurde (LI et al., 1991), während diese Komplikation nach Geburtsinduktion mittels Glukokortikoiden bzw. Prostaglandinanaloga in einem erheblichen Ausmaß auftrat (ADAMS, 1969; WAGNER et al., 1974; JOHNSON und JACKSON, 1982; MURRAY et al., 1984; MUSAH et al., 1987).

Zur Charakterisierung der Progesteronwirkungen in den Karunkeln sind weitere Untersuchungen erforderlich. Da die BNC offensichtlich die Hauptproduzenten des plazentaren Progesterons darstellen (REIMERS et al., 1985) besteht die Möglichkeit, daß Progesteron gleich den ebenfalls synthetisierten Proteohormonen von den BNC im Rahmen ihrer Wanderungsaktivität (WOODING und WATHES, 1980) ebenfalls gerichtet und unmittelbar in das Karunkelstroma abgegeben wird. Entsprechende Vermutungen wurden bereits von REIMERS et al. (1985) geäußert. Durch ihre Fähigkeit zur Invasion ins Karunkelepithel kommen die Trophoblastriesenzellen fast unmittelbar mit den potentiellen Zielzellen des plazentaren Progesterons, den Karunkelstromazellen, in Berührung (s. Abbildung 5). Falls die BNC tatsächlich die Hauptprogesteronproduzenten darstellen, besteht aufgrund deren Fähigkeit zu Migration und Invasion die Möglichkeit zur Erzeugung hoher Progesteronkonzentrationen in eng begrenzten, aufgrund von lokalen Regulationsmechanismen festgelegten Bereichen. Dies würde eine erhebliche Erweiterung möglicher Progesteronwirkungen gegenüber der alleinigen Verfügbarkeit von lutealem Progesteron darstellen. Möglicherweise kommt dem plazentaren Progesteron im Karunkelstroma die Funktion eines lokalen, Wachstum und Differenzierung regulierenden Faktors zu. Progesteron kann in Abhängigkeit vom Zelltyp und vom zellulären Kontext sowohl die Zellproliferation stimulieren als auch proliferationshemmende und Differenzierung induzierende Wirkungen aufweisen (KIM et al., 1996; MOL et al., 1996; LEE et al., 1997). Im Endometrium agiert Progesteron üblicherweise als klassischer Gegenspieler der proliferativen Aktivität der Östrogene (SONG und FRASER, 1995; SCHINDLER, 1997; MOYER und FELIX, 1998). Andererseits stimuliert Pro-

gesteron unter in vitro-Bedingungen im Zusammenwirken mit bestimmten Mediatoren die Proliferation von endometrialen Stromazellen (IRWIN et al., 1991; PIVA et al., 1996). Auch in der Decidua basalis der Ratte wirkt Progesteron in der frühen Gravidität als stromales Mitogen (OGLE et al., 1998b). Die Ergebnisse der horizontalen Studie (s. Abschnitt 4.4.1.3.) lassen vermuten, daß der Anteil PR-positiver Stromazellen negativ korreliert mit der Größe der Plazentome und daß die vom Fetus weit entfernten Plazentome eine stärkere PR-Expression aufweisen als die dem Fetus unmittelbar benachbarten Plazentome. Aufgrund der Tatsache, daß die hierzu gewonnenen Daten von einem einzigen Tier eines bestimmten Trächtigkeitsstadiums und von einer niedrigen Anzahl an Plazentomen stammen, ist eine definitive Aussage jedoch nicht möglich. Neben den Bindegewebszellen des Karunkelstromas wiesen zu allen Untersuchungsstadien auch Kapillarperizyten sowie unter der Geburt Zellen der Wände von Karunkelarterien positive nukleäre Signale auf. Die Tatsache, daß PR-positive Kapillarperizyten v.a. in den freien Rändern von oberflächlich gelegenen Karunkelsepten angetroffen wurden, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß dort viele Kapillaren senkrecht geschnitten wurden und die Perizyten so leichter von den restlichen Bindegewebszellen des Karunkelstromas unterschieden werden konnten. Die Expression von Progesteronrezeptoren in Gefäß- bzw. gefäßassoziierten Zellen spricht für eine Bedeutung von Progesteron in der Regulation der Angiogenese und/oder des Blutflusses.

Die vier zum immunhistologischen Nachweis des Östrogenrezeptors eingesetzten Primärantikörper erzeugten im Endometrium eines Kalbes, welches als positive Kontrolle eingesetzt wurde, ein übereinstimmendes Reaktionsmuster (s. Abbildung 1). Dies spricht in Verbindung mit der Tatsache, daß zwei dieser Antikörper - AER311 und AER314 - nach Immunisierung gegen den ER des Rindes gewonnen wurden dafür, daß jeder dieser Klone spezifisch den ER des Rindes erkennt. Im Gegensatz zum übereinstimmenden Färbeverhalten im Kälberendometrium erzeugen diese vier Antikörper in den Plazentomen jedoch sehr unterschiedliche Reaktionsmuster, und zwar in Abhängigkeit von der Lokalisation der Epitope im ER-Molekül. Während die beiden C-terminal gerichteten Antikörper sowohl Karunkelstroma- als auch Karunkelepithelzellen erkennen, erzeugen die N-terminal gerichteten Klone positive Signale ausschließlich im maternalen Stroma der Plazentome. Dies bedeutet, daß die im Karunkelepithel offensichtlich vorhandenen ER im Bereich der Epitope der beiden N-terminal gerichteten Klone bzw. in deren Nachbarschaft eine Veränderung erfahren haben müssen, die zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit der Antikörper 1D5 und AER314 geführt haben. Die Art der Veränderung ist zur Zeit noch unklar. Es bieten sich folgende Hypothesen an:

*1) Die Epitope der Klone 1D5 und AER314 werden aufgrund eines gewebespezifischen Effektes bei der Fixierung so verändert, daß sie von diesen Antikörpern nicht mehr erkannt werden. In der zur Verfügung stehenden Literatur fanden sich jedoch keine Hinweise auf das Vorkommen derartiger gewebespezifischer Effekte beim immunhistologischen ER-Nachweis.*

2) Die Erkennung des ER durch die Klone AER314 und 1D5 wird durch die Ligandbindung beeinflusst. Aufgrund der Tatsache, daß das Karunkelepithel direkt an die östrogenproduzierenden Trophoblastzellen angrenzt, besteht die Möglichkeit, daß die ER des Karunkelepitheles mehr oder weniger vollständig durch Liganden besetzt sind, während im Karunkelstroma die ER in erhöhtem Maß als freie Rezeptoren vorliegen. Die Epitope von AER314 und 1D5 liegen zwar deutlich außerhalb der Ligandbindungsstelle, eine Wechselwirkung zwischen Antikörperbindung und Ligandbindung kann aufgrund der räumlichen Struktur des ER-Moleküls bzw. aufgrund der mit der Ligandbindung verbundenen Konformationsänderung (s. Abschnitt 4.2.1.) dennoch nicht ausgeschlossen werden.

3) Der Verlust der Bindungsfähigkeit der beiden N-terminal gerichteten Klone resultiert aus der Expression einer ER-Variante im Karunkelepithel mit einer Veränderung in oder um die jeweiligen Epitope. Hierbei ist v.a. an N-terminale Verkürzungen oder Deletionen (s. Abschnitt 4.2.2.1.) im Bereich der A/B-Domäne zu denken. So ergaben sich bei menschlichen Mammakarzinomzellen Hinweise auf eine Rolle von ER-Deletionsvarianten als Ursache von Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen immunhistologischer Untersuchungen unter Verwendung N-terminal bzw. C-terminal gerichteter Primärantikörper (HUANG et al., 1997). Im Zusammenhang mit der Plazenta wurde bisher lediglich in der Dezidua basalis der Ratte ein verkürzter Östrogenrezeptor mit einem Molekulargewicht von 49 kDa beschrieben (OGLE und GEORGE, 1995; OGLE et al., 1997, 1998a).

4) Die Bindungsstellen der Klone AER314 und 1D5 werden durch die Anlagerung bestimmter Moleküle maskiert. Da das Karunkelepithel offensichtlich hohen Östrogenkonzentrationen ausgesetzt ist liegen die dort exprimierten ER vermutlich mehr oder weniger vollständig in ligandgebundener Form vor. Nach Bindung der Hormon-Rezeptor-Komplexe an die Hormone Responsive Elements der DNS kommt es zur Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren (s. Abschnitt 4.2.1.). Möglicherweise werden hierbei für die Bindung der beiden Antikörper AER314 und 1D5 kritische Bereiche der A/B-Domäne maskiert. Eine weitere Möglichkeit der Maskierung derartiger Abschnitte des ER besteht im Rahmen des „Transcriptional Cross-Talk“ (PAECH et al., 1997; GOTTLICHER et al., 1998) an AP1-Enhancer-Elements durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren FOS und JUN.

5) Die Epitope der N-terminal gerichteten Klone werden durch eine starke Phosphorylierung des ER-Moleküls blockiert. Alle Mitglieder der Steroidhormonrezeptor-Familie sind Phosphoproteine. Sie liegen bereits in Abwesenheit des Liganden in einem Zustand der basalen Phosphorylierung vor. Nach der Ligandbindung tritt eine rasche Hyperphosphorylierung ein, d.h. der Phosphorylierungsgrad steigt um das 2-7fache der basalen Phosphorylierung an (KUIPER und BRINKMANN, 1997). Beim Östrogenrezeptor liegen vier Phosphorylierungsstellen (Serin<sup>104, 106, 118, 167</sup>) im Bereich der N-terminalen A/B-Domäne (SMITH, 1998). Über die exakte Lokalisation des Epitops des Antikörpers 1D5 innerhalb der A/B-Domäne waren keine Informationen erhältlich. Das Epitop des Antikörpers AER314 liegt nach Angaben der entsprechenden Produktinfor-

mation im Bereich der Aminosäuren 120-170. Somit erscheint es durchaus möglich, daß im Falle einer Phosphorylierung v.a. im Bereich von Serin<sup>118</sup> oder Serin<sup>167</sup> die Bindung von AER314 beeinträchtigt wird. Die biologische Funktion der Steroidrezeptor-Phosphorylierung ist noch größtenteils unklar. Diskutiert wird eine Bedeutung für die Verlagerung in den Kern, die subnukleäre Lokalisation, die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren sowie die Modulation der Transkriptionsaktivierung bzw. der Bindung an Hormone Responsive Elements (KUIPER und BRINKMANN, 1997). Eine besondere Bedeutung wird der Phosphorylierung des ER im Rahmen von Wachstumsfaktor/Östrogen-Wechselwirkungen ("Cross-Talking") zugeschrieben. Die Phosphorylierung des ER wird beispielsweise durch MAP-Kinasen katalysiert, welche durch Wachstumsfaktoren wie EGF oder IGF I stimuliert werden. Die Phosphorylierung des ER soll zu einer verstärkten DNS-Bindung und einer Beeinflussung der ligandunabhängigen transkriptionsaktivierenden Funktion 1 führen, woraus offensichtlich eine veränderte Qualität der Östrogenwirkung resultieren kann (SMITH, 1998). Ein weiterer auffälliger Befund in diesem Zusammenhang ist, daß im Karunkelepithel mit den C-terminal gerichteten Klonen große Mengen an Östrogenrezeptoren gefunden werden, dort jedoch keine immunhistologisch nachweisbaren Progesteronrezeptoren vorkommen. Dies kann als Hinweis auf eine veränderte Qualität der Östrogenwirkung in diesen Zellen gewertet werden, da normalerweise im Endometrium Östrogene via ER den Progesteronrezeptor induzieren (s. Abschnitt 4.2.4.).

Eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Reaktionsmuster sind unterschiedliche Kreuzreaktionen mit dem ER $\beta$ . Trotz der identischen Struktur von ER $\alpha$  und ER $\beta$  weisen deren Untereinheiten (Domänen) deutliche Unterschiede bezüglich ihres Homologiegrades auf Aminosäure- bzw. mRNA-Ebene auf. So beträgt bei der Ratte die Homologie der A/B-Domänen auf Proteinebene 16.5%, während die Ligandbindungsdomänen einen Homologiegrad von 59.7% aufweisen (KUIPER und GUSTAFSSON, 1997). Ähnliche Werte ergaben sich für die entsprechenden Homologien zwischen dem menschlichen ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf cDNA-Ebene (17.5% bzw. 59.1%; ENMARK et al., 1997). Somit ist eine Kreuzreaktion mit ER $\beta$  für die Antikörper HT277 (Epitop im C-terminalen Bereich der Ligandbindungsdomäne E) und AER311 (Epitop: C-terminaler Bereich der Ligandbindungsdomäne E + Teil der Domäne F) wahrscheinlicher als für die gegen die A/B-Domäne erzeugten Antikörper AER314 und 1D5. So sind im bovinen ER $\beta$  (ROSENFELD et al., 1999) gegenüber dem Epitop von HT277 (H. THOLE, persönliche Mitteilung) nur 2 von 15 Aminosäuren ausgetauscht.

Bezüglich der Reaktion im Karunkelepithel wurde sowohl mit HT277 als auch AER314 ein deutlicher Gradient der Reaktionsstärke entlang mittlerer und kleinerer Chorionzotten festgestellt, wobei das Signal zu deren Basis an den primären Chorionzotten hin teilweise vollständig verschwand (s. Abbildung 12A). Dies zeigt, daß sich bei der Verzahnung von fetalem und maternalem Gewebe funktionell bedeutsame Gradienten eher entlang kleinerer und mittlerer Chorionzotten bzw. Karunkelsepten ausbilden und das gewählte Auswertungsschema zur Erfassung

von Einflüssen der Lokalisation innerhalb der Plazentome (Zonen I-III) vermutlich den physiologischen Gegebenheiten nicht in allen Fällen gerecht wird.

Der Verlauf der ER-Expression im Karunkelstroma unterscheidet sich erheblich von der ER-Expression im maternalen Teil der Humanplazenta. Beim Menschen nimmt die ER-Expression im maternalen Teil der Plazenta bereits in der Frühgravidität erheblich ab. Unter der Geburt sind dort ER nur in niedrigen Konzentrationen nachweisbar (PERROT-APPLANAT et al., 1994). Ähnliches gilt für die Dezidua der Ratte (OGLE und GEORGE, 1995). Beim Rind liegt der Anteil ER-positiver Karunkelstromazellen dagegen zwischen dem 150. bis 270. Graviditätstag konstant bei ca. 40% und fällt erst unter der Geburt deutlich ab (s. Abbildung 15). In den Resten des Karunkelepithels zeigen sich unter der Geburt immunhistologisch z.T. starke ER-positive Reaktionen (s. Abbildung 14B). Da jedoch in ausgereiften Plazentomen kaum noch Karunkelepithel vorhanden ist (WOICKE et al., 1986), kann postuliert werden, daß der ER-Gehalt der Plazentome um so geringer ist, je reifer die Plazentome sind. Insgesamt erscheint das „reife“ Plazentom, zumindest was den klassischen Wirkmechanismus betrifft, ein wenig östrogenresponsives Organ zu sein. Dies wurde bereits von SAUERWEIN et al. (1989) aufgrund der Ergebnisse von Ligand-Bindungsstudien postuliert.

In den eigenen immunhistologischen Untersuchungen, welche mit bis zu vier verschiedenen Primärantikörpern durchgeführt wurden, ergaben sich keinerlei eindeutig positive Reaktionen in den Kotyledonen. Dieser Befund stimmt mit dem überwiegenden Teil der bisher mit verschiedenen Methoden beim Menschen und anderen Spezies durchgeführten Untersuchungen überein, nach dem im fetalen Teil der Plazenta keine ER eindeutig nachzuweisen sind (s. Abschnitt 4.2.5.). Auch SAUERWEIN et al. (1989) konnten unter der Geburt in den Kotyledonen des Rindes mit einem im Hinblick auf hohe endogene Östrogenkonzentrationen modifizierten Ligandbindungstest keine ER nachweisen. Inwieweit die eigenen immunhistologischen Ergebnisse im Widerspruch zu den Ligandbindungsstudien von KATOH (1992) stehen, ist kaum zu beurteilen, da keine Nachweisgrenzen und Zuverlässigkeitskriterien der angewendeten Ligandbindungstests angegeben werden. Gelegentlich wurde in Trophoblastzellen eine schwache diffuse zytoplasmatische, geringfügig über dem unspezifischen Hintergrund der Kontrollschnitte liegende Färbung gefunden. Aufgrund der Tatsache, daß in diesen Zellen keine nukleären Signale nachzuweisen waren, wurde diese Färbung als unspezifisch betrachtet.

Bezüglich der Reaktivität in karunkulären Kapillar-Perizyten ergab sich beim immunhistologischen ER-Nachweis ein dem PR-Nachweis qualitativ gleichwertiges Reaktionsmuster (s. Abbildung 13D). In Gefäßwänden waren dagegen keine eindeutig positiven Reaktionen nachweisbar. Aufgrund der Expression in gefäßassoziierten Zellen kann angenommen werden, daß auch der ER in die Regulation der Angiogenese bzw. des Blutflusses involviert ist.

Ziel der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen war es, potenzielle Zielzellen plazerter Steroide - Östrogene und Progesteron - innerhalb der Plazentome anhand der Expression von ER bzw. PR zu identifizieren. Beide Rezeptortypen wurden im Karunkelstroma lokalisiert,

d.h. in z.T. unmittelbarer Nachbarschaft der als Ligandproduzenten fungierenden Trophoblastzellen. Weiterhin konnte eine ER-Expression mit einigen besonderen Charakteristika im Karunkelepithel nachgewiesen werden. Hieraus ergeben sich insgesamt deutliche Hinweise auf eine Rolle der placentaren Steroide als lokale Regulatoren von Wachstum und Differenzierung in den Plazentomen des Rindes.

#### 4.6. Literatur

- ADAMS WM (1969). The elective induction of labor and parturition in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 154, 261-268
- AL SAATI T, CLAMENS S, COHEN-KNAFO E, FAYE JC, PRATS H, COINDRE JM, WAFFLART J, CAVERIVIÈRE P, BAYARD F, DELSOL G (1993). Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER). *Int. J. Cancer* 55, 651-654
- ARONICA SM, KATZENELLENBOGEN BS (1991). Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* 128, 2045-2052
- BAGCHI MK, TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW (1992). Ligand and DNA-dependent phosphorylation of human progesterone receptor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2664-2668
- BERGMAN MD, SCHACHTER BS, KARELUS K, COMBATSIARIS EP, GARCIA T, NELSON JF (1992). Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 130, 1923-1930
- BILLIAR RB, PEPE GJ, ALBRECHT ED (1997). Immunocytochemical identification of the oestrogen receptor in the nuclei of cultured human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta* 18, 365-370
- BORRAS M, LAIOS I, EL KHISSIN A, SEO HS, LEMPEREUR F, LEGROS N, LECLERC G (1996). Estrogenic and antiestrogenic regulation of the half-life of covalently labeled estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57, 203-21
- BRANDENBERGER AW, TEE MK, LEE JY, CHAO V, JAFFE RB (1997). Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- $\alpha$ ) and beta (ER- $\beta$ ) mRNA in the midgestational human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3509-3512
- BRENNER RM, WEST NB, McCLELLAN MC (1990). Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol. Reprod.* 42, 11-19
- CHAIDARUN SS, KLIBANSKI A, ALEXANDER JM (1997). Tumor-specific expression of alternatively spliced estrogen receptor messenger ribonucleic acid variants in human pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1058-1065
- CHEW BP, ERB RE, FESSLER JF, CALLAHAN, CJ MALVEN PV (1979). Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens and calving traits. *J. Dairy Sci.* 62, 557-566
- CHU S, FULLER PJ (1997). Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 132, 195-199
- CONNELLY OM, SULLIVAN WP, TOFT DO, BIRNBAUMER M, COOK RG, MAXWELL BL, ZARUCKI-SCHULZ T, GREENE GL, SCHRADER WT, O'MALLEY BW (1986). Molecular cloning of the chicken progesterone receptor. *Science* 233, 767-770
- CONNELLY OM, MAXWELL BL, TOFT DO, SCHRADER WT, O'MALLEY BW (1987). The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 493-501
- COOKE PS, BUCHANAN DL, YOUNG P, SETIAVAN T, BRODY J, KORACH KS, TAYLOR J, LUBAHN DB, CUNHA GR (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6535-6540
- COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON J-A, KORACH KS (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613-4621
- DAY AM (1977). Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle. *NZ Vet. J.* 25, 139-144

- DIXON WJ (1993). BMDP statistical software manual. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 1993
- DOTZLAW H, ALKHALAF M, MURPHY LC (1992). Characterization of estrogen receptor variant mRNAs from human breast cancer. *Mol. Endocrinol.* 6, 773-785
- DOWSETT M, DAFFADA A, CHAN CM, JOHNSTON SR (1997). Oestrogen receptor mutants and variants in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 33, 1177-1183
- DUFFY DM, WELLS TR, HALUSKA GJ, STOUFFER RL (1997). The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 57, 693-699
- EDDY EM, WASHBURN TF, BUNCH DO, GOULDING EH, GLADEN BC, LUBAHN DB, KORACH KS (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796-4805
- ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, GRANDIEN K, LAGERCRANTZ S, FRIED G, NORDENSKJÖLD M, GUSTAFSSON J-A (1997) Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4258-4265
- ESTERGREEN VL, FROST OL, GOMES WR, ERB RE, BULLARD JF (1967). Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 50, 1293-1295
- EVANS RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895
- EVANS RW, LEAVITT WW (1980). Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5856-5860
- FARHAT MY, LAVIGNE MC, RAMWELL PW (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 10, 615-624
- FASCO MJ (1997). Quantitation of estrogen receptor mRNA and its alternatively spliced mRNAs in breast tumor cells and tissues. *Anal. Biochem.* 245, 167-178
- FRIEND KE, ANG LW, SHUPNIK MA (1995). Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4367-4371
- FRIEND KE, RESNICK EM, ANG LW, SHUPNIK MA (1997). Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131, 147-155
- FUQUA SAW, FITZGERALD SD, CHAMNESS GC, TANDON AK, McDONNELL DP, NAWAZ Z, O'MALLY DW, McGUIRE WL (1991). Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res.* 51, 105-109
- FUQUA SAW, FITZGERALD SD, ALLRED DC, ELLEDGE RM, NAWAZ Z, McDONNELL DP, O'MALLEY BW, GREENE GL, McGUIRE WL (1992). Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Research* 52, 483-486
- GEE KW, McCAULEY LD, LAN NC (1995). A putative receptor for neurosteroids on the GABAA receptor complex: the pharmacological properties and therapeutic potential of epalons. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 207-227
- GERDES D, WEHLING M, LEUBE B, FALKENSTEIN E (1998). Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol. Chem.* 379, 907-911
- GIANGRANDE PH, POLLIO G, McDONNELL DP (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 32889-32900
- GOTTLICHER M, HECK S, HERRLICH P (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* 76, 480-489

- GREENE GL, SOBEL NB, KING WJ, JENSEN EV (1984). Immunochemical studies of estrogen receptors. *J. Steroid Biochem.* 20, 51-56
- GRONEMEYER H (1992). Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J.* 6, 2524-2529
- GUERNE JM, STUTINSKY F (1978). Estradiol and progesterone binding in rabbit placenta during gestation. *Horm. Metab. Res.* 10, 548-553
- HALUSKA GJ, WEST NB, NOVY MJ, BRENNER RM (1990). Uterine estrogen receptors are increased by RU486 in late pregnant rhesus macaques but not after spontaneous labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 181-186
- HILD-PETITO S, VERHAGE HG, FAZLEABAS AT (1992). Immunohistochemical localization of estrogen and progestin receptors in the baboon (*papio anubis*) uterus during implantation and pregnancy. *Endocrinology* 130, 2343-2353
- HILL NCW, RIVERA J, BERNAL AL, MacKENZIE IZ (1990). The effect of RU 38,486 on progesterone and oestrogen receptor concentrations in the decidua and placenta in early pregnancy. *Hum. Reprod.* 5, 464-467
- HOFFMANN B, WAGNER WC, GIMENÉZ T (1976). Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. *Biol. Reprod.* 15, 126-133
- HSUEH AJ, PECK EJ, CLARK JH (1975). Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen induced uterine growth. *Nature* 254, 337-339
- HU C, HYDER SM, NEEDLEMAN DS, BAKER VV (1996). Expression of estrogen receptor variants in normal and neoplastic human uterus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 118, 173-179
- HUANG A, LEYGUE ER, SNELL L, MURPHY LC, WATSON PH (1997). Expression of estrogen receptor variant messenger RNAs and determination of estrogen receptor status in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* 150, 1827-1833
- IGNAR-TROWBRIDGE DM, NELSON KG, BIDWELL MC, CURTIS SW, WASHBURN TF, McLACHLAN JA, KORACH KS (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4658-4662
- IGNAR-TROWBRIDGE DM, TENG CT, ROSS KA, PARKER MG, KORACH KS, McLACHLAN JA (1993). Peptide growth factors elicit estrogen receptor dependent transcriptional activation of an estrogen responsive element. *Mol. Endocrinol.* 7, 992-998
- IGNAR-TROWBRIDGE DM, PIMENTEL M, PARKER MG, McLACHLAN JA, KORACH KS (1996). Peptide growth factors cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 137, 1735-1744
- ING NH, TORNESI MB (1997). Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205-1215
- IRWIN JC, UTIAN WH, ECKERT RL (1991). Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129, 2385-2392
- JENSEN EV, JACOBSEN HI (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog. Horm. Res.* 18, 387-414
- JIANG S-W, LLOYD RV, JIN L, EBERHARDT NL (1997). Estrogen receptor expression and growth-promoting function in human choriocarcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 16, 969-977
- JOHNSON WH, MANNS JG, ADAMS WM, MAPLETOFT RJ (1981). Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. *Can. Vet. J.* 22, 288-290

- JOHNSON CT, JACKSON PS (1982). Induction of parturition in cattle with cloprostenol. *Br. Vet. J.* 138, 212-224
- KANG K-S, MORITA I, CRUZ A, JEON YJ, TROSKO JE, CHANG C-C (1997). Expression of estrogen receptors in a normal human breast epithelial cell type with luminal and stem cell characteristics and its neoplastically transformed cell lines. *Carcinogenesis* 18, 251-257
- KASTNER P, KRUST A, TURCOTTE B, STROPP U, TORA L, GRONEMEYER H, CHAMBON P (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603-1614
- KATZENELLENBOGEN BS (1996). Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol. Reprod.* 54, 287-293
- KATZENELLENBOGEN BS, NORMAN MJ (1990). Multihormonal regulation of the progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells: interrelationships among insulin/insulin-like growth factor-I, serum, and estrogen. *Endocrinology* 126, 891-898
- KATOH N (1992). Signal transduction systems mediated by protein kinase-C and estradiol receptors in cow placenta and caruncle. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 81-86
- KHAN-DAWOOD FS, DAWOOD MY (1984). Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150, 501-505
- KIM S, KORHONEN M, WILBORN W, FOLDESY R, SNIPES W, HODGEN GD, ANDERSON FD (1996). Antiproliferative effects of low-dose micronized progesterone. *Fertil. Steril.* 65, 323-331
- KING WJ, GREENE GL (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307, 745-747
- KNEUSSL ES, ANCES IG, ALBRECHT ED (1982). A specific cytosolic estrogen receptor in human term placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144, 803-809
- KOEHORST SGA, COX JJ, DONKER GH, LOPES DA SILVA S, BURBACH JPH, THIJSSSEN JHH, BLANKENSTEIN MA (1994). Functional analysis of an alternatively spliced estrogen receptor lacking exon 4 isolated from MCF-7 breast cancer cells and meningioma tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 101, 237-245
- KRAUS WL, KATZENELLENBOGEN BS (1993). Regulation of progesterone gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132, 2371-2379
- KRAUS WL, MONTANO MM, KATZENELLENBOGEN BS (1994). Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 8, 952-969
- KUIPER GGJM, BRINKMANN AO (1994). Steroid hormone receptor phosphorylation: is there a physiological role. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 103-107
- KUIPER GGJM, GUSTAFSSON J-A (1997). The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Letters* 410, 87-90
- KUIPER G, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON J-A (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in the rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5925-5930
- KUMAR V, GREEN S, STACK G, BERRY M, JIN JR, CHAMBON P (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951
- LAMINSKI NA, HAMMOND KD (1985). Receptors for oestradiol in human placenta. *Placenta* 6, 383-389

- LAN NC, CHEN JS, BELELLI D, PRITCHETT DB, SEEBURG PH, GEE KW (1990). A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA(A)-benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol* 188, 403-406
- LEE WS, HARDER JA, YOSHIZUMI M, LEE ME, HABER E (1997). Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat. Med.* 3, 1005-1008
- LESLIE KK, TASSET DM, HORWITZ KB (1992). Functional analysis of a mutant estrogen receptor isolated from T47Dco breast cancer cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166, 1053-1061
- LESSEY BA, KILLIAM AP, METZGER DA, HANEY AF, GREENE GL, McCARTY KS (1988). Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 334-340
- LEYGUE E, DOTZLAW H, WATSON PH, MURPHY LC (1996). Identification of novel exon-deleted progesterone receptor variant mRNAs in human breast tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 63-68
- LI YF, PEREZGROVAS R, GAZAL OS, SCHWABE C, ANDERSON LL (1991). Antiprogestosterone, RU 486, facilitates parturition in cattle. *Endocrinology* 129, 765-770
- LOOSFELT H, ATGER M, MISRAHI M, GUIOCHON-MANTEL A, MERIEL C, LONGEAT F, BENAROUS R, MILGROM E (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9045-9049
- LUBAHN DM, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JT, KORACH KS, SMITHIES O (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11162-11166
- LUCONI M, BONACCORSI L, MAGGI M, PECCHIOLI P, KRAUSZ C, FORTI G, BALDI E (1998). Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 877-885
- LUO J, SLADEK R, BADER J-A, MATTHYSSEN A, ROSSANT J, GIGUÈRE V (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR- $\beta$ . *Nature* 388, 778-782
- MADSEN MW, REITER BE, LARSEN SS, BRIAND P, LYKKESFELDT AE (1997). Estrogen receptor messenger RNA splice variants are not involved in antiestrogen resistance in sublines of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 57, 585-589
- MAY FE, JOHNSON MD, WISEMAN LR, WAKELING AE, KASTNER P, WESTLEY BR (1989). Regulation of progesterone receptor mRNA by oestradiol and antioestrogens in breast cancer cell lines. *J. Steroid Biochem.* 33, 1035-1041
- McCORMICK PD, RAZEL AJ, SPELSBERG TC, COULAM CB (1981). Absence of high-affinity binding of progesterone (R 5020) in human placenta and fetal membranes. *Placenta Suppl.* 3, 123-132
- McQUIRE WL, CHAMNESS GC, FUQUA SAW (1991). Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol. Endocrinol.* 5, 1571-1577
- MENDOZA C, SOLER A, TESARIK J (1995). Nongenomic steroid action: independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 518-523
- MEREDITH JM, AUGER CJ, BLAUSTEIN JD (1994). Down-regulation of estrogen receptor immunoreactivity by 17 beta estradiol in the guinea pig forebrain. *J. Neuroendocrinol.* 6, 639-648
- MEYER HHD (1994). Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie – 3. Auflage*, F. Döcke (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 76-88
- MIKSICEK RJ, LEI Y, WANG Y (1993). Exon skipping gives rise to alternatively spliced forms of the estrogen receptor in breast tumor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 26, 163-174

- MISRAHI M, ATGER M, D'AURIOL L, LOOSFELT H, MERIEL C, FRIDLANSKY F, GUIOCHON-MANTEL A, GALIBERT F, MILGROM E (1987). Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 740-748
- MISRAHI M, VENECIE PY, SAUGIER-VEBER P, SAR S, DESSEN P, MILGROM E (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 289-292
- MOL JA, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR, RIJNBEEK A (1996). New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57, 67-71
- MONTANO MM, MÜLLER V, TROBAUGH A, KATZENELLENBOGEN BS (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.* 9, 814-825
- MOSELMAN S, POLMAN J, DIJKEMA R (1996). ER- $\beta$ : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392, 49-53
- MOYER DL, FELIX JC (1998). The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception* 57, 399-403
- MURPHY LC, LEYGUE E, DOTZLAW H, DOUGLAS D, COUTTS A, WATSON PH (1997). Oestrogen receptor variants and mutation in human breast cancer. *Ann. Med.* 29, 221-234
- MURRAY RD, NUTTER WT, WILMAN S, HARKER DB (1984). Induction of parturition in cattle using dexamethasone and cloprostenol: economic performance and disease incidence after treatment. *Vet. Rec.* 115, 296-300
- MUSAH AI, SCHWABE C, WILLHAM RL, ANDERSON LL (1987). Induction of parturition, progesterone secretion, and delivery of placenta in beef heifers given relaxin with cloprostenol or dexamethasone. *Biol. Reprod.* 37, 797-803
- NELSON KG, TAKAHASHI T, BOSSERT NL, WALMER DK, McLACHLAN JA (1991). Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 21-25
- OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y, MURAMATSU M (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its heterodimerization with ER $\alpha$  in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 122-126
- OGLE TF, GEORGE P (1995). Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat. *Biol. Reprod.* 53, 65-77
- OGLE TF, MILLS TM, COSTOFF A (1990). Progesterone maintenance of the placental progesterone receptor and placental growth in ovariectomized rats. *Biol. Reprod.* 43, 276-284
- OGLE TF, DAI D, GEORGE P, MAHESH VB (1997). Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat. *Biol. Reprod.* 57, 495-506
- OGLE TF, DAI D, GEORGE P, MAHESH VB (1998a). Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy. *Biol. Reprod.* 58, 1188-1198
- OGLE TF, GEORGE P, DAI D (1998b). Progesterone and estrogen regulation of rat decidual cell expression of proliferating cell nuclear antigen. *Biol. Reprod.* 59, 444-450
- OH HS, SMART R (1996). An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12535-12530
- O'MALLEY B (1990). The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.* 4, 363-369

- PAECH K, WEBB P, KUIPER GG, NILSSON S, GUSTAFSSON J, KUSHNER PJ, SCANLAN TS (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors Eralpha and Erbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508-1510
- PACE P, TAYLOR J, SUNTHARALINGAM S, COOMBES C, ALI S (1997). Human estrogen receptor  $\beta$  binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 272, 25832-25838
- PARK OK, MAYO KE (1991). Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol. Endocrinol.* 5, 967-978
- PERROT-APPLANAT M, GROYER-PICARD M-T, LONGEAT F, MILGROM E (1986). Ultrastructural localization of the progesterone receptor by an immunogold method: effect of hormone administration. *J. Cell Biol.* 102, 1191-1199
- PERROT-APPLANAT M, DENG M, FERNANDEZ H, LELAIDIER C, MEDURI G, BOUCHARD P (1994). Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 216-224
- PETERSEN DN, TKALCEVIC GT, KOZA-TAYLOR PH, TURI TG, BROWN TA (1998). Identification of estrogen receptor  $\beta$ 2, a functional variant of estrogen receptor  $\beta$  expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139, 1082-1092
- PETTERSON K, SVENSSON K, MATTSON R, CARLSSON B, OHLSSON R, BERKENSTAM A (1996). Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 54, 211-223
- PFEFFER U, FECAROTTA E, ARENA G, FORLANI A, VIDALI G (1996). Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen receptor positive tissues and cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 56, 99-105
- PIMENTEL SM, PIMENTEL CA, WESTON PG, HIXON JE, WAGNER WC (1986). Progesterone secretion by the fetoplacental unit and responsiveness of corpora lutea to steroidogenic stimuli at two stages of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1967-1971
- PIVA M, FLIEGER O, RIDER V (1996). Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent. *Biol. Reprod.* 55, 1333-1342
- REIMERS TJ, ULLMANN MB, HANSEL W (1985). Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 33, 1227-1236
- RENOIR J-M, RADANYI C, JUNG-TESTAS I, FABER LE, BAULIEU E-E (1990). The nonactivated progesterone receptor is a nuclear heterooligomer. *J. Biol. Chem.* 265, 14402-14406
- RICE LW, JAZAERI AA, SHUPNIK MA (1997). Estrogen receptor mRNA splice variants in pre- and postmenopausal human endometrium and endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 65, 149-157
- RISSMAN EF, EARLY AH, TAYLOR JA, KORACH KS, LUBAHN DB (1997). Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity. *Endocrinology* 138, 507-510
- RIVERA J, CANO A (1989). Oestrogen and progesterone receptors in human term placenta. Measurement by binding assays and immunological methods. *Placenta* 10, 579-588
- ROSENFELD CS, YUAN X, MANNIKAM M, CALDER MD, GARVERICK HA, LUBAHN DB (1999). Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 60, 691-697
- ROSSMANITH WG, WOLFAHRT S, ECKER A, EBERHARDT E (1997). The demonstration of progesterone, but not of estrogen, receptors in the developing human placenta. *Horm. Metab. Res.* 29, 604-610

- SABEUR K, EDWARDS DP, MEIZEL S (1996). Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 54, 99-1001
- SALIH MA, SIMS SH, KALU DN (1996). Putative intestinal estrogen receptor: evidence for regional differences. *Mol. Cell Endocrinol.* 121, 47-55
- SARTORIUS CA, MELVILLE MY, HOVLAND AR, TUNG L, TAKIMOTO GS, HORWITZ KB (1994). A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol.* 8, 1347-1360
- SAUERWEIN H, MEYER HHD, MÖSTL E (1989). Low sensitivity to oestrogens in bovine placenta at term. *J. Vet. Med. A* 36, 236-240
- SAUNDERS PTK, MAGUIRE AM, GAUGHAN J, MILLAR MR (1997). Expression of oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* 154, R13-R16
- SAVOURET JF, BAILLY A, MISRAHI M, RAUCH C, REDEUILH G, CHAUCHEREAU A, MILGROM E (1991). Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* 10, 1875-1883
- SCHINDLER AE (1997). Progestins and the endometrium. *Zentralbl. Gynäkol.* 119 (Suppl 2), 59-63
- SCHOTT DR, SHYAMALA G, SCHNEIDER W, PARRY G (1991). Molecular cloning sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor. *Biochemistry* 30, 7014-7020
- SCHUMACHER M (1990). Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *TINS* 13, 359-362
- SHANKER YG, RAO AJ (1997). Regulation of progesterone biosynthesis in the human placenta by estradiol 17 $\beta$  and progesterone. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 591-599
- SHANKER YG, SHARMA SC, RAO AJ (1997). Expression of progesterone receptor mRNA in the first trimester human placenta. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42, 1235-1240
- SHI W-L, WANG J-D, FU Y, XU L-K, ZHU P-D (1993). The effect of RU 486 on progesterone receptor in villous and extravillous trophoblast. *Hum. Reprod.* 8, 953-958
- SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERCHENTHALER I (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388, 507-525
- SHYAMALA G, YANG X, SILBERSTEIN G, BARCELLOS-HOFF MH, DALE E (1998). Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 696-701
- SIMERLY RB, CARR AM, ZEE, MC, LORANG D (1996). Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *J. Neuroendocrinol.* 8, 45-56
- SMITH CL (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.* 58, 627-632
- SONG JY, FRASER IS (1995). Effects of progestogens on human endometrium. *Obstet. Gynecol. Surv.* 50, 385-394
- TADDEI G, NOCI I, PERITI E, BORRI P, TORRICELLI F, TOZZI P, MONCINI D, PAGLIERANI M, BRANCONI F (1996). Chorion villosum does not express progesterone and estrogen receptors during the first trimester of pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 42, 77-79
- TENBAUM S, BANIAHMAD A (1997). Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1325-1341

- TREMBLAY GB, TREMBLAY A, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, LABRIE F, GIGUERE V (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Mol. Endocrinol.* 11, 353-365
- TSENG L, ZHU HH (1997). Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells. *Biol. Reprod.* 57, 1360-1366
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKEISHI M (1994).  $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fertil.* 101, 35-39
- TUOHIMAA P, PEKKI A, BLÄUER M, JOENSUU T, VILJA P, YLIKOMI T (1993). Nuclear progesterone receptor is mainly heat shock protein 90-free in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5848-5852
- UMAYAHARA Y, KAWAMORI R, WATADA H, IMANO E, IWAMA N, MORISHIMA T, YAMASAKI Y, KAJIMOTO Y, KAMADA T (1994). Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J. Biol. Chem.* 269, 16433-16442
- VARRIALE B, TATA JR (1991). Autoinduction of estrogen receptor is associated with FOSP-1 mRNA induction by estrogen in primary cultures of *Xenopus* oviduct cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 71, R25-R31
- VEGETO E, SHAHBAZ MM, WEN DX, GOLDMAN ME, O'MALLEY BW, McDONNELL DP (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7, 1244-1255
- VLADUSIC EA, HORNBY AE, GUERRA-VLADUSIC FK, LUPU R (1998). Expression of estrogen receptor  $\beta$  messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res.* 58, 210-214
- WAGNER WC, WILLHAM RL, EVANS LE (1974). Controlled parturition in cattle. *J. Anim. Sci.* 38, 485-489
- WANG Y, MIKSICEK RJ (1991). Identification of a dominant negative form of the human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 5, 1701-1715
- WANG J-D, FU Y, SHI W-L, ZHU P-D, CHENG J, QIAO G-M, WANG Y-Q, GREENE GL (1992). Immunohistochemical localization of progesterone receptor in human decidua of early pregnancy. *Hum. Reprod.* 7, 123-127
- WANG J-D, ZHU J-B, SHI W-L, ZHU P-D (1994). Immunocytochemical colocalization of progesterone receptor and prolactin in individual stromal cells of human decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 293-297
- WANG J-D, ZHU J-B, FU Y, SHI W-L, QIAO G-M, WANG Y-Q, CHEN J, ZHU P-D (1996). Progesterone receptor immunoreactivity at the maternofetal interface of first trimester pregnancy: a study of the trophoblast population. *Hum. Reprod.* 11, 413-419
- WEBB P, LOPEZ GN, UHT RM, KUSHNER PJ (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 9, 443-456
- WEHLING M (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 365-393.
- WEI LL, HAWKINS P, BAKER C, NORRIS B, SHERIDAN PL, QUINN PG (1996). An amino-truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 10, 1379-1387
- WEI LL, NORRIS BM, BAKER CJ (1997). An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 287-297

- WEN DX, XU YF, MAIS DE, GOLDMAN ME, McDONNEL DP (1994). The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8356-8364
- WESTLEY BR, MAY FE (1988). Oestrogen regulates oestrogen receptor mRNA levels in an oestrogen-responsive human breast cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1113-1118
- WILSON KB, EVANS M, ABDU NI (1996). Presence of a variant form of the estrogen receptor in peripheral blood mononuclear cells from normal individuals and lupus patients. *J. Reprod. Immunol.* 31, 199-208
- WOICKE J, SCHOON H-A, HEUWIESER W, SCHULZ L-C, GRUNERT E (1986). Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. *J. Vet. Med. A* 33, 660-667
- WONG M, THOMPSON TL, MOSS RL (1996). Nongenomic actions of estrogen in the brain: physiological significance and cellular mechanisms. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 189-203
- WOODING FBP, WATHES DC (1980). Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fertil.* 59, 425-430
- WU WX, MYERS DA, NATHANIELSZ PW (1995). Changes in estrogen receptor messenger ribonucleic acid in sheep fetal and maternal tissues during late gestation and labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172, 844-850
- WU WX, OWINY J, ZHANG Q, MA XH, NATHANIELSZ PW (1996). Regulation of the estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid in the ovariectomized sheep myometrium and endometrium: the role of estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* 55, 762-768
- XU J, NAWAZ Z, TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW (1996). The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12195-12199
- YOUNES MA, BESCH NF, BESCH PK (1981). Estradiol and progesterone binding in human term placental cytosol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 170-174

**KAPITEL V**

**UNTERSUCHUNGEN ZUM PROLIFERATIVEN VERHALTEN  
VERSCHIEDENER ZELLPOPULATIONEN IN DEN PLAZENTOMEN  
DES RINDES MITTELS IMMUNHISTOLOGISCHER DARSTELLUNG  
DES PROLIFERATIONSMARKERS  
KI67-ANTIGEN**

## INHALTSVERZEICHNIS

5.1.	Untersuchungsziele .....	217
5.2.	Literaturübersicht.....	217
5.2.1.	Proliferation, Mitose und Zellzyklus .....	217
5.2.2.	Ki67-Antigen .....	219
5.2.3.	Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zum plazentaren Wachstum beim Rind.....	220
5.3.	Eigene Untersuchungen .....	221
5.3.1.	Material und Methoden .....	221
5.3.1.1.	Probenmaterial, Probenaufbereitung und immunhistologische Darstellung des Ki67-Antigens .....	221
5.3.1.2.	Bestimmung des Anteils Ki67-positiver Zellen zur quantitativen Erfassung der Proliferation verschiedener Zellpopulationen in den Plazentomen.....	224
5.3.1.3.	Versuchsaufbau und statistische Auswertungen .....	224
5.3.1.3.1.	Quantitative Erfassung der Zellproliferation zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie).....	224
5.3.1.3.2.	Untersuchungen zur Variabilität der Zellproliferation zwischen den Plazentomen eines Individuums (horizontale Studie) .....	225
5.3.1.4.	Reagenzien, Chemikalien, Geräte und Lösungen .....	226
5.3.1.4.1.	Reagenzien und Chemikalien.....	226
5.3.1.4.2.	Geräte.....	226
5.3.1.4.3.	Lösungen .....	227
5.3.2.	Ergebnisse.....	228
5.3.2.1.	Reaktionsmuster des immunhistologischen Nachweises des Ki67-Antigens in den Plazentomen gravider Rinder bzw. unter der Geburt.....	228
5.3.2.2.	Verlauf der Ki67-Antigen-Expression in den Plazentomen zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie).....	235
5.3.2.3.	Variabilität der Ki67-Antigen-Expression zwischen verschiedenen Plazentomen einer 270 Tage trächtigen Kuh (horizontale Studie).....	239
5.3.3.	Diskussion .....	241
5.3.4.	Literatur.....	246

## 5.1. Untersuchungsziele

Ziel der in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen ist es, Informationen zum Proliferationsverhalten der am Aufbau der Plazentome beteiligten Zellpopulationen über den Beobachtungszeitraum zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt zu erarbeiten. Die erhaltenen Ergebnisse sollen dann auf Beziehungen zwischen dem proliferativen Verhalten, der Expression von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren sowie der lokalen Verfügbarkeit der entsprechenden Liganden überprüft werden. Hierdurch soll weiter der Frage nachgegangen werden, inwieweit plazentare Steroide als lokale Regulatoren von Wachstum und Differenzierung in der Plazenta des Rindes in Frage kommen. Als Methode zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Zellproliferation wurde die immunhistologische Darstellung des Ki67-Antigens gewählt.

## 5.2. Literaturübersicht

### 5.2.1. Proliferation, Mitose und Zellzyklus

Während Wachstum als die Zunahme der Zellmasse definiert ist, wird unter Proliferation die Vermehrung der Zellzahl durch Zellteilungen verstanden (PARDEE, 1989). Der Zellteilung geht bei den Eukaryonten im Regelfall die Mitose voraus. In der Anaphase der Mitose kondensieren die Chromosomen aus einem aufgelockerten metabolisch aktiven Zustand in eine dicht gepackte Transportform. In der Prometaphase bzw. Metaphase werden die Chromosomen mit einer Spindel aus Mikrotubuli verknüpft, welche von den beiden Zentriolen organisiert wird, und ordnen sich in der Äquatorialebene an. In der anschließenden Anaphase trennen sich die Schwesterchromatiden und werden zu gegenüberliegenden Polen der Zelle verlagert. Im letzten Stadium der Mitose, der Telophase, findet dann die Dekondensierung der Chromosomen und der Wiederaufbau der Kernmembran statt, wonach in der Regel die eigentliche Zellteilung erfolgt (McINTOSH und KOONGE, 1989).

Der Zeitraum zwischen zwei Mitosen wird als Interphase bezeichnet. Interphase und die folgende Mitose bilden zusammen einen Zellzyklus (s. Abbildung 1). Die Interphase wird in drei Intervalle unterteilt: 1) die G1-(gap 1)-Phase, der Zeitraum zwischen der Beendigung der Mitose und dem Einsetzen der DNA-Synthese; 2) die S-Phase, der Zeitraum, in dem die DNA-Replikation stattfindet - und 3) die G2-Phase, welche die Zeitspanne zwischen dem Ende der S-Phase und dem Einsetzen der Mitose umfasst. Die G1-Phase ist gekennzeichnet durch das Heranwachsen der Zelle zur Größe der Stammzelle sowie durch Protein- und RNA-Synthese. Ihre Dauer kann zwischen verschiedenen Zelltypen erheblich variieren und beträgt meist viele Stunden. Die Dauer der S-Phase ist relativ konstant und beträgt 5-8 Stunden. Die G2-Phase und die Mitose sind erheblich kürzer. Ihre Dauer beträgt lediglich 40-60 bzw. 30-60 Minuten. Die Gesamtdauer des Zellzyklus beträgt 2-4 Tage. Da die Dauer eines Zellzyklus innerhalb einer Zellpopulation relativ konstant und weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen ist,

hängt deren Proliferationsrate eher vom Anteil der im Zellzyklus begriffenen Zellen als von der Dauer des Zellzyklus ab.

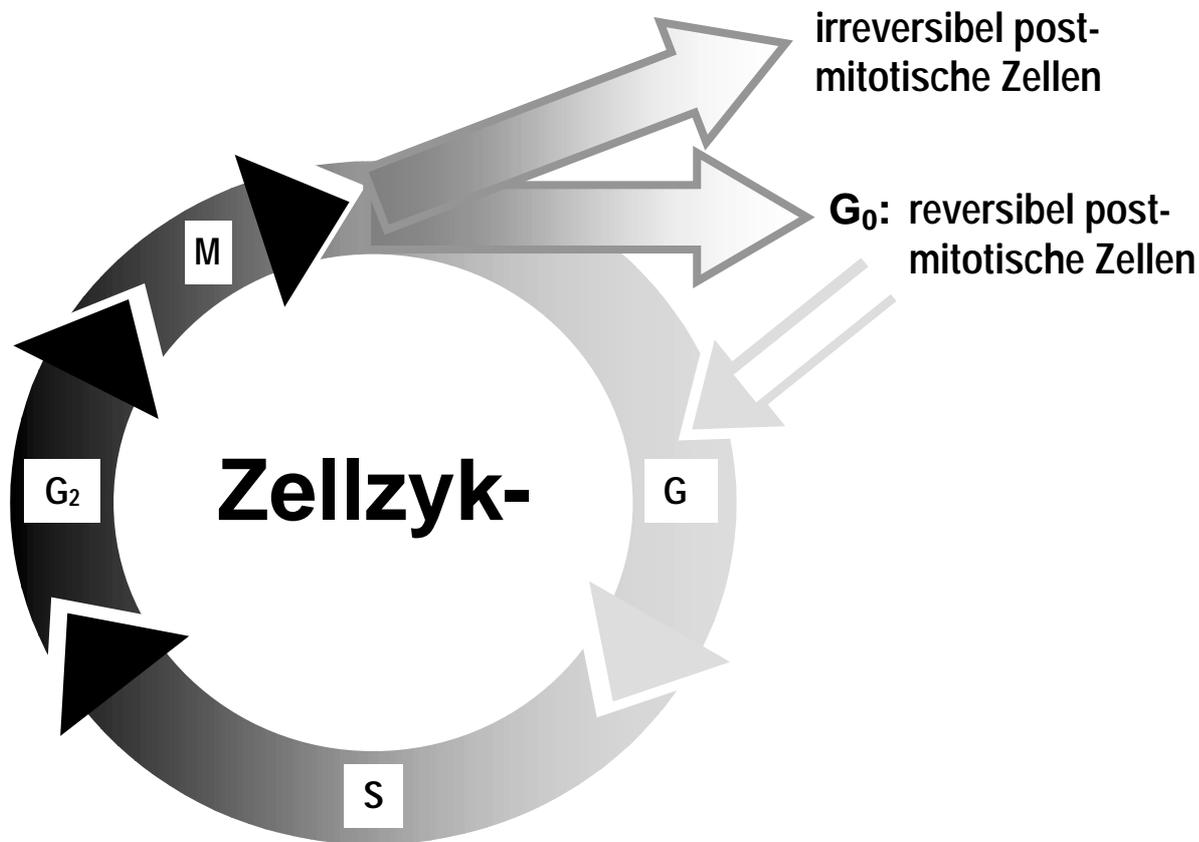


Abbildung 1: Einteilung des Zellzyklus

Die Einteilung des Zellzyklus entspricht nur teilweise den funktionellen Abläufen der Zellproliferation. Beispielsweise können die der G<sub>1</sub>-Phase zugeordneten Vorbereitungen der S-Phase teilweise bereits parallel zur G<sub>2</sub>-Phase und Mitose des vorangegangenen Zellzyklus stattfinden. Ebenso können die der G<sub>2</sub>-Phase zugeordneten Mitose-vorbereitenden Ereignisse mit der S-Phase überlappen.

Unter den teilungsfähigen Zellen werden intermitotische Zellen und reversibel postmitotische Zellen unterschieden. Erstere vermehren sich fortlaufend, wobei bei einer Zellteilung eine der Tochterzellen Stammzelle bleibt, während die andere Tochterzelle in einen Differenzierungsprozeß eintritt. Intermitotische Zellen durchlaufen demnach permanent Zellzyklen. Reversibel postmitotische Zellen haben den Zellzyklus verlassen. Sie sind ausdifferenziert, ihre DNA ist nicht dupliziert. Sie verharren dabei teilweise sehr lange in einem sogenannten G<sub>0</sub>-Status, aus dem sie auf bestimmte Stimuli hin - meist in Form von Wachstumsfaktoren - erneut in den Zellzyklus eintreten können. Irreversibel postmitotische Zellen (z.B. ausdifferenzierte Neuronen) haben ihre Teilungsfähigkeit dauerhaft verloren.

Der Zellzyklus unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Unter den Regulatoren des Zellzyklus nehmen verschiedene Proteinkinasen eine zentrale Rolle ein, die jeweils phasenspezifisch v.a. durch die Anlagerung von Partnerproteinen, den Cyklinen, aktiviert werden. Daher werden sie als cyclin-dependent kinases (CDKs) bezeichnet. Während die CDKs nahezu stets im Überschuß in der Zelle vorhanden sind, unterliegt die Expression der meisten Cyklone in Abhängigkeit vom Zellzyklus-Stadium periodischen Schwankungen, die sich aus Proteolyse und Neusynthese ergeben (PARDEE, 1989; DÄMMRICH, 1990; MORGAN, 1995; IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996; NASMYTH, 1996; FUNK und KIND, 1997).

### 5.2.2. Ki67-Antigen

Ki67-Antigen ist ein Nicht-Histon-Kernprotein, welches ursprünglich im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten entdeckt wurde (MIYACHI et al., 1978; GERLACH et al., 1998). Gegen Ki67-Antigen gerichtete Antikörper erkennen im Western Blot zwei Protein-Banden mit einem Molekulargewicht von 345 bzw. 395 kDa. Ki67-Antigen ist nur in proliferierenden Zellen nachweisbar (GERDES et al., 1991). Nach Verlassen des Zellzyklus und Übergang in den G<sub>0</sub>-Status verschwindet es mit einer Halbwertszeit von ca. 60-90 Minuten (BRUNO und DARZYNKIEWICZ, 1992; HEIDEBRECHT et al., 1996). Bei proliferierenden Zellen ist Ki67-Antigen mit Ausnahme der frühen G<sub>1</sub>-Phase von Zellen, welche neu in den Zellzyklus eintreten, in jeder Phase des Zellzyklus nachweisbar. Hierbei nimmt der Ki67-Antigengehalt v.a. in der zweiten Hälfte der S-Phase zu und ist in der späten S-Phase, der G<sub>2</sub>-Phase und während der Mitose in maximalen Konzentrationen vorhanden, nach der Mitose nimmt der Ki67-Antigengehalt rasch ab (GERDES et al., 1984; WERSTO et al., 1988; BRUNO und DARZYNKIEWICZ, 1992). Ki67-Antigen ist in der Interphase v.a. mit dem Heterochromatin und dem Nucleolus und während der Mitose mit der Oberfläche der kondensierten Chromosomen assoziiert (GERDES et al., 1984; STARBORG et al., 1996). Gehen Zellen aus der Proliferation heraus in die Apoptose über, kann Ki67-Antigen auch in apoptotischen Zellen und apoptotic bodies nachgewiesen werden. Bei der Apoptose von Zellen außerhalb des Zellzyklus ist Ki67-Antigen dagegen nicht nachweisbar (COATES et al., 1996; KUWASHIMA et al., 1997; zur Beziehung Zellzyklus-Apoptose s. Kapitel VI, Abschnitt 6.2.2.1.). Aufgrund der engen Korrelation zwischen der Ki67-Antigenexpression und der Zellproliferation wird der Ki67-Antigennachweis v.a. bei der Charakterisierung des Proliferationsverhaltens von wachsenden Geweben und Tumorgeweben angewandt (YU et al., 1992; IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996). Die biologische Funktion von Ki67-Antigen ist noch ungeklärt. Da die Neutralisation des Ki67-Antigens mittels intrazellulär applizierter spezifischer Antikörper (STARBORG et al., 1996) bzw. mittels spezifischer Antisense-Oligonukleotide (SCHLUETER et al., 1993) die Zellproliferation hemmt, wird unterstellt, daß es essentiell für die Zellproliferation ist.

### 5.2.3. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zum plazentaren Wachstum beim Rind

Detaillierte Informationen zum Proliferationsverhalten einzelner Zellpopulationen aus den Plazentomen des Rindes liegen zur Zeit nicht vor. Bisherige Studien zum plazentaren Wachstum erfaßten lediglich die Gewichtsentwicklung der Plazenta sowie ihrer morphologischen Untereinheiten. Nach BJÖRKMAN (1954) hält das Größenwachstum der Plazentome über die gesamte Dauer der Gravidität an, wobei es in den letzten Monaten der Gravidität allerdings zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums kommt. Die Größenzunahme in den letzten Graviditätsmonaten soll unerheblich sein. Diese Aussage wird jedoch weder mit entsprechendem Datenmaterial belegt noch wird die zeitliche Abhängigkeit des Größenwachstums genauer beschrieben. REYNOLDS et al. (1990) bestimmten das Körpergewicht von Rinderfeten sowie das Gesamtgewicht der Plazentome, der Karunkeln bzw. der Kotyledonen nach Schlachtung von graviden Rindern am 100., 150., 200. sowie am 250. Trächtigkeitstag. Basierend auf den von ihnen erarbeiteten Daten näherten sie das Wachstum von Fetus, Plazentomen, Karunkeln und Kotyledonen mittels Exponentialgleichungen an. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß am 100. Graviditätstag das Gewicht des Fetus ungefähr identisch mit dem Gesamtgewicht der Plazentome ist. Danach verstärkt sich das Wachstum des Fetus erheblich, sodaß dessen Gewicht am 250. Graviditätstag das ca. sechsfache des Gewichts der Plazentome beträgt. Karunkeln und Kotyledonen weisen ebenfalls eine Divergenz ihres Wachstums auf, wobei die Karunkeln nach dem 100. Graviditätstag ein deutlich höheres Gewicht aufweisen. Das Gesamtgewicht von Kotyledonen bzw. Karunkeln geht dabei nach einer kurzen Phase des beschleunigten Wachstums zwischen dem 100. und 150. Graviditätstag in eine konstante Wachstumsphase bis zum ca. 200. Graviditätstag über. Danach verlangsamt sich das Wachstum geringfügig bis zum 250. Trächtigkeitstag. In der Spätphase der Gravidität verstärkt sich die Wachstumsdivergenz von Karunkeln und Kotyledonen offensichtlich weiter (FERRELL, 1990). Während zwischen dem 232. und 271. Graviditätstag das Gewicht der Karunkeln in Abhängigkeit von der genetischen Konstellation von Vater- und Muttertier weiter um ca. 10-75% zunahm, blieb das Gewicht der Kotyledonen in diesem Zeitraum konstant oder reduzierte sich sogar geringfügig.

### 5.3. Eigene Untersuchungen

#### 5.3.1. Material und Methoden

##### 5.3.1.1. Probenmaterial, Probenaufbereitung und immunhistologische Darstellung des Ki67-Antigens

Die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen in den Plazentomen des Rindes an den Graviditätstagen 150, 220, 240 und 270 sowie unter der termingerechten Geburt (n= 3 Tiere/Versuchsgruppe) wurden an dem in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.1. beschriebenen formalinfixierten Probenmaterial durchgeführt.

Das immunhistologische Verfahren zum Nachweis des Ki67-Antigens ist weitgehend identisch mit den in Kapitel IV, Abschnitte 4.3.2. bzw. 4.3.3. beschriebenen Methoden zur Darstellung von Progesteron- bzw. Östrogenrezeptoren:

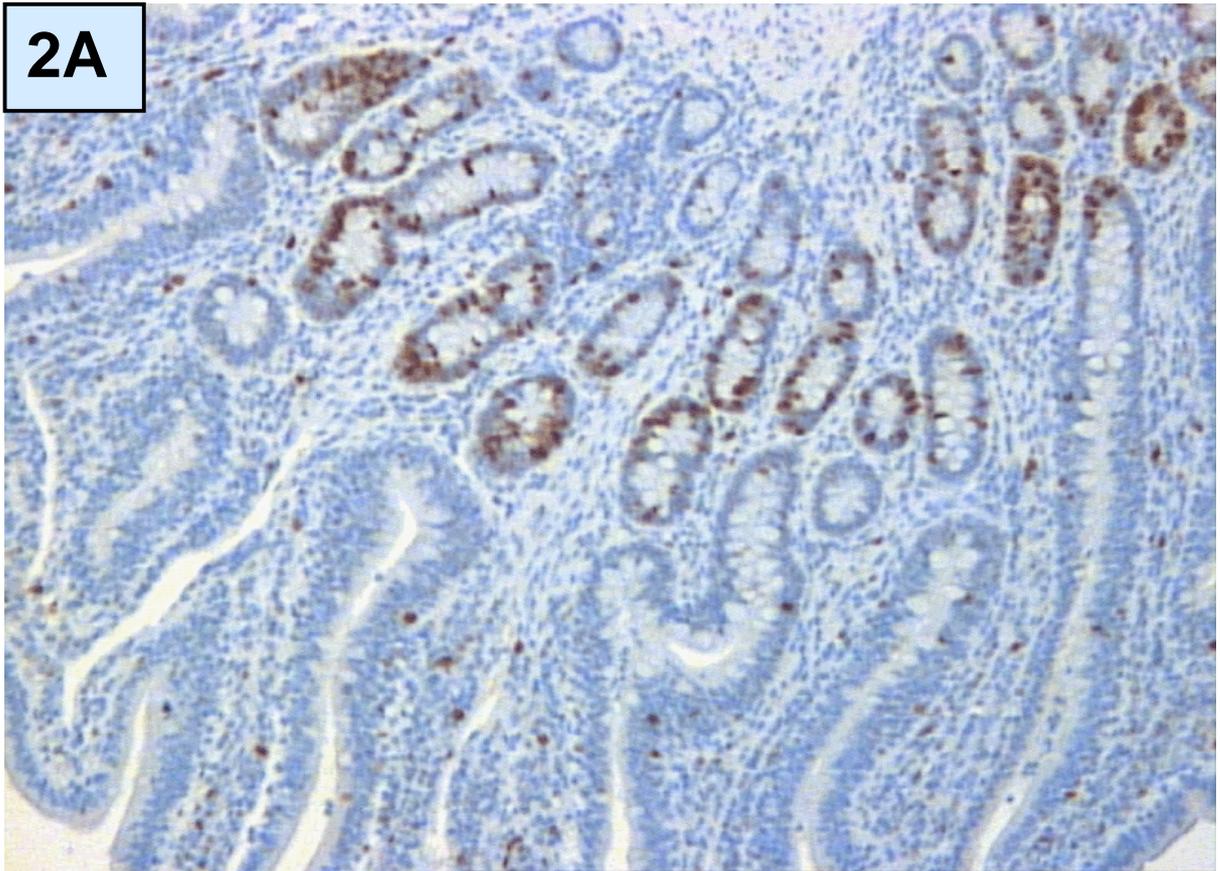
1. Entparaffinierung der ca. 3 µm dicken Gewebeschnitte 2 x 20 Minuten in Xylol.
2. Rehydrierung der Schnitte in einer Ethanolreihe: Inkubation für 2 x je 10 Minuten in reinem Ethanol, danach je 5 Minuten in 96%igem, 80%igem, 70%igem bzw. 50%igem Ethanol; anschließend Inkubation für jeweils 5 Minuten in Aqua dest. und PBS-Puffer pH 7.2.
3. Mikrowellenbehandlung zur Demaskierung der Epitope.
  - a) Äquilibrierung für 5 Minuten in 10 mM Zitratpuffer pH 6.0 bei Raumtemperatur.
  - b) Mikrowelleninkubation: 3 x 5 Minuten bei 800 W in vorerhitztem 10 mM Zitratpuffer pH 6.0; in den Inkubationspausen Auffüllen des durch Verdunstung verlorenen Anteils des Zitratpuffers durch Aqua dest.
  - c) Abkühlung auf Raumtemperatur (10 Minuten).
4. Waschen in Aqua dest.. (2 x 2 Minuten), dann in PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten).
5. Inaktivierung der endogenen Peroxidase: 20-minütige Inkubation in PBS/0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
6. Waschen in PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten).
7. Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Überschichten der Schnitte mit PBS-Puffer/10% inaktiviertes Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) für 30 Minuten.
8. Absaugen der Blockierungslösung.
9. Auftragen des Primärantikörpers (MIB1, Vector Laboratories CA94010 Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:5 in PBS-Puffer pH 7.2 und Inkubation für 20 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer.
10. Absaugen und Waschen mit PBS-Puffer pH 7.2 (3 x 5 Minuten).
11. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers (Pferd-anti-Maus-IgG; Vector Laboratories CA94010 Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.
12. Absaugen und Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in PBS-Puffer pH 7.2).

13. Überschichten der Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Vector Laboratories CA94010 Burlingame, USA) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.
14. Absaugen und Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in PBS-Puffer pH 7.2).
15. Inkubation der Schnitte in der Substrat-Lösung (0.05% Diaminobenzidinhydrochlorid-Dihydrat/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM Imidazolpuffer pH 7.08) für 150 Sekunden.
16. Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in Aqua dest.).
17. Leichte Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin.
18. Eindecken in Kaisers Glyzerin-Gelatine (Merck KgaA, D-64271 Darmstadt).

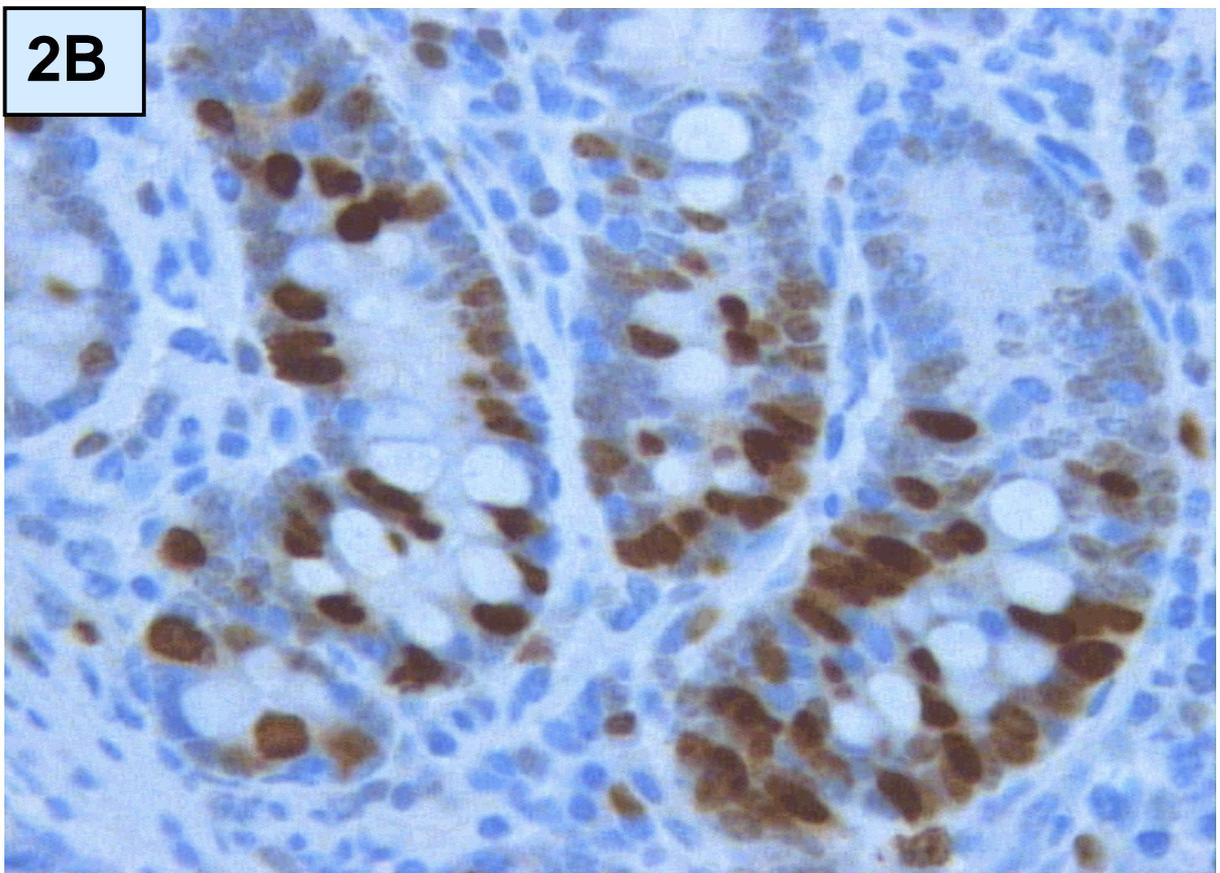
Als positive Kontrolle diente die Dünndarmmukosa eines Rindes. Als negative Kontrolle wurden von jedem Block Schnitte im Test mitgeführt, bei denen der Primärantikörper durch PBS bzw. durch einen irrelevanten murinen, gegen das  $\alpha$ -Toxin von *Clostridium perfringens* gerichteten monoklonalen Antikörper desselben Isotyps (IgG1) ersetzt wurde (s. Kapitel IV, Abschnitt 4.3.3.).

- Abbildung 2: Immunhistologischer Nachweis des Ki67-Antigens: Reaktionsmuster in der als positive Kontrolle eingesetzten Dünndarmmukosa eines Rindes.
- A) Übersicht (Vergrößerung: x100). Positive Reaktionen finden sich bevorzugt in den tiefen Kryptepithelien.
  - B) Anschnitte tiefer Schleimhautkrypten. Positive nukleäre Signale sind in der Mehrzahl der Kryptenepithelzellen vorhanden (Vergrößerung: x400).

**2A**



**2B**



### 5.3.1.2. Bestimmung des Anteils Ki67-positiver Zellen zur quantitativen Erfassung der Proliferation verschiedener Zellpopulationen in den Plazentomen

Zur quantitativen Erfassung der Zellproliferation wurde das in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.4. für die quantitative Erfassung der Progesteron- bzw. Östrogenrezeptorexpression beschriebene Auswertungsverfahren für die Bestimmung des Prozentsatzes Ki67-Antigen-positiver (Ki67<sup>+</sup>-) Zellen angewandt. Pro Plazentom wurden drei Schnitte, jeweils unterteilt in drei Zonen, ausgewertet. Da im Gegensatz zum immunhistologischen Nachweis von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor Ki67<sup>+</sup>-Reaktionen in allen Zellpopulationen der Plazentome nachweisbar waren, erfolgte die quantitative Auswertung getrennt nach vier Zellkategorien:

1) **Karunkelstroma**. Hierbei wurde primär die Reaktion in den Bindegewebszellen beurteilt. Da die immunhistologischen Schnitte morphologisch nur eine eingeschränkte Identifizierung der Zelltypen des maternalen Stromas erlaubte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß zu einem geringen Anteil die Reaktion in tangential angeschnittenen Wänden und Endothelien kleinerer Blutgefäße mit erfaßt wurde.

2) **Karunkelepithel**. In dieser Kategorie wurden ausschließlich Epithelzellen maternalen Ursprungs erfaßt, während eingewanderte Trophoblastzellen nicht berücksichtigt wurden.

3) **Stroma der Chorionzotten** (= fetales Stroma). Hier wurde aufgrund der Schwierigkeiten hinsichtlich einer sicheren Differenzierung zwischen Bindegewebszellen und Kapillarendothelien beide Zellpopulationen gemeinsam erfaßt, wobei die Bindegewebszellen die bei weitem überwiegende Zellpopulation darstellte. Eindeutig identifizierbare, größeren Gefäßen zuzuordnende Zellen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Bedingt durch den geringen Anteil des fetalen Stromas in bestimmten Bereichen einiger Schnitte wurde die Gesamtzahl von mindestens 200 ausgewerteten Zellen pro Zone in wenigen Fällen nicht erreicht. Die Anzahl der pro Schnitt insgesamt ausgewerteten Zellen des fetalen Stromas pro Zone betrug jedoch auch in diesen Ausnahmefällen mindestens 150.

4) **Trophoblastzellen**. Aufgrund der beim Rind bisher unvollständigen Charakterisierung der Trophoblastzellen und der in den immunhistologischen Präparaten durch den Strukturverlust häufig nicht möglichen eindeutigen Zuordnung der Trophoblastzellen in Hauptzellen („uninukleäre Trophoblastzellen“) bzw. Trophoblastriesenzellen („binuclear cells“, BNC) wurden alle Zellen des Trophoblasten gemeinsam erfaßt.

### 5.3.1.3. Versuchsaufbau und statistische Auswertungen

#### 5.3.1.3.1. Quantitative Erfassung der Zellproliferation zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie)

Zur quantitativen Erfassung des prozentualen Anteils Ki67<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der oben definierten Zellkategorien in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe sowie der Lokalisation innerhalb des Plazentoms (Zone I-III) wurde von jedem der jeweils drei Versuchstiere des 150., 220., 240. und 270. Graviditätstages sowie von drei Tieren unter der termingerechten Geburt

je ein willkürlich ausgewähltes, mittelgroßes, im Bereich des Fetus lokalisiertes Plazentom wie in Abschnitt 5.3.1.2. beschrieben analysiert. Unter der Geburt wurde lediglich die Reaktion im Karunkelstroma quantitativ beurteilt, da das Karunkelepithel zu diesem Zeitpunkt bis auf geringe Reste vollständig verschwunden war und in den Kotyledonen aufgrund der geburtsbedingten Veränderungen eine sichere Identifizierung vieler Zellen nicht möglich war.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten umfasste

1) für jede der vier Zellkategorien eine vierfache hierarchische Varianzanalyse nach dem in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.5.1. beschriebenen gemischten Modell (BMDP8V, BMDP statistical software - DIXON, 1993), welches folgende vier Haupteffekte beinhaltete:

- Versuchsgruppe (G) - fixer Effekt;
- Tier innerhalb der Versuchsgruppe (T[G]) - zufälliger Effekt;
- Schnitt innerhalb des Tieres (S[TG]) - zufälliger Effekt;
- Zone (Z) - fixer Effekt.

2) für jede der vier Zellkategorien eine Varianz- und Kovarianzanalyse mit Meßwiederholung im Faktor Zone (BMDP2V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) zur Untersuchung auf einen linearen Trend bezüglich des Trächtigkeitstages (= Kontrollvariable).

3) eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Trächtigkeitsstadium, Zellpopulation) mit Messwiederholung im Faktor Zellpopulation (BMDP2V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) zur Untersuchung auf einen Einfluß des Faktors Zellpopulation unter Einbeziehung aller vier Zellkategorien.

4) eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Trächtigkeitsstadium, Zellpopulation) mit Messwiederholung im Faktor Zellpopulation (BMDP2V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) zur Untersuchung auf einen Einfluß des Faktors Zellpopulation unter Einbeziehung des Karunkelstromas und des fetalen Stromas (paarweiser Vergleich der Stromaanteile).

5) eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Trächtigkeitsstadium, Zellpopulation) mit Messwiederholung im Faktor Zellpopulation (BMDP2V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) zur Untersuchung auf einen Einfluß des Faktors Zellpopulation unter Einbeziehung des Karunkelepithels und des Trophoblasten (paarweiser Vergleich der epithelialen Anteile).

#### **5.3.1.3.2. Untersuchungen zur Variabilität der Zellproliferation zwischen den Plazentomen eines Individuums (horizontale Studie)**

Bedingt durch die begrenzte Verfügbarkeit von Probenmaterial wurde in Abschnitt 5.3.1.3.1. pro Tier nur jeweils ein Plazentom quantitativ analysiert. Zur Abschätzung der Variabilität hinsichtlich der Zellproliferation zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums wurden von einer 270 Tage tragenden Kuh fünf Plazentome wie in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.1. beschrieben entnommen und fixiert. Bei der Probenentnahme wurden deren maximaler Durchmesser und die Lokalisation innerhalb des Uterus registriert. Für jedes dieser fünf Plazentome wurde nach dem im Abschnitt 4.3.4. beschriebenen Verfahren für jede der oben definierten Zellkategorien der prozentuale Anteil an Ki67<sup>+</sup>-Zellen bestimmt. Zur statisti-

schen Auswertung wurde für jede Zellkategorie zunächst eine Varianzzerlegung mittels dreifaktorieller hierarchischer Analyse nach dem gemischten Modell (BMDP8V - DIXON, 1993) durchgeführt, welche folgende drei Effekte beinhaltet:

- a) Plazentom (P) - zufälliger Effekt;
- b) Schnitt innerhalb des Plazentoms (S[P]) - zufälliger Effekt;
- c) Zone (Z) - fixer Effekt.

Im Fall einer signifikant positiven Streuung der Meßgröße zwischen den Plazentomen wurde mittels einer Kovarianzanalyse (BMDP2V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) mit der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser* auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Plazentomgröße und dem Prozentsatz positiver KSZ untersucht.

### **5.3.1.4. Reagenzien, Chemikalien, Geräte und Lösungen**

#### **5.3.1.4.1. Reagenzien und Chemikalien**

##### **Carl Roth GmbH + Co, D-76185 Karlsruhe**

Ethanol 99.6% DAB10

##### **Fluka Chemie AG, CH-9471 Buchs**

3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)

##### **Merck KGaA, D-64271 Darmstadt**

Kaisers Glyzeringelatine

Wasserstoffperoxid 30%

##### **Merck-Schuchardt, D-85662 Hohenbrunn**

Xylol zur Synthese

##### **SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, D82039 Deisenhofen**

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid Dihydrat

##### **Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA**

Monoklonaler Antikörper MIB1 gegen das Ki67-Antigen

Pferd-anti-Maus-IgG, biotinyliert

Pferde-Normalserum S-2000

Streptavidin-Peroxidase-Komplex

##### **Vogel, D-63396 Giessen**

Histo-Comp (Paraffinersatz)

#### **5.3.1.4.2. Geräte**

##### **Moulinex GmbH, D-42719 Solingen**

Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50

**5.3.1.4.3. Lösungen****PBS-Puffer pH 7.2**

NaCl	7.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43
Aqua dest.	ad 1000 ml

**PBS-gepuffertes neutrales Formalin**

Formol (40%)	500 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32.5 g
Aqua dest	ad 5000 ml

**50 mmol Imidazolpuffer pH 7.08**

Imidazol	8.51 g
Aqua dest.	ad 2000 ml

pH-Wert mit HCl auf 7.08 einstellen

**DAB-Substratlösung**

50 mmol Imidazolpuffer pH 7.08	200 ml
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	0.1 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% ig)	70 µl

Direkt frisch vor Gebrauch ansetzen und filtrieren

**10 mmol Zitratpuffer pH 6.0**

Lösung A:

C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.101 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Lösung B:

C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.941 g
Aqua dest.	ad 100 ml

9 ml Lösung A und 41 ml Lösung B mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen.

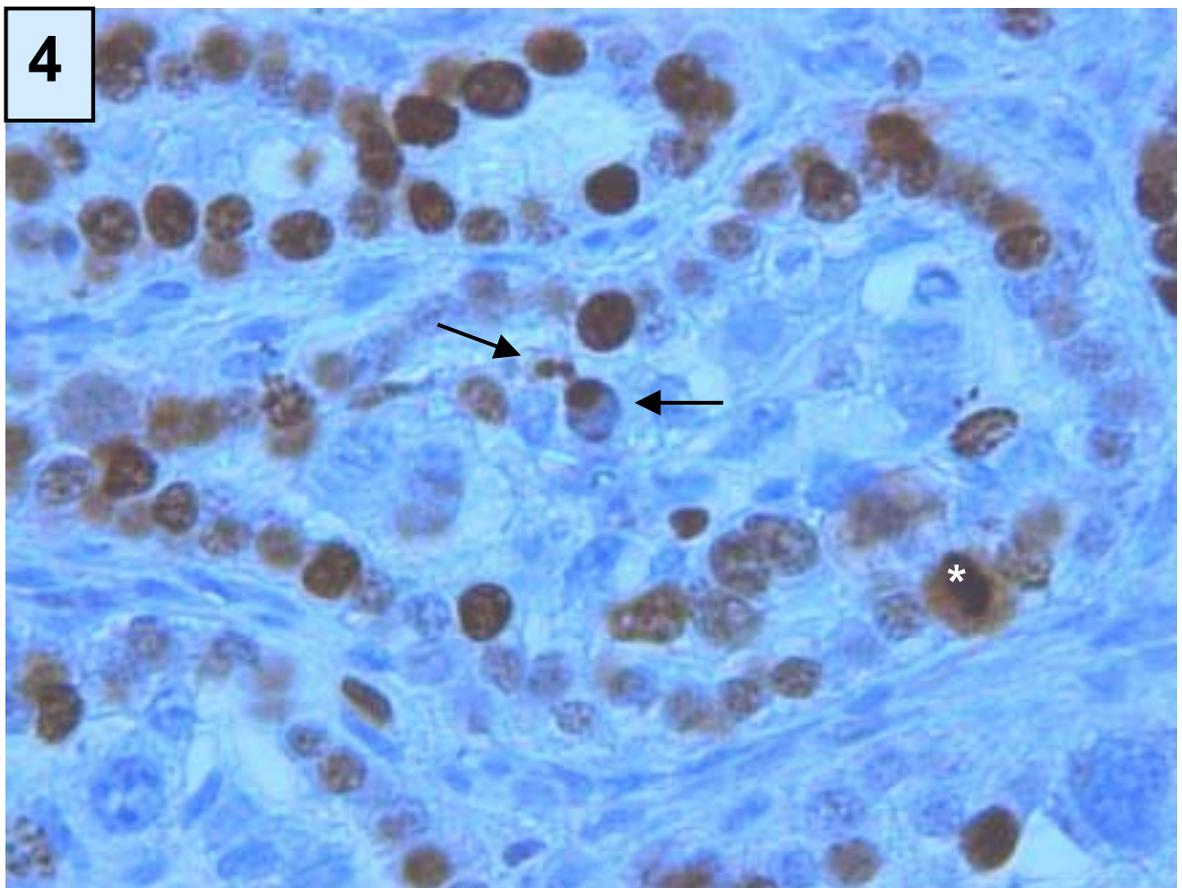
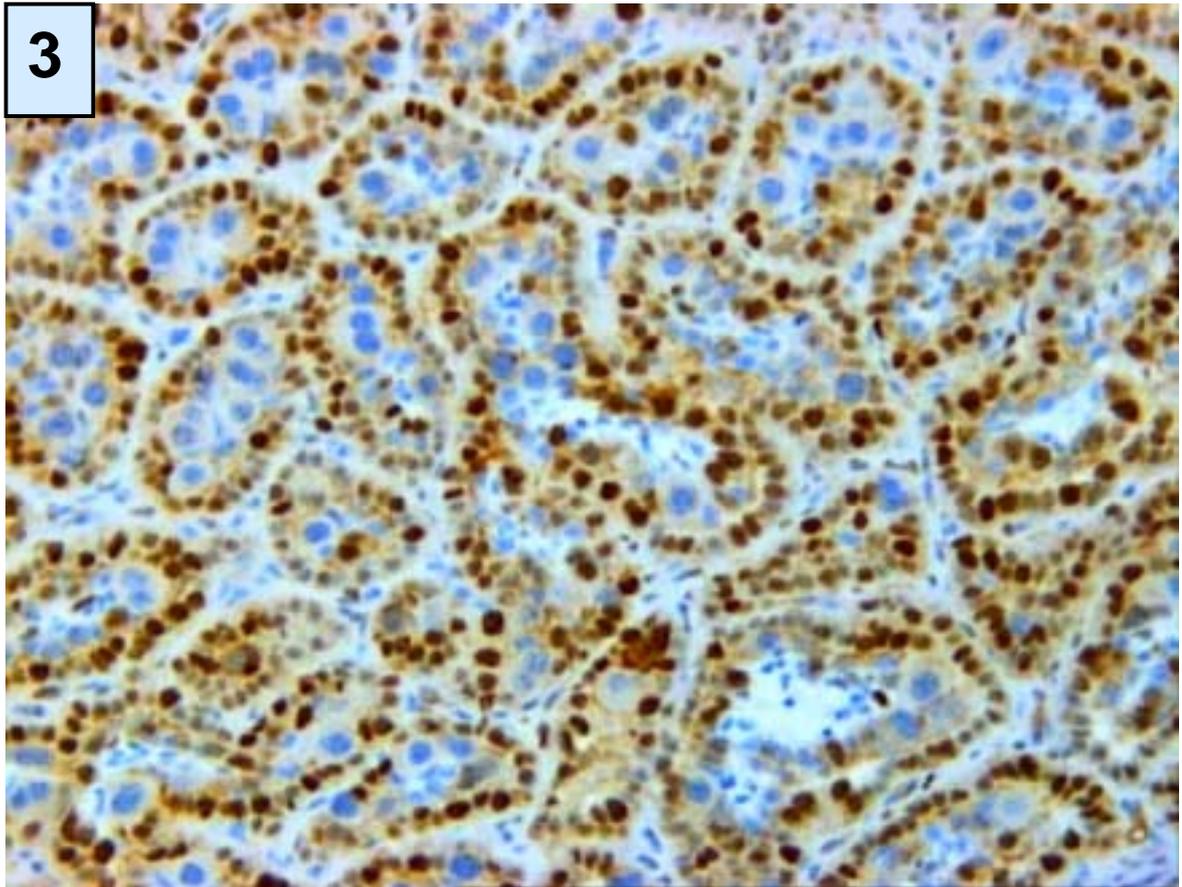
### 5.3.2. Ergebnisse

#### 5.3.2.1. Reaktionsmuster des immunhistologischen Nachweises des Ki67-Antigens in den Plazentomen gravider Rinder bzw. unter der Geburt.

In Präparaten gravider Tiere fanden sich positive Reaktionen in jeder der vier beurteilten Zellkategorien (s. Abbildungen 3-6), wobei das spezifische Signal in Zellen mit intakter Kernmembran fast ausschließlich nukleär lokalisiert war. Lediglich in mitotischen Zellen mit aufgelöster Kernmembran wurde vor der Trennung der Chromatiden neben einem intensiven chromatingebundenen Signal eine schwächere diffuse Reaktion im restlichen Zelleib beobachtet (s. Abbildung 4). Bereits beim Durchmustern der Präparate aller graviden Tiere war erkennbar, daß der Anteil der Ki67-Antigen-positiven Zellen im Karunkelepithel stets deutlich höher war als in den übrigen beurteilten Zellkategorien. Auch bei den 270 Tage graviden Tieren reagierte die bei weitem überwiegende Mehrzahl der Karunkelepithelzellen Ki67-Antigen-positiv (s. Abbildung 5A). Als Besonderheit wurden bei einem Tier der 270-Tage-Gruppe in der oberflächlich gelegenen Zone I im Karunkelepithel gehäuft Ki67-Antigen-positive Synzytien mit bis zu 20 Zellkernen angetroffen (s. Abbildungen 5B-5D). Nahezu alle dieser Kerne reagierten deutlich Ki67-Antigen-positiv und zeigten teilweise unterschiedlich stark ausgeprägte Anzeichen der Degeneration, wobei in den Kernen zum Teil die apoptosecharakteristische Anlagerung des kondensierten Chromatins an die Innenseite der Kernmembran beobachtet wurde (s. Abbildung 5D). Morphologisch gleichartige Synzytien wurden in peripheren Karunkelkrypten der beiden anderen Tieren dieser Versuchsgruppe ebenfalls beobachtet. Auch bei Tieren anderer Trächtigkeitsstadien fanden sich gelegentlich derartige, dem Karunkelepithel zuzuordnende Synzytien. Im Gegensatz zu dem oben erwähnten Einzeltier waren bei den restlichen Kühen die Synzytien im Durchschnitt deutlich kleiner und Ki67-Antigen-positive Reaktionen in deren Kernen erheblich seltener.

Abbildung 3: Immunhistologischer Nachweis des Ki67-Antigens in einem Plazentom eines 150 Tage graviden Rindes. In der Übersicht ist zu erkennen, daß im Karunkelepithel positive Reaktionen weitaus häufiger sind als in allen anderen Zellpopulationen (Vergrößerung: x160)

Abbildung 4: Immunhistologischer Nachweis des Ki67-Antigens in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes. Abgebildet ist der Anschnitt einer Chorionzotte, umgeben von überwiegend Ki67-Antigen-positiven Karunkelepithelzellen. Im rechten unteren Bildbereich befindet sich eine Karunkelepithelzelle in der Metaphase der Mitose (\*). Ki67-positive Reaktionen in den anderen Zellpopulationen sind erheblich seltener. In der Bildmitte sind im Trophoblasten Ki67-Antigen-positive Zelltrümmer (↓) mit morphologischen Charakteristika von „apoptotic bodies“ zu erkennen, welche offensichtlich einer Karunkelepithelzelle entstammen (Vergrößerung: x400).



Meist im Bereich der fetomaternalen Grenzlinie fanden sich dreikernige Zellen mit jeweils zwei großen, Ki67-Antigen-negativen-Kernen und einem deutlich kleineren, meist deformierten dritten Kern, der sich häufig in einem der von den beiden großen Kernen gebildeten Winkeln befand und in vielen Fällen ein Ki67-Antigen-positives Signal aufwies (s. Abbildungen 6A und 6B). Bei diesen Zellen handelte es sich offensichtlich um fetomateriale Hybridzellen, da die beiden größeren, stets Ki67-Antigen-negativen Kerne in ihrer Morphologie denen von Trophoblastriesenzellen entsprachen. Positive Reaktionen in Trophoblastzellen mit zwei Kernen in der Schnittebene fanden sich relativ selten. Stets waren beide Kerne in gleicher Intensität angefärbt.

Unter der Geburt zeigte sich eine deutliche Veränderung des Reaktionsmusters, die nur teilweise auf die erheblichen geburtsbedingten Veränderungen im Zellbild zurückzuführen waren (s. Abbildung 7A). In den wenigen Resten des Karunkelepithels fanden sich auch unter der Geburt teilweise deutlich positive Reaktionen. Im Karunkelstroma waren weiterhin in einem hohen Anteil der Zellen positive Reaktionen vorhanden (s. Abbildungen 7A und 7C). Im Stroma der Chorionzotten, in dem bereits während der Trächtigkeit positive Reaktionen selten gefunden wurden, waren unter der Geburt - soweit beurteilbar - keine eindeutig positiven Reaktionen mehr nachzuweisen. Eine erhebliche Veränderung ergab sich im Trophoblasten: positive Reaktionen waren unter der Geburt im Vergleich zur Trächtigkeit seltener und betrafen ausschließlich einkernige Zellen, welche in nahezu allen Fällen eine charakteristische Kernstruktur aufwiesen. Das meist intensiv Ki67-Antigen-positiv angefärbte Chromatin dieser Zellen war in multiplen Granula von ähnlicher Größe kondensiert, während das Nukleoplasma kaum angefärbt war (s. Abbildungen 7A und 7B).

---

Seite 231

Abbildung 5: Immunhistologischer Nachweis des Ki67-Antigens in einem Plazentom eines 270 Tage graviden Rindes.

- A) Charakteristisches Reaktionsmuster des Ki67-Antigen-Nachweises im Karunkelepithel wenige Tage vor dem erwarteten Geburtstermin. Das Karunkelepithel ist gegenüber früheren Graviditätsstadien deutlich abgeflacht, erkennbar an den größeren Abständen zwischen den häufig flachen Zellkernen. Weiterhin ist das Zellbild im Karunkelepithel gegenüber den früheren Untersuchungsstadien heterogener. Vergleichbar den früheren Untersuchungsstadien reagiert die Mehrzahl der Zellkerne des Karunkelepithels auch unmittelbar vor Beendigung der Gravidität Ki67-Antigen-positiv (Vergrößerung: x300).
- B) Zahlreiche Ki67-positive, aus Karunkelepithelzellen hervorgegangene Synzytien im oberflächlichen Bereich eines Plazentoms eines 270 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: x160).
- C) Großes Karunkelepithelzell-Synzytium mit zahlreichen Ki67-Antigen-positiven Kernen (Vergrößerung: x440).
- D) Degenerierendes Karunkelepithelzell-Synzytium mit Apoptose-charakteristischer Kernmorphologie (Vergrößerung: x800; Öl-Immersion).

KS= Karunkelepithel; \*= Trophoblastriesenzelle

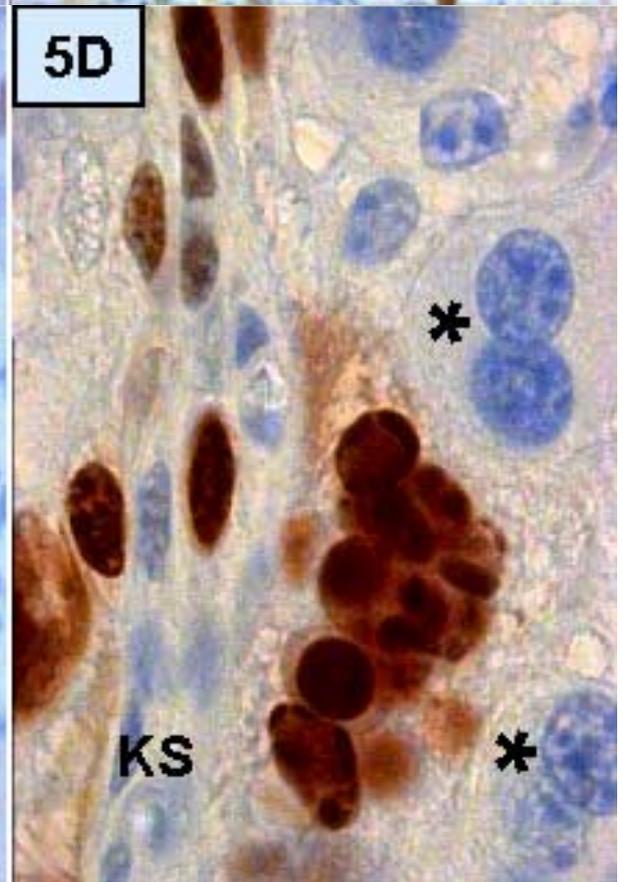
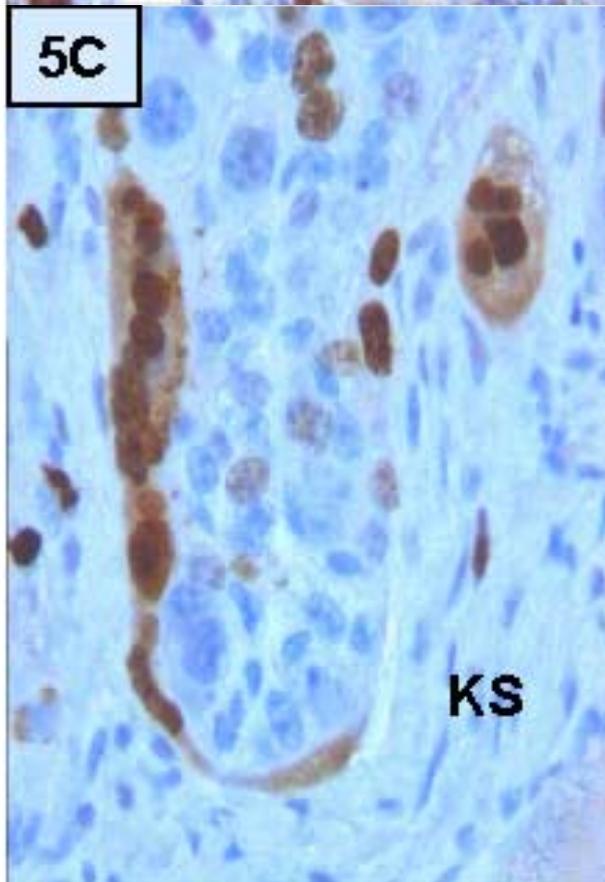
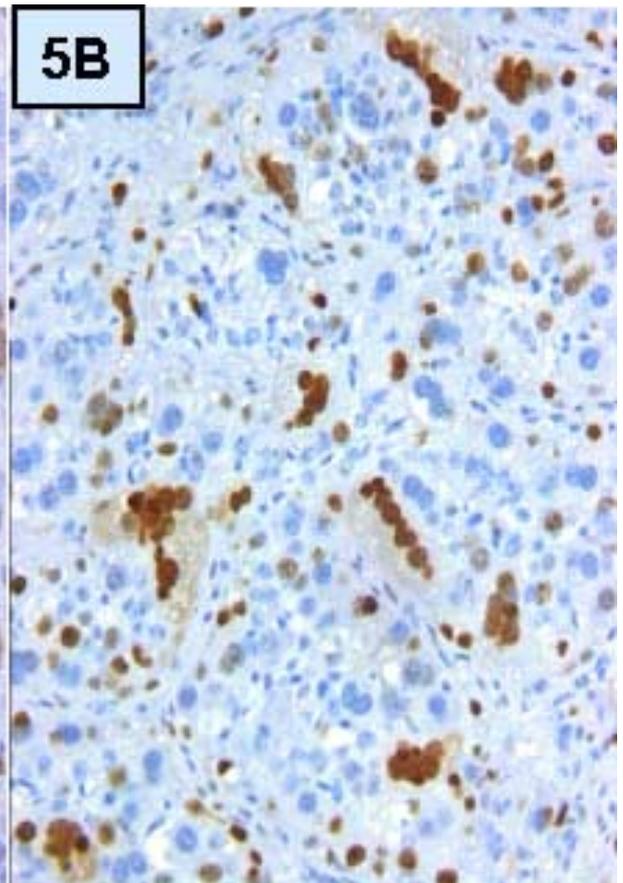
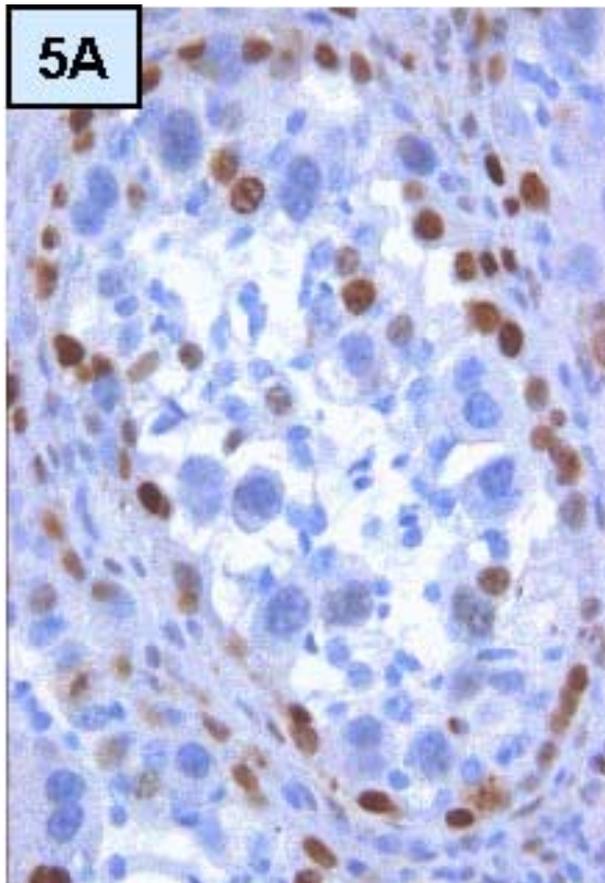


Abbildung 6: Immunhistologischer Nachweis des Ki67-Antigens in trinukleären, offensichtlich fetomaternalen Hybridzellen (TNC; ↓).

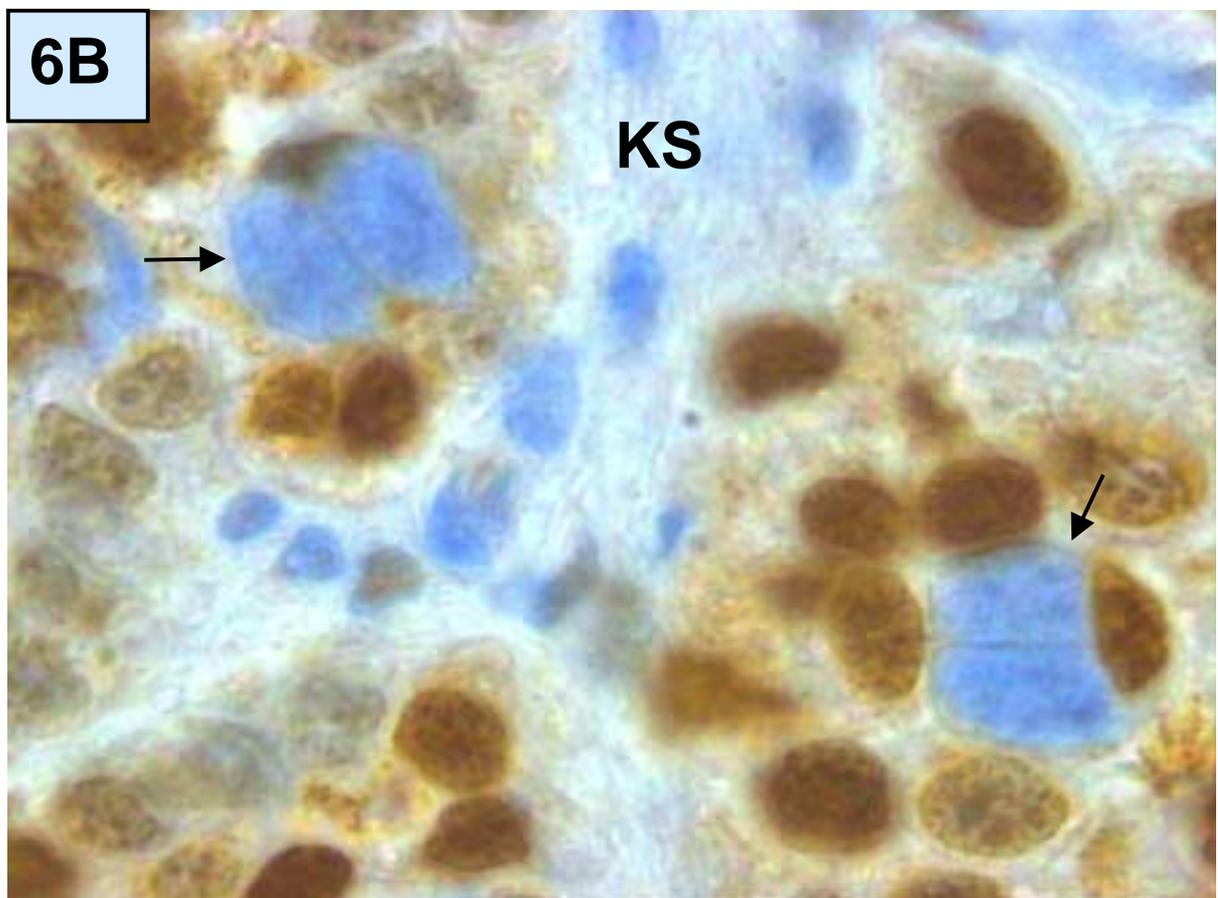
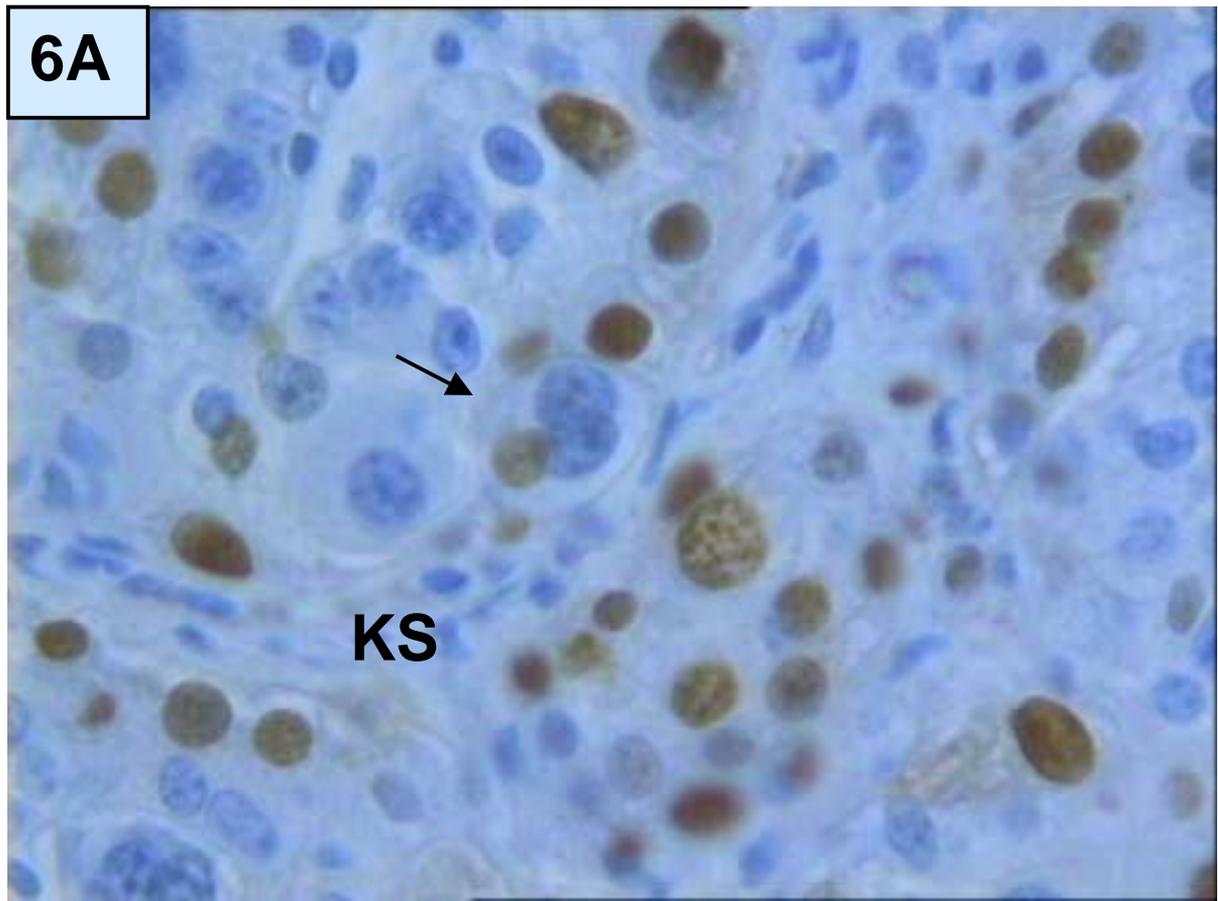
- A) Vermutlich handelt es sich bei dieser TNC um ein Stadium kurz nach der Fusion, da sie einen breiten Zytoplasmasaum besitzt und der kleinere Ki67-Antigen-positive Kern maternalen Ursprungs morphologisch intakt erscheint (Tag 150 der Gravidität; Vergrößerung: x400).
- B) Zwei TNC mit Ki67-Antigen positivem Signal in den pyknotischen Kernen maternalen Ursprungs (↓). Als weiteres Zeichen der Degeneration haben die beiden abgebildeten TNC einen Großteil ihres Zytoplasmas verloren (Tag 150 der Gravidität; Vergrößerung: x1000, Ölimmersion).

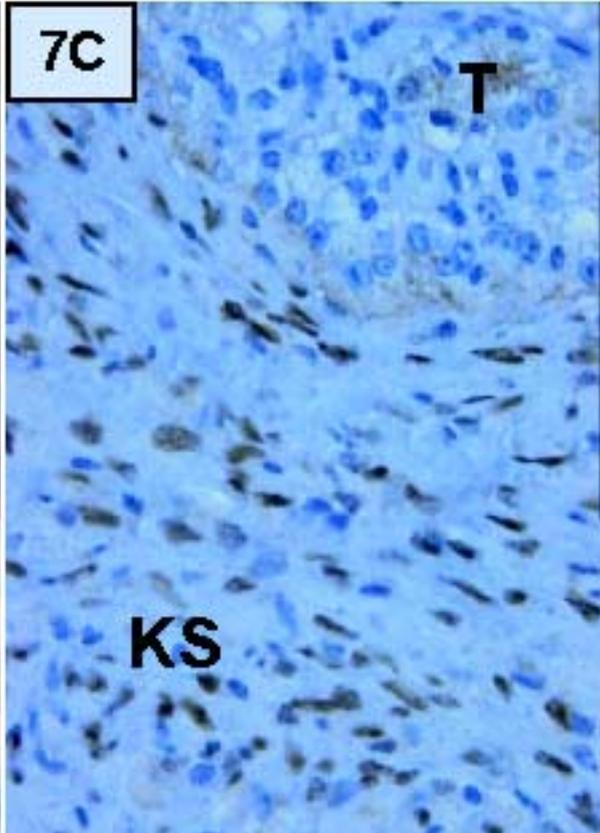
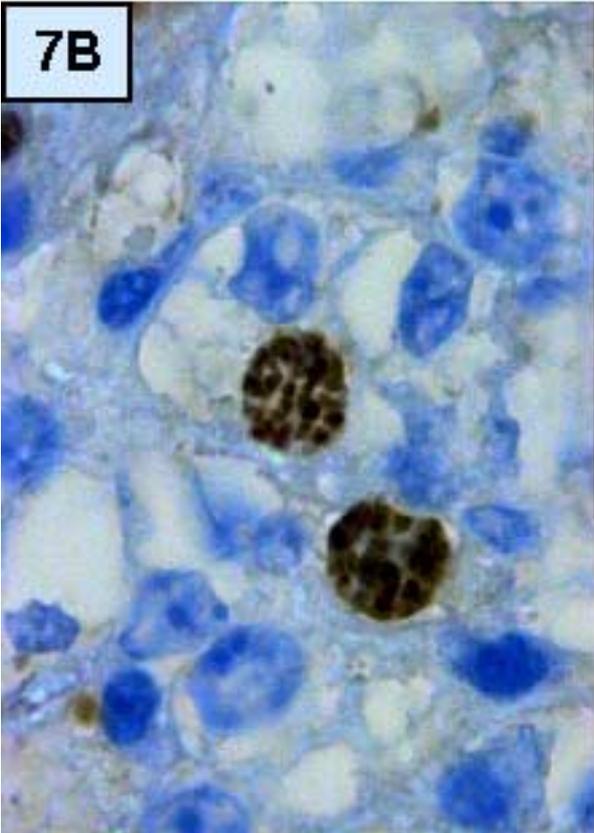
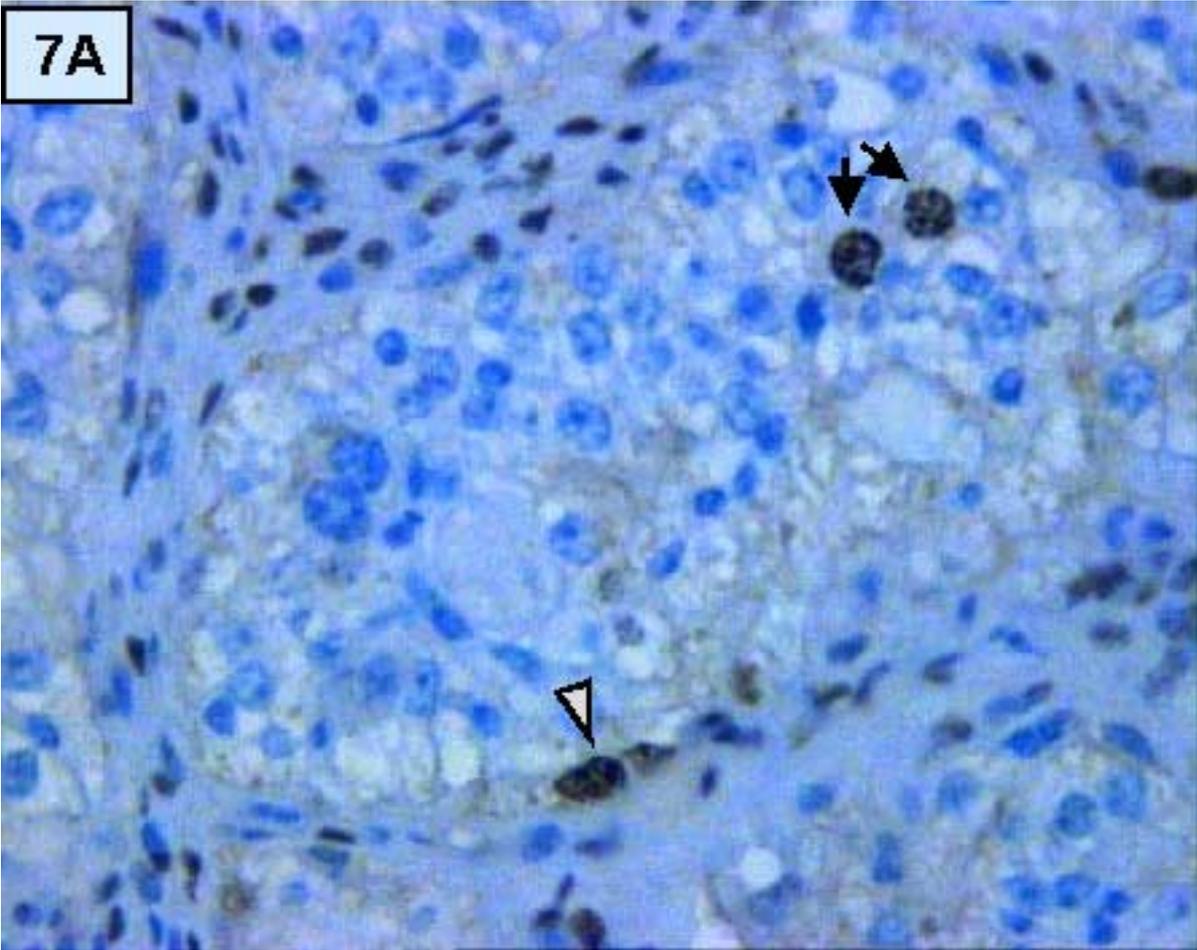
KS= Karunkelstroma

Abbildung 7: Charakteristisches Reaktionsmuster des immunhistologischen Ki67-Antigen-Nachweises in Plazentomen zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt.

- A) Querschnitt einer Chorionzotte, ringförmig umgeben von deutlich verbreiterten maternalen Karunkelsepten mit zahlreichen Ki67-Antigen positiven Zellkernen. Das Karunkelepithel ist bis auf geringe, jedoch teilweise Ki67-Antigen-positive Reste (∇) verschwunden. Im Trophoblasten sind zwei deutlich Ki67-Antigen-positive Zellkerne (↓) zu erkennen (Vergrößerung: x320).
- B) Charakteristische Chromatinstruktur unter der Geburt Ki67-Antigen-positiver Trophoblastzellen. Das in viele kompakte Granula kondensierte Chromatin ist intensiv angefärbt, während das Nukleoplasma weitgehend ungefärbt erscheint (Vergrößerung: x1100; Ölimmersion).
- C) Reaktionsmuster des immunhistologischen Ki67-Antigen-Nachweises im Karunkelstroma. Abgebildet ist ein breites maternales Septum mit zahlreichen Ki67-Antigen-positiven Karunkelstromazellen. Das Karunkelepithel ist im Bildausschnitt vollständig verschwunden. Im angrenzenden Trophoblasten sind keinerlei positive Reaktionen vorhanden (Vergrößerung: x320).

KS= Karunkelstroma; T= Trophoblast





### 5.3.2.2. Verlauf der Ki67-Antigen-Expression in den Plazentomen zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt (longitudinale Studie).

Bei der Betrachtung des prozentualen Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen ( $[\%Ki67^+]$ ) in Abhängigkeit vom Untersuchungsstadium (s. Abbildung 8) fällt das zwischen den vier definierten Zellkategorien sehr unterschiedliche Proliferationsverhalten auf. Dem entsprechend wird  $[\%Ki67^+]$  hochsignifikant durch den Faktor Zellpopulation beeinflusst ( $p < 0.0001$ ; s. Tabelle 1). Ebenso ergab ein paarweiser Vergleich zwischen Karunkelepithel und Trophoblast sowie zwischen Karunkelstroma und dem Stroma der Chorionzotten hochsignifikante Unterschiede (jeweils  $p < 0.0001$ ).

Die niedrigste proliferative Aktivität wurde im *Stroma der Chorionzotten* (= fetales Stroma) gefunden (s. Abbildung 8). Dort sinkt  $[\%Ki67^+]$  von  $10.5 \pm 1.7$  am 150. Graviditätstag auf  $2.8 \pm 0.4$  am 270. Graviditätstag. Die vierfaktorielle Varianzanalyse ergab einen hochsignifikanten Einfluß der Versuchsgruppe ( $p < 0.01$ ; s. Tabelle 2). Die Kovarianzanalyse bestätigte einen signifikanten linearen Trend ( $p < 0.01$ ; s. Tabelle 3) bezüglich der Trächtigkeitsdauer mit einem Regressionskoeffizienten von  $-0.056\%/Tag$  (s. Abbildung 9).

Ein signifikanter Einfluß der Versuchsgruppe auf  $[\%Ki67^+]$  ergab sich auch für das *Karunkelstroma* ( $p < 0.02$ ; s. Tabelle 2). Im Karunkelstroma fällt  $[\%Ki67^+]$  von  $30.9 \pm 1.5$  am 150. Graviditätstag zunächst zum 220. Graviditätstag auf  $10.6 \pm 3.4$  ab und steigt zur Geburt hin wieder stetig auf  $45.3 \pm 5.5$  an, wobei am 270. Graviditätstag eine starke Streuung der Meßwerte auffällt. Für den Verlauf von  $[\%Ki67^+]$  im Karunkelstroma ergab sich ein signifikanter nichtlinearer Trend (polynomiale Regression:  $p < 0.05$ ), welcher zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag durch ein Polynom 2. Grades mit der Formel  $y = 220 - 1.96x + 0.0046x^2$  beschrieben werden kann, wobei x für den Tag der Trächtigkeit steht (s. Abbildung 10).

Im *Karunkelepithel* war  $[\%Ki67^+]$  zu allen untersuchten Trächtigkeitsstadien deutlich höher als in den restlichen erfaßten Zellkategorien. Zwischen dem 150. und 270. Trächtigkeitstag ergab sich ein ähnlicher Verlauf wie im Karunkelstroma mit einer temporären Depression der Proliferation am 220. und 240. Graviditätstag. Bei der statistischen Untersuchung bezüglich der Abhängigkeit von  $[\%Ki67^+]$  vom Trächtigkeitsstadium wurde die Signifikanzgrenze jedoch nicht erreicht.

Im *Trophoblasten* war  $[\%Ki67^+]$  vom 150. bis 270. Graviditätstag sehr konstant und schwankte lediglich zwischen  $23.3 \pm 3.4\%$  am 240. Graviditätstag und  $25.4 \pm 4.7\%$  am 220. Graviditätstag.

In keiner der vier erfaßten Zellkategorien konnte ein signifikanter Einfluß der untersuchten Zonen nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholung im Faktor Zellpopulation (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 5.3.1.3.1.) zur Prüfung auf Unterschiede zwischen den vier untersuchten Zellkategorien (KS= Karunkelstroma; KE= Karunkelepithel; FS (fetales Stroma)= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblastzellen).

	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
<b>a) unter Einbeziehung aller vier Zellkategorien</b>	
Versuchsgruppe	0.1602
Zellkategorie	0.0000
Versuchsgruppe x Zellkategorie	0.1861
<b>b) paarweiser Vergleich KS-FS</b>	
Versuchsgruppe	0.0309
Zellkategorie	0.0000
Versuchsgruppe x Zellkategorie	0.0083
<b>c) paarweiser Vergleich KE-T</b>	
Versuchsgruppe	0.8709
Zellkategorie	0.0000
Versuchsgruppe x Zellkategorie	0.3843

Tabelle 2: Statistische Auswertungen zum prozentualen Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Plazentoms (Zonen I-III) und von der Versuchsgruppe (Tag 150, 220, 240, 270 der Trächtigkeit; eine quantitative Auswertung der Geburtsgruppe wurde nur für das Karunkelstroma vorgenommen). Die statistische Prüfung erfolgte separat für jede der vier untersuchten Zellkategorien (KS= Karunkelstroma; KE= Karunkelepithel; FS (fetales Stroma)= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblastzellen) mittels vierfaktorieller Varianzanalysen (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 5.3.1.3.1.).

Einflußgröße/Wechselwirkung	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)			
	KS	KE	FS	T
Versuchsgruppe	0.0155	0.3786	0.0046	0.9534
Zone	0.5723	0.4589	0.8620	0.1066
Tier	0.0000	0.0004	0.0081	0.0001
Versuchsgruppe x Zone	0.0222	0.9348	0.8045	0.0967
Tier x Zone	0.7818	0.0811	0.1689	0.2683

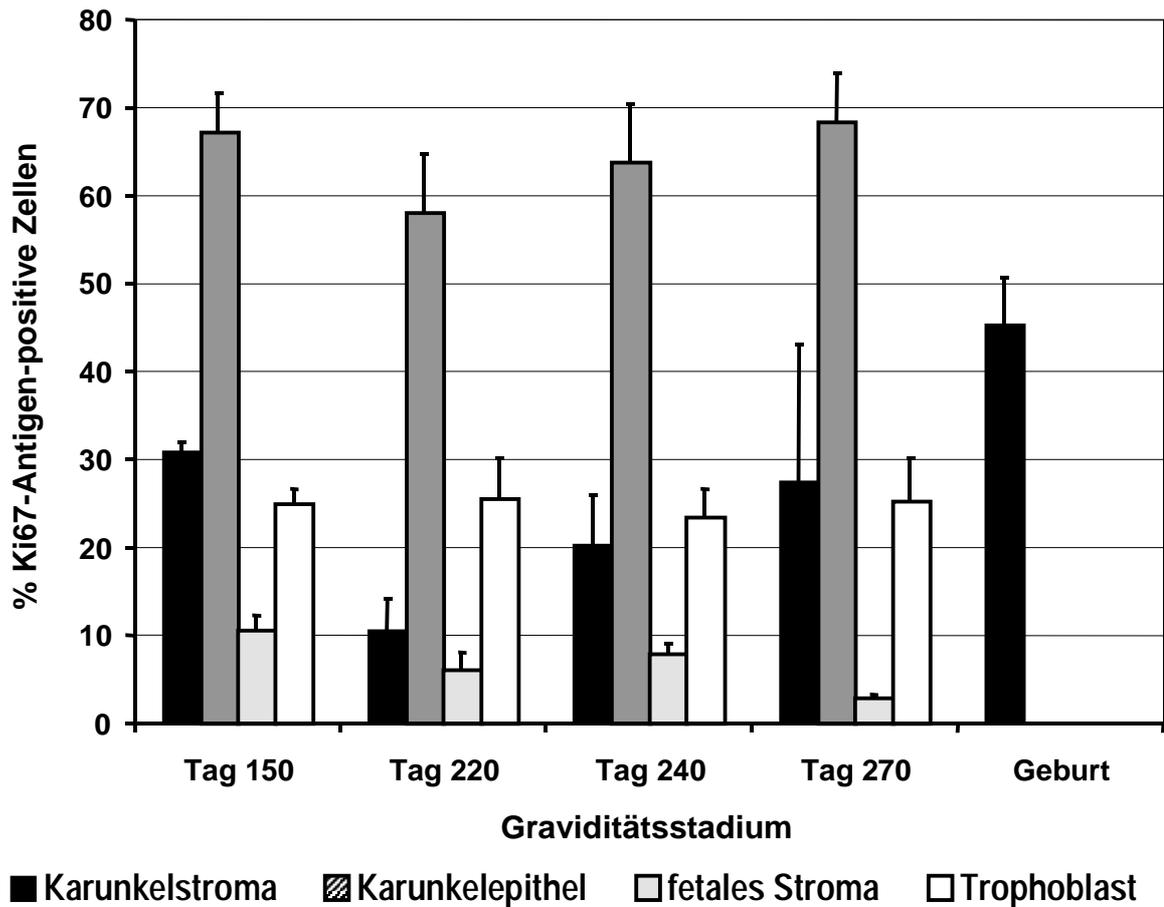


Abb. 8: Prozentsatz immunhistologisch Ki67-Antigen-positiver Zellen im Karunkelstroma, Karunkelepithel, fetalen Stroma (= Stroma der Chorionzotten) und im Trophoblasten am 150., 220., 240. bzw. 270. Tag der Gravidität. Für die Geburtstiere wurde aufgrund der durch die geburtsbedingten Veränderungen teilweise unsicheren Zellquantifizierung eine Beurteilung nur für das Karunkelstroma vorgenommen. Dargestellt sind die aus drei Tieren pro Versuchsgruppe errechneten arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Tabelle 3: Ergebnisse der Kovarianzanalysen auf das Vorliegen eines linearen Trends des prozentualen Anteils Ki67-Antigen-positiver Zellen bezüglich der Kontrollvariablen *Trächtigkeitsdauer* (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 5.3.1.3.1.). Die statistische Prüfung erfolgte separat für jede der vier untersuchten Zellkategorien (KS= Karunkelstroma; KE= Karunkelepithel; FS (fetales Stroma)= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblastzellen).

	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)			
	KS	KE	FS	T
Zone (Einflußgröße)	0.6970	0.3785	0.8415	0.1669
Tächtigkeitsdauer	0.2690	0.9727	0.0024	0.9207

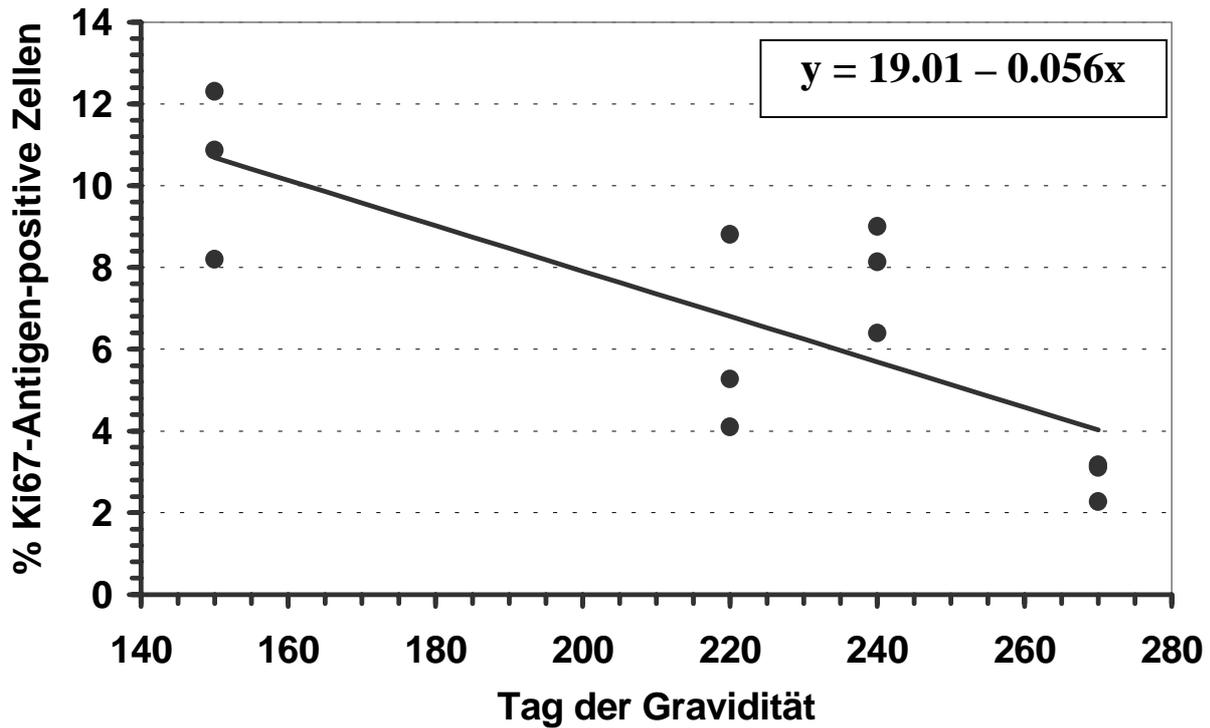


Abbildung 9: Prozentsatz Ki67-Antigen-positiver Zellen im Stroma der Chorionzotten – Ergebnis der linearen Regression

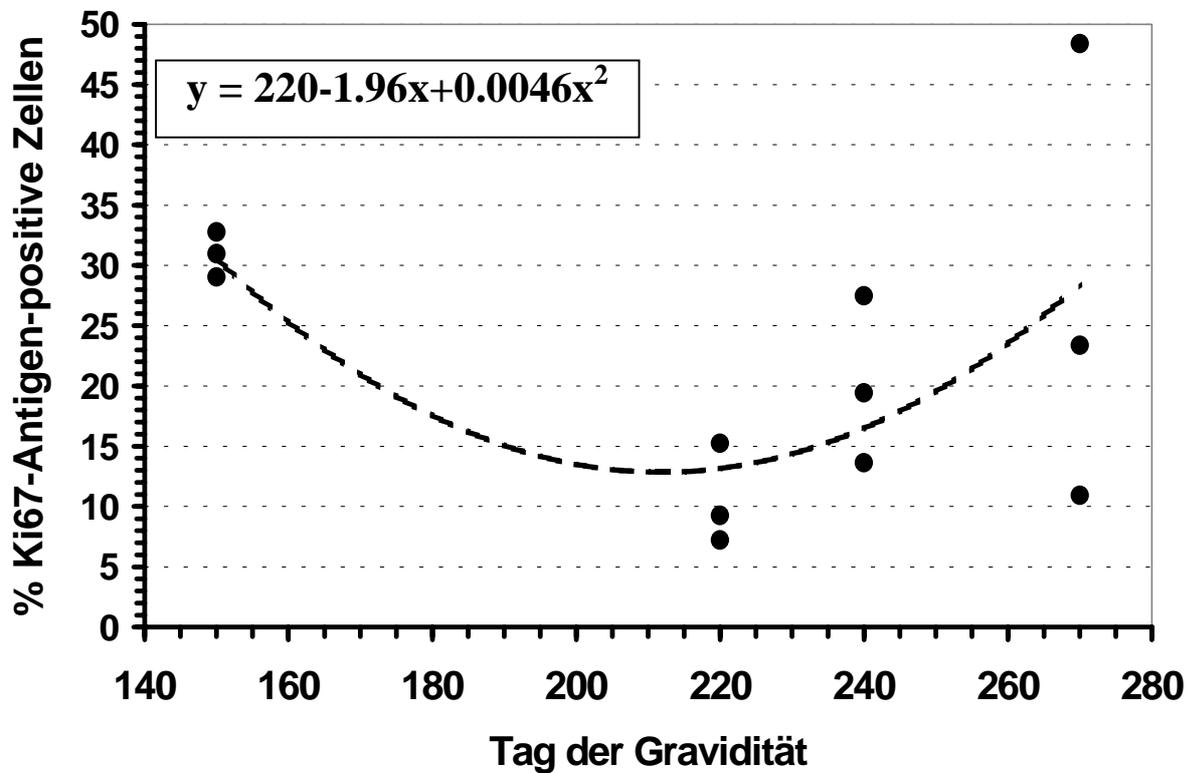


Abbildung 10: Prozentsatz Ki67-Antigen-positiver Zellen im Karunkelstroma – Ergebnis der polynomialen Regression

### 5.3.2.3. Variabilität der Ki67-Antigen-Expression zwischen verschiedenen Plazentomen einer 270 Tage trächtigen Kuh (horizontale Studie).

Bei der Untersuchung der Variabilität der Ki67-Antigen-Expression zwischen fünf Plazentomen unterschiedlicher Größe und Lokalisation einer 270 Tage trächtigen Kuh (s. Tabelle 4; zu den Ergebnissen der statistischen Auswertungen s. Tabellen 5 und 6) ergaben sich signifikant positive Streuungen der Meßgröße zwischen den Plazentomen nur für das Karunkelstroma ( $p < 0.05$ ) und im Trophoblasten ( $p < 0.01$ ). Während im Karunkelstroma keinerlei Zusammenhang zwischen der Größe des Plazentoms und [%Ki67<sup>+</sup>] erkennbar war ( $p = 0.88$ ), wurde im Trophoblast die Signifikanzgrenze nur knapp verfehlt ( $p = 0.07$ ). Im Trophoblast war weiterhin als einziger der vier untersuchten Zellkategorien ein signifikanter Einfluß der Zone nachweisbar ( $p < 0.05$ ), wobei [%Ki67<sup>+</sup>] in Zone I mit  $29.1 \pm 3.1\%$  im Durchschnitt höher war als in den Zonen II ( $26.6 \pm 1.8\%$ ) und Zone III ( $25.1 \pm 3.7\%$ ).

Tabelle 4: Prozentualer Anteil Ki67-positiver Zellen im Karunkelstroma (KS), Karunkelepithel (KE), Stroma der Chorionzotten (fetales Stroma=FS) und Trophoblast (T) in fünf Plazentomen verschiedener Größe und Lokalisation einer 270 Tage trächtigen Kuh (Angaben als  $\bar{x} \pm \sigma$  aus drei analysierten Schnitten pro Plazentom).

Plazentom/Lokalisation	$\varnothing_{\max}^*$	% Ki67-positive Zellen			
		KS	KE	FS	T
1) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	18 cm	23.4±1.3	76.4±5.0	2.8±0.3	32.0±2.8
2) Spitze des fruchttragenden Horns	12 cm	27.4±2.0	78.7±0.4	3.2±1.1	25.9±1.6
3) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	10 cm	21.3±2.0	74.5±2.0	2.5±0.1	26.4±1.1
4) Spitze des nicht-fruchttragenden Horns	4 cm	27.1±3.3	77.5±1.6	3.8±1.2	26.1±0.7
5) Spitze des nicht-fruchttragenden Horns	4 cm	18.4±2.3	75.9±4.1	3.4±0.6	24.4±1.5

\*  $\varnothing_{\max}$  = maximaler Plazentomdurchmesser

Tabelle 5: Statistische Auswertungen zum prozentualen Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen in fünf verschiedenen Plazentomen unterschiedlicher Größe und Lokalisation einer 270 Tage graviden Kuh. Die statistische Prüfung erfolgte separat für jede der vier untersuchten Zellkategorien (KS= Karunkelstroma; KE= Karunkelepithel; FS (fetales Stroma)= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblastzellen) mittels dreifaktorieller Varianzanalysen (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 5.3.1.3.2.).

Einflußgröße/Wechselwirkung	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)			
	KS	KE	FS	T
Plazentom	0.0111	0.7231	0.5100	0.0064
Zone	0.4124	0.2889	0.0726	0.0340
Plazentom x Zone	0.1032	0.1051	0.4416	0.5157

Tabelle 6: Ergebnisse der Kovarianzanalysen auf das Vorliegen eines linearen Trends des prozentualen Anteils Ki67-Antigen-positiver Zellen bezüglich der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser* (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 5.3.1.3.2.). Die statistische Prüfung erfolgte separat für jede der vier untersuchten Zellkategorien (KS= Karunkelstroma; KE= Karunkelepithel; FS (fetales Stroma)= Stroma der Chorionzotten; T= Trophoblastzellen).

	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)			
	KS	KE	FS	T
Zone (Einflußgröße)	0.4124	0.2889	0.0726	0.0340
max. Plazentomdurchmesser	0.8822	0.9675	0.2070	0.0673

### 5.3.3. Diskussion

Als auffälligste Befunde dieser Untersuchungen können die teilweise erheblichen Unterschiede hinsichtlich des Anteils Ki67-Antigen-positiver Zellen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen der Plazentome sowie deren unterschiedliche Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium gewertet werden. Aufgrund der engen Korrelation zwischen der Ki67-Expression und der Zellproliferation (s. Abschnitt 5.2.2.) kann daraus geschlossen werden, daß sich die untersuchten Zellpopulationen in ihrem Proliferations- bzw. Wachstumsverhalten erheblich voneinander unterscheiden. Die deutlichste Abhängigkeit der Ki67-Antigenexpression vom Graviditätsstadium ergibt sich für das Stroma der Chorionzotten. Diese Zellpopulation weist den mit Abstand niedrigsten Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen auf und zeigt eine signifikante Abnahme der Proliferation zwischen dem 150. Trächtigkeitstag und der Geburt. Hierbei ergibt sich eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FERRELL (1990), nach denen bei Brahman- und Charolais-Rindern bzw. deren Kreuzungen das Gesamtgewicht der Koryledonen zwischen dem 232. und 271. Graviditätstag konstant bleibt oder sogar leicht abnimmt.

Im Karunkelstroma fällt der Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen vom 150. zum 220. Graviditätstag zunächst deutlich ab und steigt dann zum Ende der Gravidität wieder an, wobei die höchsten Werte von den Geburtstieren erreicht werden. Der initiale Abfall korreliert offensichtlich mit dem nachlassenden Wachstum der Plazentome in den letzten Graviditätsmonaten (BJÖRCKMAN, 1954). Auffällig ist der hohe Anteil Ki67-Antigen-positiver Karunkelstromazellen am 270. Graviditätstag sowie v.a. unter der Geburt, also in einer Phase, in der das plazentare Wachstum als weitgehend abgeschlossen betrachtet werden kann. Möglicherweise steht hier die Proliferation im Karunkelstroma im Zusammenhang mit den Umstrukturierungen in den Plazentomen, welche in der Spätphase der Gravidität des Rindes stattfinden (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989). In deren Verlauf kommt es kurz vor der Geburt u.a. zu einer deutlichen Verbreiterung des Stromas der Karunkelsepten, die bereits seit vielen Jahren beschrieben und als „Kollagenisierung“ bezeichnet wurde (Übersicht bei SCHOON, 1989). Diese konnte bei den eigenen Versuchstieren neben den Tieren der Geburtsgruppe (s. Abbildungen 7A und 7C) teilweise bereits deutlich bei den 270 Tage graviden Kühen beobachtet werden (s. Abbildungen 5A-5C). Nach SCHOON (1989) basiert diese präpartale Verbreiterung des Karunkelstromas auf einer Ödematisierung bzw. auf einer strukturellen Modifikation der Kollagenfasertextur. Die eigenen Befunde legen jedoch nahe, daß den präpartalen Veränderungen im Karunkelstroma zu einem erheblichen Teil eine gesteigerte Proliferation der Karunkelstromazellen zugrunde liegt.

Stellt man den zeitlichen Verlauf der proliferativen Aktivität im Karunkelstroma zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt den Estron-Gewebekonzentrationen in den Plazentomen im entsprechenden Zeitraum (s. Kapitel III sowie TSUMAGARI et al., 1993) gegenüber, so fällt eine nahezu identische Gestalt der Kurven auf. Da die Karunkelstromazellen im oben genannten Zeitraum Östrogenrezeptoren exprimieren (s. Kapitel IV, Abschnitt 4.4.2.), liegt

die Vermutung nahe, daß plazentare Östrogene in die Stimulation der Proliferation der Karunkelstromazellen involviert sind. Da der temporäre Einbruch in der Proliferation des Karunkelstromas zeitlich auch in etwa mit dem steilen Anstieg der plazentaren Progesteronproduktion zwischen dem ca. 180.-220. Trächtigkeitstag (s. Kapitel III sowie TSUMAGARI et al., 1994) korreliert und Progesteronrezeptoren in dieser Zellpopulation immunhistologisch ebenfalls in einem erheblichen Teil der Zellen nachweisbar sind (s. Kapitel IV, Abschnitt 4.4.1.), drängt sich die Frage nach einer Rolle des plazentaren Progesterons in dieser offensichtlichen temporären Verzögerung der Proliferation im Karunkelstroma auf. Interessanterweise wird beim Schaf, bei dem die plazentare Progesteronproduktion bereits nach etwa einem Drittel der Graviditätsdauer massiv einsetzt und ab dann allein zur Aufrechterhaltung der Gravidität in der Lage ist, die maximale Größe der Plazentome bereits etwa in der Mitte der Gravidität erreicht und nimmt zur Geburt hin sogar deutlich ab (KAULFUSS et al., 1998). Demnach könnte plazentares Progesteron das durch die plazentaren Östrogene permanent stimulierte Wachstum des Karunkelstromas kontrollieren.

Ein weiterer auffälliger Befund ist die überaus starke Proliferation des Karunkelepithels, dessen Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen die in den anderen untersuchten Zellpopulationen gemessenen Werte um ein Mehrfaches übersteigt. Das Ausmaß der Zellproliferation im Karunkelepithel wird auch durch den Vergleich mit der positiven Kontrolle, dem Dünndarmepithel (s. Abbildung 2) deutlich, welches zu den typischen Mausergeweben gehört. Unter der Annahme, daß sich die Zellzyklen der vier erfaßten Zellkategorien hinsichtlich ihrer Dauer nicht wesentlich unterscheiden, kann gefolgert werden, daß die Zellproliferation im Karunkelepithel erheblich höher ist als in den anderen Zelltypen der Plazentome. Diese Annahme wird durch das häufige Auftreten von Mitosefiguren im Karunkelepithel gestützt (BJÖRKMAN, 1969; eigene Beobachtungen). Das Ausmaß der Zellproliferation im Karunkelepithel läßt vermuten, daß dieses deutlich über den aus Wachstum und Gewebeumbildungen resultierenden Bedarf hinaus geht und ein hoher Zellumsatz in dieser Zellkategorie besteht. Dies wurde bereits von BJÖRKMAN (1969) aufgrund lichtmikroskopischer Beobachtungen postuliert. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß in einem Teil der fetomaternalen Hybridzellen der Kern maternalen Ursprungs deutlich Ki67-Antigen-positiv reagiert (s. Abbildung 6). Dies bedeutet aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Ki67-Antigens, daß zumindest ein Teil der Karunkelepithelzellen bereits unmittelbar nach deren Bildung mit Trophoblastriesenzellen fusioniert und damit unmittelbar der Degeneration anheim fällt. Darüber hinaus konnte relativ häufig beobachtet werden, daß Ki67-Antigen-positive degenerierende Zellen bzw. Zelltrümmer ohne erkennbare Einwirkung von Trophoblastriesenzellen von der Oberfläche des Karunkelepithels abschilferten und vom Trophoblasten aufgenommen wurden. Auch dies spricht für einen hohen Umsatz in dieser Zellpopulation. Die Bedeutung der hohen Zellproliferation im Karunkelepithel ist derzeit unklar. Eine mögliche Funktion stellt die Kompensation der Zellverluste dar, die sich durch die destruktive Aktivität der schwach invasiven Trophoblastriesenzellen (WOODING und WATHES, 1980; WOODING, 1992; KLISCH et al., 1999a) er-

gibt. Möglicherweise stellen abgeschilferte Karunkelepithelzellen bzw. degenerierende fetomaternalen Hybridzellen aus Karunkelepithelzellen und Trophoblastriesenzellen einen erheblichen Faktor in der Versorgung des Trophoblasten mit Nährstoffen dar (s. Kapitel VI). Entsprechende Vermutungen wurden bereits von BJÖRKMAN (1969) geäußert. Möglicherweise werden darüber hinaus über die Aufnahme zerfallender Karunkelepithelzellen lokale, das Wachstum und die Funktionen des Trophoblasten regulierende Mediatoren übertragen. Da bei den immunhistologischen Untersuchungen auf das Vorkommen von Östrogenrezeptoren zu allen Graviditätsstadien Signale in einem Großteil der Karunkelepithelzellen nachweisbar waren (s. Kapitel IV, Abschnitt 4.4.2.), ist zu vermuten, daß plazentare Östrogene auch an der Stimulation der Proliferation dieser Zellen - vermutlich im Zusammenwirken mit weiteren lokalen Faktoren - beteiligt sind.

Eine wesentliche, der Geburt vorausgehende Veränderung im histologischen Aufbau der Plazentome stellt das unmittelbar präpartale Verschwinden des Karunkelepithels dar, welches sich bereits ab dem ca. 250. Graviditätstag durch eine fortschreitende Abflachung ankündigt, die mit einer Verminderung der Zellzahl pro Fläche einhergeht (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989). Die Charakterisierung der proliferativen Aktivität im letzten Graviditätsmonat läßt jedoch – wie zunächst vermutet werden könnte – kein Nachlassen der Zellproliferation in diesem Zeitraum erkennen. Es besteht im Gegenteil mit herannahender Geburt eher die Tendenz einer gesteigerten proliferativen Aktivität. Da im entsprechenden Zeitraum auch keine erhebliche Vergrößerung der fetomaternalen Kontaktfläche nachgewiesen werden kann, ist die progressive Abflachung und letztendlich das fast vollständige Verschwinden des Karunkelepithels am ehesten durch eine Steigerung des Zellumsatzes zu erklären. Der hohe Anteil Ki67-Antigen-positiver Karunkelepithelzellen und das häufige Auftreten von Mitosefiguren in der Spätgravidität neben zahlreichen Ki67-Antigen-positiven degenerierenden Zellen bzw. Zelltrümmern erwecken insgesamt den Eindruck einer Hyperstimulation der Proliferation im Karunkelepithel, welche mit einer beschleunigten Degeneration der gebildeten Zellen einhergeht. Möglicherweise steht auch die Beobachtung der Bildung Ki67-Antigen-positiver, degenerierender Karunkelepithelzell-Synzytien hiermit in Verbindung. "Large multinucleate cryptal plasmodia" in oberflächlichen Krypten von Plazentomen während der Spätgravidität wurden bereits von BJÖRCKMAN (1954) beschrieben.

Ähnlich wie in der Karunkel übersteigt auch in den Chorionzotten die Proliferation im epithelialen Anteil die Proliferation im zugehörigen Stroma erheblich. Dies deutet ebenfalls auf einen hohen Zellumsatz im Trophoblasten hin, welcher jedoch deutlich niedriger ist als der des Karunkelepithels. Dies wurde ebenfalls bereits von BJÖRKMAN (1969) basierend auf histomorphologischen Untersuchungen erkannt. Die proliferative Aktivität des Trophoblasten spiegelt offensichtlich nicht nur dessen Wachstum, sondern zu einem erheblichen Teil auch den permanenten Ersatz wandernder und zugrunde gehender Trophoblastriesenzellen (WOODING und WATHES, 1980) wider. Aufgrund der methodebedingt eingeschränkten Differenzierungsmöglichkeiten war es leider nicht möglich, das Ki67-Antigen-

Expressionsmuster unterschiedlicher Trophoblastzellpopulationen bzw. unterschiedlicher Stadien in der Bildung von Trophoblastriesenzellen zu erfassen. Unklar ist, ob die immunhistologische Darstellung des Ki67-Antigens im Trophoblasten ausschließlich die Zellproliferation widerspiegelt oder ob die Polyploidisierung des Genoms in den Trophoblastriesenzellen (KLISCH et al., 1999a; 1999b) mit erfaßt wird. Untersuchungen zur Ki67-Expression in Verbindung mit einer proliferationsunabhängigen Genom-Multiplikation fanden sich in der zur Verfügung stehenden Literatur nicht. Auffallend ist der sehr konstante Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen im Trophoblasten. Dies paßt zur Beobachtung, daß der Anteil der Trophoblastriesenzellen an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen mit Ausnahme des unmittelbaren präpartalen Zeitraums über die gesamte Trächtigkeit sehr konstant ist (s. Kapitel I, Abschnitt 1.1.1.; WOODING, 1992), was für eine konstante Aktivität des Zellproliferationsystems spricht, welches die degenerierenden Trophoblastriesenzellen „nachliefert“. Diese Übereinstimmung zwischen dem konstanten Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen und der morphologisch konstanten Zusammensetzung des Trophoblasten spricht für die Wertigkeit der in den eigenen Untersuchungen angewandten quantitativen Methode und somit dafür, daß den in anderen Zellkategorien festgestellten Veränderungen in Abhängigkeit von der Trächtigkeitsdauer tatsächlich biologisch relevante Vorgänge zugrunde liegen. Auffällig ist die Änderung des Ki67-Antigen-Expressionsmusters im Trophoblasten unter der Geburt. Im Gegensatz zu graviden Tieren wurden bei Rindern unter der Geburt positive Reaktionen ausschließlich in einkernigen Zellen gefunden. Fast alle Ki67-Antigen-positiven Zellen, die unter der Geburt eindeutig dem Trophoblasten zugeordnet werden konnten, wiesen eine charakteristische Kernstruktur auf (s. Abbildung 7B), welche durch eine grobschollige Kondensation des Chromatins und ein blasses Nukleoplasma charakterisiert war. Dies läßt vermuten, daß die proliferierenden Trophoblastzellen unmittelbar vor der Geburt in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus arretiert werden. Das präpartale Verschwinden der Trophoblastriesenzellen bzw. deren Vitalitätsverlust würde sich demnach zumindest teilweise aus einer Überalterung der zum Zeitpunkt des Proliferationsstopps vorhandenen Trophoblastriesenzellen erklären.

Obwohl das Wachstum der Plazentome in den letzten beiden Monaten der Gravidität fast ausschließlich durch das Wachstum des maternalen Anteils bestimmt ist (FERRELL, 1990), ergab sich bei einem am 270. Graviditätstag untersuchten Rind keine Korrelation zwischen dem maximalen Plazentomdurchmesser und dem Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen im Karunkelepithel bzw. Karunkelstroma. Hinsichtlich des Karunkelepithels kann angenommen werden, daß Wachstumsvorgänge durch die starke wachstumsunabhängige Proliferation überlagert werden. Das Fehlen einer derartigen Korrelation im Karunkelstroma deutet darauf hin, daß die proliferative Aktivität in großen und kleinen Plazentomen zum Zeitpunkt der Untersuchung im Probenmaterial annähernd gleich war. Möglicherweise ergeben sich die zum Teil erheblichen Größenunterschiede der Plazentome daher, daß die kleineren Plazentome, welche dem nichtfruchttragenden Horn entnommen wurden, ihr Wachstum vergleichsweise später aufgenommen haben.

Zusammenfassend erbrachte die quantitative immunhistologische Darstellung der Ki67-Antigen-Expression neue Erkenntnisse zu Wachstum und Differenzierung der Rinderplazentome, die im Einklang mit Ergebnissen früherer makroskopischer Untersuchungen zum placentaren Wachstum beim Rind (FERREL et al., 1990; REYNOLDS et al., 1990) sowie mit lichtmikroskopischen Beobachtungen zur mitotischen Aktivität in den Rinderplazentomen (BJÖRKMAN, 1954; 1969) stehen. In Verbindung mit den in den Kapiteln III und IV erhaltenen Daten zur lokalen Verfügbarkeit placentarer Steroide und zur Expression von Steroidrezeptoren weisen die in diesem Kapitel erhaltenen Ergebnisse auf eine Rolle der placentaren Steroide als lokale Faktoren mit Bedeutung für die Regulation von Wachstum und Differenzierung der Plazentome hin.

### 5.3.4. Literatur

- BJÖRKMAN NH (1954). Morphological and histochemical studies on the bovine placentome. *Acta Anat.* 22 (Suppl.), 1-99
- BJÖRKMAN NH (1969). Light and electron microscopic studies on cellular alteration in the bovine placentome. *Anat. Rec.* 163, 17-30
- BRUNO S, DARZYNKIEWICZ Z (1992). Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell. Prolif.* 25, 31-40
- COATES PJ, HALES SA, HALL PA (1996). The association between cell proliferation and apoptosis: studies using the cell cycle associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J. Pathol.* 178, 71-77
- DÄMMRICH K (1990). Wachstum und Anpassung. in: *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*, 8. Auflage, H.Stünzi, E. Weiss (Hrsg.) Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 274-290
- DIXON WJ (1993). *BMDP statistical software manual*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 1993
- FERRELL CL (1991). Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J. Anim. Sci.* 69, 1945-1953
- FUNK JO, KIND P (1997). Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Der Hautarzt* 48, 157-165
- GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER H-H, SCHWAB U, STEIN H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133, 1710-1715
- GERDES J, LI L, SCHLUETER C, DUCHROW M, WOHLBERG C, GERLACH C, STAHRER I, KLOTH S, BRANDT E, FLAD H-D (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* 138, 867-873
- GERLACH C, KUBBUTAT M, SCHWAB U, KEY G, FLAD HD, GERDES J (1998). Proliferation-associated Ki-67 protein is a target for autoantibodies in the human autoimmune disease systemic lupus erythematosus. *Lab. Invest.* 78, 129-130
- HEIDEBRECHT HJ, BUCK F, HAAS K, WACKER HH, PARWARESCH R (1996). Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the "Ki-67" proteins. *Cell. Prolif.* 29, 413-425
- IATROPOULOS MJ, WILLIAMS GM (1996). Proliferation markers. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48, 175-181
- KAULFUSS K-H, UHLICH K, GILLE U (1998). Ultrasonographische Untersuchungen zum Placentomwachstum beim trächtigen Schaf. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 105, 162-167
- KLISCH K, PFARRER C, SCHULER G, HOFFMANN B, LEISER R (1999a). Tripolar acytokinetic mitosis and formation of fetomaternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multicellular cells. *Anat. Embryol.* 200, 229-237
- KLISCH K, PFARRER C, SCHULER G, HOFFMANN B, LEISER R (1999b). DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta* 20, 451-458
- KUWASHIMA Y, KOBAYASHI Y, KAWARAI A, KUROSUMI M, TANUMA J, SHIROMIZU K, KISHI K (1997). Occurrence of apoptotic DNA fragmentation in quiescent and proliferating cells in human endometrial adenocarcinoma tissues and the influence of apoptosis-suppressing effects of bcl-2 products. *Anticancer Res.* 17, 3737-3741
- McINTOSH JR, KOONGE MP (1989). Mitosis. *Science* 246, 622-628

- MIYACHI K, FRITZLER MJ, TAN EM (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121, 2228-2234
- MORGAN DO (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134
- NASMYTH K (1996). Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274, 1643-1645
- PARDEE AB (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608
- REYNOLDS LP, MILLAWAY DS, KIRSCH JD, INFELD JE, REDMER DA (1990). Growth and in-vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. *J. Reprod. Fert.* 89, 213-222
- SCHLUETER C, DUCHROW M, WOHLBERG C, BECKER MH, KEY G, FLAD HD, GERDES J (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 123, 513-522
- SCHOON H-A (1989). Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität. *Vet. med. Habil.-Schrift, Hannover*
- STARBORG M, GELL K, BRUNDELL E, HOOG C (1996). The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 109, 143-153
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKESHI M (1993). Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fert.* 98, 631-636
- TSUMAGARI S, KAMATA J, TAKAGI K, TANEMURA K, YOSAI A, TAKEISHI M (1994). 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J. Reprod. Fert.* 102, 35-39
- WERSTO RP, HERZ F, GALLAGHER RE, KOSS LG (1988). Cell cycle-dependent reactivity with the monoclonal antibody Ki-67 during myeloid cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 179, 79-88
- WOICKE J, SCHOON H-A, HEUWIESER W, SCHULZ L-C, GRUNERT E (1986). Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. *J. Vet. Med. A* 33, 660-667
- WOODING FBP (1992). Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13, 101-113
- WOODING FBP, WATHES DC (1980). Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fert.* 59, 425-430
- YU CC, WOODS AL, LEVISON DA (1992). The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem. J.* 24, 121-131



**KAPITEL VI**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DER APOPTOSE  
FÜR MORPHOGENESE UND FUNKTION  
DER PLAZENTOME DES RINDES**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>6.1.</b>	<b>Einführung und Untersuchungsziele.....</b>	<b>251</b>
<b>6.2.</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>252</b>
<b>6.2.1.</b>	<b>Zelltod.....</b>	<b>252</b>
<b>6.2.2.</b>	<b>Apoptose.....</b>	<b>254</b>
<b>6.2.2.1.</b>	<b>Ablauf .....</b>	<b>254</b>
<b>6.2.2.2.</b>	<b>Biologische Bedeutungen der Apoptose .....</b>	<b>258</b>
<b>6.3.</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>262</b>
<b>6.3.1.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>262</b>
<b>6.3.1.1.</b>	<b>Probenmaterial .....</b>	<b>262</b>
<b>6.3.1.2.</b>	<b>In Situ-End-Labeling (ISEL) .....</b>	<b>262</b>
<b>6.3.1.3.</b>	<b>Auswertung der ISEL-gefärbten Präparate zur quantitativen Erfassung der Apoptose in den Plazentomen .....</b>	<b>263</b>
<b>6.3.1.4.</b>	<b>Versuchsaufbau und statistische Auswertung.....</b>	<b>264</b>
<b>6.3.1.4.1.</b>	<b>Quantitative Untersuchung zum Vorkommen der Apoptose in den Plazentomen des Rindes zwischen dem 150. Trächtigkeitstag und der Geburt (longitudinale Studie) .....</b>	<b>264</b>
<b>6.3.1.4.2.</b>	<b>Untersuchung zur Variabilität des quantitativen Apoptose-Nachweises zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums (horizontale Studie).....</b>	<b>264</b>
<b>6.3.1.5.</b>	<b>Puffer, Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>265</b>
<b>6.3.2.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>267</b>
<b>6.3.2.1.</b>	<b>Beobachtungen in ISEL-gefärbten Präparaten.....</b>	<b>267</b>
<b>6.3.2.2.</b>	<b>Ergebnisse der quantitativen Untersuchung zum Vorkommen der Apoptose in den Plazentomen des Rindes zwischen dem 150. Trächtigkeitstag und der Geburt (longitudinale Studie) .....</b>	<b>272</b>
<b>6.3.2.3.</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchung zur Variabilität des quantitativen Apoptose-Nachweises zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums (horizontale Studie).....</b>	<b>273</b>
<b>6.3.3.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>275</b>
<b>6.3.3.1.</b>	<b>Diskussion der Methodik.....</b>	<b>275</b>
<b>6.3.3.2.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>276</b>
<b>6.3.4.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>280</b>

### 6.1. Einführung und Untersuchungsziele

Begleitend zur Charakterisierung der plazentaren Steroidsynthese in den Kapiteln I-III und den immunhistologischen Untersuchungen zur Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression in Kapitel IV war die Zellproliferation in den Plazentomen Gegenstand der Untersuchungen des vorangegangenen Kapitels, um Informationen über eventuelle funktionelle Beziehungen zwischen der plazentaren Steroidsynthese und der Zelldynamik in den Plazentomen zu erhalten. Nachdem in Kapitel V die proliferative Aktivität verschiedener Zellkategorien des Plazentoms beschrieben wurde, soll in diesem Abschnitt die zweite Komponente der Zelldynamik, der Zelluntergang betrachtet werden. Hierbei soll in erster Linie der physiologische oder programmierte Zelltod, die Apoptose, Beachtung finden. Das Interesse für die Apoptose in den Plazentomen wurde insbesondere durch drei seit längerem bekannte, mit Zelluntergang assoziierte Phänomene geweckt:

1. der als Degeneration beschriebene Untergang der invasiven Trophoblastriesenzellen (BNC = binuclear cells; TGC = trophoblast giant cells) bzw. der aus invasiven Trophoblastriesenzellen und Uterusepithelzellen gebildeten Hybridzellen (WOODING und WATHES, 1980; WOODING et al., 1992; KLISCH et al., 1999a).
2. das mehr oder weniger vollständige Verschwinden der Karunkelepithelzellen in der Spätgravidität und unter der Geburt (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989).
3. die drastische Abnahme der Zahl der Trophoblastriesenzellen sowie deren Vitalitätsverlust unter der Geburt (GROSS et al., 1991).

In der zur Verfügung stehenden Literatur fanden sich bezüglich der Plazenta des Rindes keine Untersuchungen zum Vorkommen der möglicherweise in diese Vorgänge involvierten Apoptose, welche für die Differenzierung bzw. die präpartalen Reifungsvorgänge der Plazentome von erheblicher Bedeutung sein könnte. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Beobachtung zahlreicher degenerativer Prozesse mit Apoptose-charakteristischer Morphologie bei der Auswertung immunhistologischer Präparate im Rahmen der in den Kapiteln IV und V durchgeführten Untersuchungen. Ziel der in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen war es daher einerseits, diese lichtmikroskopischen Beobachtungen durch eine biochemische Methode – das In situ-End-Labeling (häufig auch als TUNEL = Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling bezeichnet; GAVRIELI et al., 1992) - abzusichern, andererseits wurde eine Quantifizierung der Apoptosehäufigkeit über den Verlauf des Beobachtungszeitraumes zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt angestrebt.

## 6.2. Literaturübersicht

### 6.2.1. Zelltod

Der Tod einer Zelle kann grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen: im ersten Fall ist er die Folge einer Noxe, welche die Zelle unphysiologischen, nichtkompensierbaren Bedingungen wie z.B. Hypo- oder Hyperthermie, mechanischen Belastungen, Hypoxie usw. aussetzt. Infolgedessen sind die betroffenen Zellen nicht mehr in der Lage, die Homöostase aufrecht zu erhalten. Durch das unkontrollierte Eindringen extrazellulärer Ionen und von Wasser kommt es zum Anschwellen von Zellorganellen sowie der Zelle insgesamt und letztendlich zu deren meist raschen Zerstörung. Diese Form des Zelltodes wird als Nekrose<sup>1</sup> bezeichnet. Daneben existiert der programmierte Zelltod (programmed cell death – PCD), welcher durch bestimmte Signale induziert werden kann und nach einem intrinsischen zellulären “Selbstmordprogramm” abläuft. Eine Erscheinungsform des programmierten Zelltodes, welche durch eine stereotype Sequenz morphologischer Veränderungen gekennzeichnet ist und die in ihrer Endphase mit einer Fragmentierung der DNS einhergeht, wird als Apoptose bezeichnet. Dieser Begriff leitet sich von dem altgriechischen Wort ab, welches das Herabfallen welcher Blätter im Herbst beschreibt. Vermutlich ist die Apoptose der einzige Weg in den physiologischen Zelltod und somit die häufigste Todesart eukaryotischer Zellen (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; TABIBZADEH, 1995; VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997). Teilweise werden die Begriffe Apoptose und PCD synonym verwendet. Apoptose und Nekrose unterscheiden sich sowohl morphologisch (s. Tabelle. 1) als auch hinsichtlich der zugrunde liegenden biochemischen Vorgänge (s. Tabelle 2).

---

<sup>1</sup> Die Nomenklatur hinsichtlich der Bezeichnung des unphysiologischen, nicht-apoptotischen Zelltodes ist in der Literatur uneinheitlich. Einige Autoren bezeichnen mit Nekrose sekundäre postmortale Veränderungen unabhängig von der Art des aufgetretenen Zelltodes. Eine häufige Form des unphysiologischen Zelltodes ist die Onkose (abgeleitet vom altgriechischen Wort für Schwellung), welche v.a. bei Infarkten beobachtet wird (MAJNO und JORIS, 1995; TRUMP et al., 1997). MAJNO und JORIS (1995) schlagen „unfallmäßiger Zelltod (accidental cell death)“ als geeignete Bezeichnung für den nicht-apoptotischen Zelltod vor.

Tabelle 1: Morphologische Charakteristika von Apoptose bzw. Nekrose (nach KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980, 1984; ARENDS et al., 1990; GERSCHENSOHN und ROTELLO, 1992; TABIBZADEH, 1995; VERMES et al., 1995; WYLLIE, 1997).

Apoptose	Nekrose
Untergang einzelner Zellen	Häufig ganze Zellverbände betroffen
Früher Verlust der Adhäsion an benachbarte Zellen und Basalmembranen; Verlust spezialisierter Strukturen (z.B. Mikrovilli)	Später Verlust der Adhäsion
Schrumpfung der Zelle durch Bildung von Protrusionen und anschließender Abschnürung membranumhüllter Zytoplasmaanteile ("Blebbing")	Anschwellen der Zelle durch Wasseraufnahme; Vakuolenbildung im Zytoplasma
Zellkern: irreguläre Form, Kondensation des Chromatins zu homogenen, dichten Massen und Anlagerung an die Innenseite der Kernmembran; Verlust von Poren der Kernmembran; Kernzerfall	keine oder nur geringfügige Veränderung der Chromatinstruktur (Ausflocken); Anschwellen des Kerns; im Endstadium: Kernschatten; Poren in der Kernmembran bleiben erhalten
Zellorganellen bleiben mit Ausnahme des endoplasmatischen Retikulums intakt	Schwellung und Auflösung von Zellorganellen
Zerfall der Zellen in membranumhüllte Vesikel, welche Kernmaterial, Organellen und Zytoplasma enthalten ("apoptotic bodies")	Zerfall der Zellen ohne Vesikelbildung
Keine entzündliche Reaktion	Deutliche Entzündungsreaktion (beispielsweise induziert durch Nukleosomen oder mitochondriale Proteine)
hinterläßt keine Narben	Narbenbildung

Tabelle 2: Biochemische Charakteristika von Apoptose bzw. Nekrose (nach WYLLIE et al., 1980, 1984; GERSCHENSOHN und ROTELLO, 1992; TABIBZADEH, 1995; STELLER, 1995; VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997).

Apoptose	Nekrose
regulierte Kaskade von Ereignissen; beinhaltet die Aktivierung von Enzymen	Passiver Prozeß; Verlust der Zellhomöostase
mRNS- und Proteinsynthese in bestimmten Zelltypen erforderlich	unabhängig von mRNS- bzw. Proteinsynthese
Prälytische internukleosomale DNS-Fragmentierung	Postlytische Fragmentierung der DNS in Stücke von beliebiger Länge

## 6.2.2. Apoptose

### 6.2.2.1. Ablauf

Das Eintreten des physiologischen Zelltodes resultiert aus Wechselwirkungen zwischen initierenden Stimuli auf der einen Seite und Faktoren, welche die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber der Auslösung der eigentlichen zellulären „Selbstmordmaschinerie“ ("terminal effector events") beeinflussen (WYLLIE, 1997). Demnach kann der Prozeß des physiologischen Zelltodes in vier Phasen unterteilt werden (VAUX und STRASSER, 1996):

- 1) Entstehung eines apoptoseinduzierenden Signals
- 2) Signaldetektion und -transduktion
- 3) Auslösung der zellulären „Selbstmordmaschinerie“
- 4) Postmortem-Phase

**Apoptose-induzierende Signale** können sehr unterschiedlicher Natur sein und müssen nicht immer einem physiologischen Regulationsvorgang entspringen. Neben physiologischen Signalen in Form von Botenstoffen sind auch eine ganze Reihe pathologischer Einflüsse auf Zellen in der Lage, Apoptose zu induzieren (Übersichten bei SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI, 1993; TABIBZADEH, 1995). TABIBZADEH (1995) teilt die apoptoseinduzierenden Signale in physikalische, chemische und biologische Reize ein. Zu den physikalischen Stimuli gehören Neutronen-,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, UV- und Röntgenstrahlen sowie der Hitzeschock. Beispiele für chemische apoptoseinduzierende Reize sind Chemotherapeutika, freie Radikale und Calcium-Ionen. Zu den biologischen Induktoren gehören bestimmte Viren, zytotoxische T-Zellen sowie endokrine und parakrine Faktoren, wobei sowohl das Vorhandensein als auch der Entzug eines Faktors ("survival factor"; s.u.) das Startsignal für die Apoptose sein kann. Die Gründe, warum Zellen auf unphysiologische Stimuli unterhalb der nekroseinduzierenden Dosis mit der Auslösung der Apoptose reagieren, ist unklar. Möglicherweise „verwechseln“ sie einige der frühen, durch unphysiologische Stimuli hervorgerufenen Veränderungen mit Anzeichen einer Virusinfektion und aktivieren deshalb auf einer sehr frühen Ebene das Apoptose-Programm (VAUX und STRASSER, 1996).

Die **Signaldetektion und -transduktion** stellen den am wenigsten verstandenen Bereich der Apoptose dar. Das initiale Signal zur Apoptose durchläuft eine häufig komplexe und mehrstufige, teilweise zellspezifische Kaskade sowohl transkriptioneller als auch nichttranskriptioneller Signale, wobei auf vielen der einzelnen Stufen apoptosefördernde sowie inhibitorische Faktoren wirksam werden können, und mündet schließlich in eine hochkonservierte zelluläre „Selbstmordmaschinerie“ (STELLER, 1995; AMEISEN, 1996; VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997). Demnach können in die Aktivierungsphase der Apoptose Komponenten einer Vielzahl an der Vermittlung intra- bzw. extrazellulärer Signale beteiligter Signaltransduktionswege involviert sein wie beispielsweise Tyrosinkinasen, Steroidrezeptoren, Ceramide, Inositolphosphate und Zytokinrezeptoren. Übersichten über die im Rahmen der Apoptose an der Signaldetektion und -transduktion beteiligten Faktoren finden sich bei

VAUX und STRASSER (1996) und WYLLIE (1997). Im Rahmen der Apoptose werden in vielen Zellen Gene transkribiert und Proteine synthetisiert. Hierbei handelt es sich jedoch eher um regulatorische Moleküle, nicht um die Bestandteile der eigentlichen zellulären „Selbstmordmaschinerie“ (STELLER, 1995). Für die Untersuchung der Regulation und der genetischen Aktivität im Zusammenhang mit der Apoptose diente v.a. der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als Modelltier, da auch im adulten Organismus jede einzelne Zelle direkt beobachtet werden kann. Im Laufe der Entwicklung dieser Spezies werden neben der Entstehung von 1030 Zellen auch 131 Zelluntergänge beobachtet (WYLLIE, 1997). Bei *C. elegans* wurden mittlerweile eine ganze Reihe von Genen identifiziert, deren Produkte apoptosefördernde bzw. –unterdrückende Wirkungen besitzen. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß die Apoptose vom Nematoden bis zum Menschen weitgehend konserviert ist. Im Vergleich zum Nematoden ist der Prozeß bei Säugern jedoch erheblich komplexer mit multiplen Isoformen der einzelnen beteiligten Komponenten (STELLER, 1995; AMEISEN, 1996; VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997).

Die durch unterschiedliche Stimuli aktivierten verschiedenen Signalwege konvergieren zu einem gemeinsamen **Zelltod-Effektormechanismus**, welcher in einer aktivierbaren Form in den meisten, vermutlich sogar in allen Zellen vorhanden ist. Eine zentrale Rolle in diesem Effektormechanismus nehmen Proteasen mit einem Cystein im reaktiven Zentrum ein, die Caspasen (cystein-containing asp-ases). Bei Säugern existiert eine Genfamilie mit über einem Dutzend Mitgliedern. Im Genom von *C. elegans* findet sich ein Gen (*ced-3*), welches für eine homologe Proteinase kodiert und für jeden physiologischen Zelltod in dieser Spezies essentiell ist. Die Proteinase Ced-3 von *C. elegans* und die homologen Caspasen der Säuger spalten Peptide an der carboxy-terminalen Seite einer Asparaginsäure. Fast alle Säugerzellen produzieren mehrere Zelltod-Proteasen mit unterschiedlichen Substratpräferenzen. Caspasen werden als inaktive Prekursoren translatiert. Sie können ohne Neusynthese aktiviert werden, d.h. die Apoptose kann ohne Beeinflussung der Transkription vom Proteasegen induziert werden. Ihre Aktivierung erfolgt durch Spaltung an Aspartat-Stellen und Zusammenlagerung zu Heterotetrameren. Auf der Aktivierung durch Spaltung an Aspartat-Stellen sowie der Fähigkeit zur Spaltung an solchen Stellen beruht die Fähigkeit zur Selbstaktivierung und zur gegenseitigen selbstverstärkenden Aktivierung in Kaskaden. Als Substrate dienen beispielsweise Proteine des Zytoskeletts (z.B. Aktin) sowie Proteine, die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (z.B. Fodrin), Proteine der DNS-Reparatur (z.B. DNS-PK), Proteine mit Bedeutung für die Integrität der Kernhülle (z.B. Laminin) sowie Proteine, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind (z.B. Retinoblastom-Protein). Durch die Aktivierung der Caspasen kommt es zur gezielten und fast simultanen Ausschaltung bestimmter Funktionen in verschiedenen Teilen der Zelle. Bis zur Aktivierungskaskade der Caspasen ist der Prozeß der Apoptose reversibel. Die Aktivierung der Zelltod-Proteinasen kann bei *C. elegans* durch das *ced-9*-Genprodukt und bei Säugern durch die Homologe Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> unterdrückt werden (Übersichten bei VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997).

In der *Postmortem-Phase* der Apoptose kommt es zur Aktivierung einer neutralen, nichtlyso-somalen,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonuklease, welche die DNS des Zellkerns zunächst in 50-300 kb-Fragmente und schließlich in mono- und oligonukleosomale Fragmente spaltet. Die DNS-Fragmentierung geht mit charakteristischen Veränderungen in der Kernmorphologie einher (s. Tabelle 1; WYLLIE, 1980; WYLLIE et al., 1984; ARENDS et al., 1990; WYLLIE et al., 1992). Abweichend hiervon ordnen SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI (1993) die DNS-Fragmentierung einer sehr frühen Phase der Apoptose zu, da sie in bestimmten Modellen mehrere Stunden vor der Beeinträchtigung der Zellvitalität beobachtet wurde. Auch über die Bedeutung der DNS-Fragmentierung gibt es unterschiedliche Ansichten. Nach SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI (1993) ist die DNS-Fragmentierung Ursache des Zelltods. In neueren Publikationen wird dagegen die Ansicht vertreten, daß sie für den Eintritt des Zelltods nicht erforderlich ist, da beispielsweise bei *C. elegans* bei einem Funktionsverlust des für die Endonuklease kodierenden Gens *nuc-1* die Zerstörung der DNS unterbleibt, das Eintreten des Zelltodes jedoch nicht verhindert wird (WYLLIE, 1997). Nach JACOBSON et al. (1994) sowie SCHULZE-OSTHOFF et al. (1994) ist auch bei Säugerzellen die DNS-Fragmentierung für die Induktion des Zelltods nicht erforderlich. Inwieweit das Auftreten der DNS-Fragmentierung und deren Bedeutung für das Eintreten des Zelltods vom beobachteten Zelltyp bzw. den Testbedingungen abhängt, ist unklar.

Als mögliche Bedeutungen der DNS-Fragmentierung werden insgesamt diskutiert:

- die DNS-Fragmentierung ermöglicht den Kernzerfall und damit die Bildung der „apoptotic bodies“, wodurch die Phagozytose der Zellreste erleichtert wird (ARENDS et al., 1990).
- durch das bevorzugte Angreifen der transkriptionell aktiven, aufgelockerten DNS kommt es zu einem unmittelbaren und schwerwiegenden Verlust der transkriptionellen Aktivität (ARENDS et al., 1990).
- Vermeidung von Transfektionen phagozytischer Zellen durch die Aufnahme von DNS aus apoptotischen Zellen. Eine derartige Bedeutung der DNS-Fragmentierung wird jedoch in Frage gestellt, da beispielsweise bei Invertebraten, bei denen eine Form des physiologischen Zelltods ohne eine regelmäßige DNS-Fragmentierung existiert, derartige Effekte bisher nicht nachgewiesen wurden (ARENDS et al., 1990; WYLLIE et al., 1992).

Die aus der Apoptose hervorgegangenen Zellreste sind in membranumhüllten Vesikeln verpackt. Deren rasche Beseitigung ist von außerordentlicher Bedeutung für die Erhaltung der Gewebestruktur und -funktion, da es bei deren Zerfall zur Freisetzung von zellschädigendem Inhalt (z.B. lysosomale Enzyme) und Neoantigenen kommen kann. So wird eine Phagozytosedefizienz als mögliche Ursache von persistierenden Entzündungen und Autoimmunkrankheiten angesehen (SAVILL, 1997; REN und SAVILL, 1998). Nukleosome, die in vivo nur im Rahmen der Apoptose entstehen, wurden beispielsweise als eines der Hauptantigene beim systemischen Lupus erythematosus identifiziert (MOHAN et al., 1993; BURLINGAME et al., 1994). Die Aufnahme von apoptotischen Zellen und deren Abbau ist ein sehr rascher Vorgang. Von den ersten morphologischen Anzeichen der Apoptose bis zum vollständigen Abbau

vergehen ca. 1-2 Stunden. Daher wird die Menge der zugrunde gehenden Zellen meist weit unterschätzt. Bei einem Anteil apoptotischer Zellen in einem histologischen Schnitt („Schnappschuß“) von einem Prozent werden beispielsweise bei einer Eliminationszeit von einer Stunde und adäquater Mitoserate innerhalb eines Tages 25 Prozent der Zellen abgebaut. Ein geringes Ausmaß an Apoptose in einem Gewebeschnitt bedeutet daher stets eine große Menge zugrunde gehender Zellen (WYLLIE et al., 1980; SAVILL et al., 1989; RAFF, 1992; McCARTHY und EVAN, 1998; SAVILL, 1997). Die Mehrzahl der Apoptosekörperchen findet sich in phagozytiertem Zustand in benachbarten Zellen (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1985).

Die Aufnahme und der Abbau von Überresten apoptotischer Zellen kann einerseits durch professionelle Makrophagen oder semiprofessionelle Phagozyten wie beispielsweise glomeruläre Mesangiumzellen der Niere erfolgen. Andererseits besitzen in vivo vermutlich die meisten Zelltypen die Fähigkeit zur Phagozytose apoptotischer Zellen und deren Überreste. Die zur Beseitigung von apoptotischen Zellen führenden Mechanismen sind noch weitgehend unklar. Apoptotische Zellen werden offensichtlich aufgrund spezifischer Veränderungen an der Oberfläche der Zellmembran erkannt und phagozytiert. Bei diesen Oberflächenveränderungen spielen neu synthetisierte Strukturen offensichtlich keine Bedeutung, vielmehr erfolgt die Erkennung über Modifikationen bereits vorhandener Oberflächenmoleküle. Über die Art der Wechselwirkungen zwischen apoptotischen Zellen und den Phagozyten wird derzeit noch diskutiert (SAVILL, 1997; REN und SAVILL, 1998). DUVALL et al. (1985) postulierten aufgrund von Bindungsstudien unter Verwendung muriner Peritonealmakrophagen und glukokortikoidbehandelter Thymozyten, daß eine lektinartige Struktur auf der Makrophagenoberfläche apoptosespezifische Veränderungen der oberflächlichen Kohlenhydratzusammensetzung, insbesondere die vermehrte Expression von N-Acetylglucosamin und dessen Dimer, N,N'-Diacetylchitobiose, erkennt. Vermutlich werden bei der Apoptose diese Strukturen durch die Abspaltung von terminalen Sialinsäuren demaskiert (SAVILL, 1997). Dieser Mechanismus scheint jedoch nicht für die Erkennung apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch von Monozyten abgeleitete Makrophagen gültig zu sein. Hier soll die Erkennung apoptotischer Zellen zwischen dem Vitronectin-Rezeptor der Makrophagen und einer negativ geladenen Kette auf der Oberfläche der Granulozyten ablaufen (SAVILL et al., 1989). Als weitere apoptoseassoziierte Membranveränderung wurde der Verlust der asymmetrischen Ausrichtung der Phospholipide identifiziert. Dadurch erscheint auf der Zelloberfläche Phosphatidylserin, welches von Phagozyten spezifisch erkannt wird (FADOK et al., 1992; VERMES et al., 1995). Inwieweit diese Mechanismen bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten zellspezifisch sind bzw. ob es neben zellspezifischen Oberflächensignalen auch allgemeingültige Erkennungsmechanismen gibt, ist zur Zeit noch unklar. Die erwähnten Beispiele zeigen jedoch insgesamt, dass offensichtlich eine Vielzahl von Erkennungsmechanismen besteht. Diese sind vermutlich hierarchisch angeordnet, einhergehend mit verschiedenen Stadien des Zelltod-Programmes. Die Ursache für die Vielfalt dieser Mechanismen ist in der Ausbil-

dung einer Redundanz zu suchen, welche der Sicherung der biologisch äußerst bedeutsamen Beseitigung apoptotischer Zellen dient (SAVILL, 1997; REN und SAVILL, 1998).

Die Apoptose ist häufig assoziiert mit einer Expression von Protoonkogenen und anderen, in die Regulation des Zellzyklus involvierten Proteinen. Die Apoptose wurde daher teilweise als ein abortives Durchlaufen des Zellzyklus interpretiert (UCKER, 1991; WYLLIE et al., 1992; AMEISEN, 1996; DESBARATS et al., 1996; KING und CIDLOWSKI, 1998) und ein Wiedereintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus als Voraussetzung für deren Apoptose angesehen. Offensichtlich können jedoch ruhende Zellen auch unabhängig von einem Wiedereintritt in den Zellzyklus apoptotisch werden (COATES et al., 1996) und die Beziehungen der Apoptose zur Mitose erscheinen zu komplex, um sie mit dem Begriff "abortive Mitose" ausreichend exakt zu charakterisieren (LAZEBNIK et al., 1993). Eine Verknüpfung von Zellzyklus und Apoptose ist jedoch von besonderer biologischer Bedeutung, da der Verlust von Kontrollmechanismen des Zellzyklus bzw. DNS-Schäden normalerweise zur Apoptose führen und somit eine Tumorentstehung verhindert wird (FOTEDAR et al., 1996; KING und CIDLOWSKI, 1998).

#### **6.2.2.2. Biologische Bedeutungen der Apoptose**

Die Apoptose ist ein intrinsisches Selbstmordprogramm zur kontrollierten Eliminierung bestimmter Zellen. Alle multizellulären Organismen besitzen Mechanismen, eigene Zellen zu töten und benutzen den physiologischen Zelltod zur Verteidigung, Entwicklung, Homöostase und zum Altern (VAUX und STRASSER, 1996). Für einige Zellen scheint die Apoptose der "default status" zu sein, d.h. die Zelle fällt automatisch der Apoptose anheim, sofern sie nicht durch besondere Signale anderer Zellen – "survival factors" - am Leben erhalten wird. Zusammen mit der Proliferation spielt die Apoptose, die ebenfalls einer strikten Regulation unterliegt, eine entscheidende Rolle für die Gewebshomöostase (RAFF, 1992; WHITE, 1996). Dies gilt in besonderem Maße für Zellproliferationssysteme und erneuerbare Gewebe (WYLLIE et al., 1980; TABIBZADEH, 1995). Die Apoptose wird daher bei Gewebsumbildungsvorgängen während der fetalen Entwicklung (HAANEN und VERMES, 1996), bei der Metamorphose von Insekten und Reptilien, bei altersbedingten Atrophien, in Geweben mit physiologischem Zellumsatz und bei endokrin gesteuerten Atrophien beobachtet (WYLLIE et al., 1980; TABIBZADEH, 1995). Eine bedeutende Rolle spielt sie weiterhin bei der Eliminierung von Immunzellen mit Spezifität für körpereigene Antigene. Zytotoxische T-Zellen und Natural Killer Cells benützen offenbar die Induktion der Apoptose zur Eliminierung virusbefallener Zellen bzw. zur Bekämpfung neoplastischer Zellen (WYLLIE et al., 1980; LIU et al., 1989; VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997). Inwieweit die Apoptose eine über die reine Elimination nicht erwünschter oder nicht mehr benötigter Zellen hinausgehende Bedeutung hat, ist unklar. Die Beeinflussung der Funktion umliegender Zellen durch die Aufnahme von Material aus „apoptotic bodies“ wird diskutiert (TABIBZADEH, 1995).

Apoptotische Vorgänge wurden im Zusammenhang mit physiologischen Funktionen verschiedener Organsysteme erkannt. Auch im Bereich der männlichen und weiblichen Reproduktionsorgane wurden mittlerweile funktionale Bedeutungen der Apoptose identifiziert. Besonders im Rahmen der beim weiblichen zyklischen Reproduktionsgeschehen auftretenden Um- und Abbauvorgänge an Endometrium und Ovar wurden apoptotische Prozesse beobachtet (TABIBZADEH, 1995; BILLIG et al., 1996; GOSDEN und SPEARS, 1997). Im Menstruationszyklus der Frau wurden apoptotische Zellen v.a. in den basalen Zellen des Endometriums gefunden. Ihre Anzahl ist niedrig in der Proliferationsphase, nimmt in der Sekretionsphase stetig zu und erreicht ihren Höhepunkt in der Menstruation (TABIBZADEH, 1995). Bei der Regression des Corpus luteum am Ende der zyklischen Lutealphase kommt der Apoptose eine bedeutende Rolle zu, wobei Befunde beim Rind eher für eine Bedeutung für die strukturelle als für die funktionelle Gelbkörperregression sprechen, da die Apoptose der Lutealzellen erst nach Beginn des Progesteronabfalls nachweisbar ist (JUENGEL et al., 1993; ZHENG et al., 1994). Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse aus in vitro-Untersuchungen an menschlichen Granulosazell-Primärkulturen bzw. an immortalisierten Granulosazellen, in welchen in der Frühphase einer induzierten Apoptose eine gesteigerte Progesteronproduktion beobachtet wurde. Auch in fortgeschrittenen und morphologisch bereits deutlich erkennbaren Stadien der Apoptose wurde die Progesteronproduktion aufrechterhalten. Die Aufrechterhaltung der Progesteronproduktion in diesen apoptotischen Zellen wird offensichtlich durch spezielle Umstrukturierungen in der zellulären Ultrastruktur bewerkstelligt, indem funktionelle Einheiten steroidogener Zellorganellen ("cluster") in den kernnahen Bereich verlagert und durch Elemente des Zytoskeletts von den peripheren Zellbereichen abgeriegelt werden, in denen es zur apoptosespezifischen Proteaseaktivierung und Abschnürung von membranumhüllten Anteilen des Zytoplasmas ("blebbing") kommt. In den abgeschnürten Zellbestandteilen sind kaum Anteile der Steroidproduktionsmaschinerie nachweisbar. Durch diese spezielle Organisation können apoptotische steroidogene Zellen die Produktion von Steroiden aufrechterhalten, solange die steroidogenen Organellen intakt bleiben. Vermutlich sind menschliche Granulosa-Luteinzellen auf der Höhe ihrer Progesteronproduktion bereits apoptotisch (AMSTERDAM et al., 1997, 1998). Auch im Rahmen der Follikelatresie am Ovar (HUGHES und GOROSPE, 1991; PALUMBO und YEH, 1994) und bei der Spermatogenese spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. So fallen 50-70% der Keimzellen aus dem potenziellen Keimzellenpool zu verschiedenen Stadien der Spermatogenese der Apoptose anheim. In den Gonaden fungieren in erster Linie die Gonadotropine als apoptoseverhindernde Überlebensfaktoren. Daneben wurden in den Ovarien in Abhängigkeit von der Zellpopulation eine ganze Reihe weiterer lokaler Überlebensfaktoren identifiziert (BILLIG et al., 1995, 1996; GOSDEN und SPEARS, 1997; SINHA HIKIM et al., 1997). Das Auftreten der Apoptose im Bereich der steroidhormonabhängigen Reproduktionsorgane unterliegt in erster Linie der Regulation durch die Sexualsteroidhormone, wobei das apoptoseinduzierende Signal eher der Entzug als der Anstieg eines Steroidhormons ist. So rief der Entzug der Progesteronwirkung durch Ovariectomie bzw. die

Applikation des Antigestagens RU 38486 bei pseudograviden Kaninchen deutliche apoptotische Veränderungen im Endometrium mit positivem Nachweis der DNS-Fragmentierung hervor (ROTELLO et al., 1992). Der Entzug der Androgenwirkung induziert in androgenabhängigen Organen wie z.B. der Prostata ebenfalls Apoptose (KYPRIANOU und ISAACS, 1988; BERGES et al., 1993). Auch eine durch Östrogenentzug hervorgerufene Apoptose wurde beschrieben (POLLARD et al., 1987). Östrogene werden zu den lokalen ovariellen "survival factors" gerechnet. Unklarheit herrscht noch darüber, ob die Apoptose in diesen Fällen durch den Steroidentzug direkt induziert ist oder indirekt durch die Freisetzung lokaler Faktoren, wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$ , vermittelt wird (TABIBZADEH, 1995).

In selteneren Fällen können Sexualsteroiden jedoch auch die Apoptose bestimmter Zellen bewirken. So induziert der ligandaktivierte Östrogenrezeptor Apoptose in einer Erythroidzelllinie durch die Bindung an einen Transkriptionsfaktor (BLOBEL und ORKIN, 1996), und Androgene bewirken bei der Ratte die Apoptose von Granulosazellen in einem Teil früher antraler und präantraler Follikel (BILLIG et al., 1993).

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung der Apoptose in der Plazenta liegen bisher in mäßiger Zahl für den Menschen und nur vereinzelt für andere Spezies vor. NELSON (1996) beschreibt die Bildung von Epithellücken im Synzytiotrophoblasten der Humanplazenta infolge fokaler apoptotischer Epitheluntergänge und vermutet dahinter einen Mechanismus, welcher die Permeabilität der Plazentaschranke für Makromoleküle reguliert. DEMIR et al. (1995) beobachteten zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt ebenfalls degenerative Veränderungen in Humanplazenten, welche einige Charakteristika der Apoptose aufwiesen. Die Autoren vermuteten eine Beziehung dieser Veränderungen zur Ablösung der reifen Plazenta. SMITH et al. (1997a) fanden in der Humanplazenta im dritten Trimester eine signifikant höhere Apoptose-Inzidenz als im ersten Trimester. Sie wiesen die Apoptose in allen vorhandenen Zelltypen, überwiegend in Trophoblastzellen nach, die allerdings auch zahlenmäßig die größte Zellfraktion im untersuchten Probenmaterial darstellten. Sie unterstellten - ähnlich wie RUSIC et al. (1998) - eine Bedeutung der Apoptose für die normale Entwicklung und Alterung der Plazenta. Eine Bedeutung wird der Apoptose in der Humanplazenta auch bei der Erzeugung einer lokalen, spezifischen Immuntoleranz gegen paternale Alloantigene beigegeben. Möglicherweise werden aktivierte maternale Lymphozyten durch Zytokine aus dem Trophoblasten zur Apoptose veranlaßt (UCKAN et al., 1997; MOR et al., 1998; PHILLIPS et al., 1999). In der Humanplazenta wird vermutlich ein Teil der invasiven Trophoblastzellen via Apoptose eliminiert (AL-LAMKI et al., 1998). Ferner wird beim Menschen eine Bedeutung der Apoptose für verschiedene pathologische Prozesse in der Plazenta wie bei Aborten (KOKAWA et al., 1998) oder der intrauterinen Wachstumsretardierung (SMITH et al., 1997b) angenommen. Bei der Ratte beruht die Regression der Dezidua im Rahmen der Implantation der Blastozyste offensichtlich auf einem apoptotischen Prozeß (GU et al., 1994). Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung der Apoptose in der Plazenta von Wiederkäuern liegen zur Zeit kaum vor. WOODING (1992) beobachtete in Plazenten von Schafen und

Ziegen, daß bei der Bildung fetomaternaler Synzytien viele maternale Karunkelepithelzellen, die nicht mit fetalen Trophoblastzellen zu Hybridzellen fusionierten, eliminiert wurden und vermutete die Apoptose als zugrunde liegenden Prozeß.

### **6.3. Eigene Untersuchungen**

#### **6.3.1. Material und Methoden**

##### **6.3.1.1. Probenmaterial**

Die Untersuchungen dieses Kapitels zur Apoptose in den Plazentomen des Rindes wurden an dem in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.1. beschriebenen, am 150., 220., 240. und 270. Graviditätstag sowie unter der Geburt entnommenen, formalinfixierten Probenmaterial (n= 3 Tiere/Versuchsgruppe) durchgeführt.

##### **6.3.1.2. In Situ-End-Labeling (ISEL)**

Das in situ-End-Labeling (ISEL) zur Darstellung internukleosomal fragmentierter DNS in formalinfixierten Gewebeschnitten wurde im wesentlichen nach dem von GAVRIELI et al. (1992) beschriebenen Verfahren durchgeführt, welches zur Anwendung an den Rinderplazentomen geringfügig modifiziert wurde. Hierbei werden die im Rahmen der apoptoseassoziierten Endonukleaseaktivierung gebildeten freien DNS-Enden mit Hilfe des Enzymes terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TDT) verlängert, wobei in die Verlängerungen markierte Nukleotide eingebaut werden. Diese können dann mit einem entsprechenden Nachweissystem detektiert werden.

In den eigenen Untersuchungen wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Entparaffinieren der 4 µm dicken Gewebeschnitte für 2 x 20 Minuten in Xylol.
2. Rehydrieren der entparaffinierten Gewebeschnitte über eine absteigende Äthanolreihe (2x 10 Minuten in 100%igem Äthanol, je 5 Minuten in 90-, 80-, 70- und 50%igem Äthanol).
3. Waschen der Gewebeschnitte für 5 Minuten in Aqua dest.
4. Inkubation der Gewebeschnitte mit 20 µg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim) in Aqua dest. für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
5. Waschen der Gewebeschnitte 3 x 5 Minuten in Aqua dest.
6. Blockierung der endogenen Peroxidase: Inkubation in 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Aqua dest. für 5 Minuten.
7. Waschen der Gewebeschnitte 3 x 5 Minuten in Aqua dest.
8. Überschichten der Gewebeschnitte für 10 Minuten mit TDT-Puffer in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.
9. Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TDT)-Reaktion: Überschichten der Gewebeschnitte mit jeweils 4.2 U TDT und 0.42 nmol biotinyliertem dUTP (beide Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim) in 50µl TDT-Puffer; anschließend Inkubation für 90 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer.
10. Waschen der Gewebeschnitte 3 x 5 Minuten in TB-Puffer.
11. Waschen der Gewebeschnitte 2 x 5 Minuten in Aqua dest.
12. Waschen der Gewebeschnitte 2 x 10 Minuten in PBS pH 7.2.

13. Überschichten der Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.
14. Absaugen und Waschen der Schnitte (3 x 5 Minuten in PBS-Puffer pH 7.2).
15. Inkubation der Schnitte in der Substrat-Lösung für 6 Minuten (0.05% Diaminobenzidinhydrochlorid-Dihydrat/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mmol Imidazolpuffer pH 7.08).
16. Waschen der Gewebeschnitte 3 x 5 Minuten in Aqua dest.
17. Leichte Gegenfärbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin.
18. Einbettung und Eindecken der Gewebeschnitte in Kaisers Glyzerin-Gelatine (Merck KgaA, D-64271 Darmstadt).

Von jedem untersuchten Gewebeblock wurden Negativkontrollen angefertigt, indem die entsprechenden Schnitte der oben beschriebenen Prozedur mit der Ausnahme unterworfen wurden, daß die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase-Lösung durch ein entsprechendes Volumen an TDT-Puffer ersetzt wurde.

### **6.3.1.3. Auswertung der ISEL-gefärbten Präparate zur quantitativen Erfassung der Apoptose in den Plazentomen**

Die quantitative Auswertung der ISEL-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte weitgehend analog dem für die quantitative immunhistologische Erfassung des Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors im Karunkelstroma beschriebenen Verfahren (s. Kapitel IV, Abschnitte 4.3.2. bzw. 4.3.3.). Von jedem analysierten Plazentom wurden drei Schnitte nach der im folgenden beschriebenen Weise ausgewertet: die sich über die gesamte Höhe der Plazentome erstreckenden keil- bzw. trapezförmigen Gewebeschnitte wurden in drei zur Plazentomoberfläche parallel verlaufende Zonen gleicher Höhe eingeteilt: eine oberflächliche, an die Chorionplatte angrenzende Zone I, eine dem Karunkelstiel benachbarte Zone III sowie eine intermediäre Zone II. Die Auswertung erfolgte getrennt für die definierten Zonen, um eventuelle Gradienten entlang der Primärzotten bzw. -septen erfassen zu können. Da im Gegensatz zur immunhistologischen Darstellung von Steroidhormonrezeptoren ISEL-positive Signale - bezogen auf die Zahl der Zellen pro Gesichtsfeld - relativ selten waren, wurde nicht der Prozentsatz ISEL-positiver Zellen, sondern die Zahl apoptotischer Ereignisse (AE) pro Gesichtsfeld bestimmt. Hierzu wurden pro Zone bei 200-facher Vergrößerung zehn beliebig ausgewählte, nicht überlappende Gesichtsfelder ausgewertet, wobei ein Gesichtsfeld einer Fläche von 5 mm<sup>2</sup> entsprach. Als apoptotisches Ereignis (AE) wurde entweder eine ISEL-positive Zelle, ein ISEL-positiver größerer Zellrest bzw. eine offensichtlich aus einer Zelle hervorgegangene Gruppe ISEL-positiver Zelltrümmer definiert. Als ISEL-positiv konnten auch schwache Chromogen-niederschläge gewertet werden, da sich in den negativen Kontrollschnitten keine zell- bzw. zelltrümmerassoziierten unspezifischen Reaktionen fanden.

### **6.3.1.4. Versuchsaufbau und statistische Auswertung**

#### **6.3.1.4.1. Quantitative Untersuchung zum Vorkommen der Apoptose in den Plazentomen des Rindes zwischen dem 150. Trächtigkeitstag und der Geburt (longitudinale Studie)**

Zur quantitativen Erfassung der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse in den Plazentomen in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe sowie der Lokalisation innerhalb des Plazentoms (Zonen I-III) wurde von jedem der jeweils drei Versuchstiere des 150., 220., 240. und 270. Graviditätstages sowie von drei Tieren unter der termingerechten Geburt je ein willkürlich ausgewähltes Plazentom wie in Abschnitt 6.3.1.3. beschrieben analysiert. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Meßwerte wurden diese vor der statistischen Bearbeitung logarithmisch transformiert. Zur statistischen Auswertung wurde entsprechend dem Versuchsaufbau eine vierfache hierarchische Varianzanalyse nach dem in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.5.1. beschriebenen gemischten Modell (BMDP8V, BMDP statistical software - DIXON, 1993) durchgeführt, welches die folgenden vier Haupteffekte beinhaltet:

- a) Versuchsgruppe (G) - fixer Effekt;
- b) Tier innerhalb der Versuchsgruppe (T[G]) - zufälliger Effekt;
- c) Schnitt innerhalb des Tieres (S[TG]) - zufälliger Effekt;
- d) Zone (Z) - fixer Effekt.

#### **6.3.1.4.2. Untersuchung zur Variabilität des quantitativen Apoptose-Nachweises zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums (horizontale Studie)**

Bedingt durch die begrenzte Verfügbarkeit von Probenmaterial wurde in Abschnitt 6.3.1.4.1. pro Tier nur jeweils ein Plazentom hinsichtlich der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse quantitativ analysiert. Zur Abschätzung der Variabilität des Auftretens apoptotischer Ereignisse zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums wurden von einer 270 Tage trächtigen Kuh fünf Plazentome wie in Kapitel IV, Abschnitt 4.3.1. beschrieben entnommen und fixiert. Bei der Probenentnahme wurde deren maximaler Durchmesser und die Lokalisation innerhalb des Uterus registriert. Jedes dieser fünf Plazentome wurde nach dem im Abschnitt 6.3.1.3. beschriebenen Verfahren analysiert. Vor der statistischen Bearbeitung wurden die Meßwerte ebenfalls aufgrund ihrer rechtsschiefen Verteilung logarithmisch transformiert. Zur statistischen Auswertung wurde zunächst eine Varianzzerlegung mittels dreifaktorieller hierarchischer Analyse nach dem gemischten Modell (BMDP8V – DIXON, 1993) durchgeführt, welches die folgenden drei Haupteffekte beinhaltet:

- a) Plazentom (P) – zufälliger Effekt;
- b) Schnitt innerhalb des Plazentoms (S[P]) – zufälliger Effekt;
- c) Zone (Z) – fixer Effekt.

Anschließend wurde mittels einer Kovarianzanalyse mit der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser* auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Plazentomgröße und der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse untersucht (BMDP2V – DIXON, 1993).

### 6.3.1.5. Puffer, Chemikalien und Reagenzien

#### a) Puffer

##### PBS-Puffer pH 7.2

NaCl	7.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43
Aqua dest.	ad 1000 ml

##### 50 mmol Imidazolpuffer

Imidazol	8.51 g
Aqua dest.	ad 2000 ml

pH-Wert mit HCl auf 7.08 einstellen

##### DAB-Substratlösung

50 mmol Imidazolpuffer pH 7.08	200 ml
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	0.1 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig)	70 µl

Direkt frisch vor Gebrauch ansetzen und filtrieren

##### TDT-Puffer

CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.24 g
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsNaO <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	29.96 g
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	3.63 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

pH-Wert mit 1N HCl auf 7.2 einstellen

##### TB-Puffer

NaCl	17.53 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8.82 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

**b) Chemikalien und Reagenzien****Carl Roth GmbH + Co, D-76185 Karlsruhe**

Äthanol 99.6% DAB10

**Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim**

Biotin-16-dUTP (Biotin-16-2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat (Katalognummer 1093070).

Die Originallösung (50 nmol in 50 µl) wurde mit PBS 1:10 verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Proteinase K aus Tritirachium album (Nr. 161519)

Terminale Desoxynucleotidyltransferase (Katalognummer 220582).

Die Originallösung (500 U in 25 µl) wurde mit 50% Glyzerin/PBS 1:20 verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Merck KgaA, D-64271 Darmstadt**

Kaisers Glyzerin-Gelatine

Wasserstoffperoxid 30%

**Merck-Schuchardt, D-85662 Hohenbrunn**

Xylol zur Synthese

**SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, D82039 Deisenhofen**

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid Dihydrat

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma<sup>®</sup>-Base)

**Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA**

Streptavidin-Peroxidase-Komplex

### 6.3.2. Ergebnisse

#### 6.3.2.1. Beobachtungen in ISEL-gefärbten Präparaten

Apoptotische Ereignisse wurden in allen definierten Zellkategorien der Plazentome (Trophoblast, Chorionzottenstroma, Karunkelepithel und Karunkelstroma) beobachtet. Mit Ausnahme einer begrenzten Lokalisation in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes, in der ein Großteil der Karunkelepithelzellen positiv reagierte, wurde zu allen Untersuchungsstadien die bei weitem überwiegende Anzahl der ISEL-positiven Reaktionen im Trophoblasten angetroffen (s. Abbildung 1). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle waren die apoptotischen Ereignisse einzeln gelegen. Als Besonderheit wurden in einem Plazentom eines 220 Tage graviden Rindes in oberflächlichen kleinen Chorionzotten ganze Gruppen ISEL-positiver Trophoblastzellen angetroffen. In nahezu allen Fällen wiesen ISEL-positive Zellen deutliche, fortgeschrittene Degenerationserscheinungen wie niedriges Zytoplasma-Kern-Verhältnis, unregelmäßige Kernform mit grobscholliger Kondensation des Chromatins an der Innenseite der Kernmembran oder Karyolyse auf. Aufgrund der meist fortgeschrittenen Degenerationsstadien der ISEL-positiven Zellen war eine zweifelsfreie Identifizierung des jeweiligen Typs der zugrunde gegangenen Zellen in der Mehrzahl der Fälle nicht möglich. In manchen Fällen war zu erkennen, daß ISEL-positive Zellen bzw. Zelltrümmer von Trophoblastzellen phagozytiert in Vakuolen vorlagen. Häufig wies in apoptotischen Zellen oder Apoptosekörperchen der Zytoplasmaanteil ein mehr oder weniger deutliches Signal auf, während das kondensierte Chromatin nur schwach oder überhaupt nicht angefärbt war. Gelegentlich wurde eine diffuse schwache Braunfärbung von Vakuolen in Trophoblastzellen mit feingranuliertem Inhalt beobachtet. Qualitativ waren in den Präparaten 150, 220 und 240 Tage trächtiger Tiere keine Unterschiede im Reaktionsmuster mit überwiegender Lokalisation ISEL-positiver Reaktionen im Trophoblasten festzustellen (Abbildung 1 und 2).

Bei einem der am 270. Trächtigkeitstag untersuchten Tiere waren neben den im Trophoblasten vorhandenen Reaktionen gelegentlich auch positive Reaktionen in mehreren benachbarten Zellen des Karunkelepithels vorhanden, wobei diese Zellen morphologisch feststellbare fortgeschrittene Degenerationserscheinungen wie die Kondensation des Chromatins an der Innenseite der Kernmembran aufwiesen (s. Abbildung 3). Zudem fanden sich in diesen Präparaten vermehrt ISEL-positive Zelltrümmer an der fetomaternalen Grenzlinie.

Auch unter der Geburt (s. Abbildungen 4-6) waren positive Reaktionen überwiegend im Trophoblasten nachweisbar. Gegenüber der Trächtigkeit war das Reaktionsmuster in der Weise verändert, daß positive Reaktionen vermehrt kleinere Zelltrümmer betrafen (s. Abbildung 5), während positive Reaktionen in nicht vollständig zerfallenen Zellen seltener waren. Daneben reagierten auch verbliebene Reste des Karunkelepithels teilweise positiv (s. Abbildung 4). In allen Präparaten konnte die unter der Geburt beim Rind auftretende erhebliche Reduktion der Anzahl der Trophoblastriesenzellen beobachtet werden. ISEL-positive Reaktionen in den verbliebenen Trophoblastriesenzellen waren eher selten (s. Abbildung 6),

die überwiegende Mehrzahl der verbliebenen Trophoblastriesenzellen besaß morphologisch einen jugendlichen Charakter, d.h. sie zeigte ein hohes Zytoplasma-Kern-Verhältnis, war ISEL-negativ und wies, soweit dies an Proteinase-behandelten Gewebeschnitten beurteilbar war, morphologisch keine Apoptose-typischen Charakteristika auf.

---

Seite 269

Abbildung 1: Querschnitt einer Chorionzotte eines 220 Tage graviden Rindes mit zahlreichen ISEL-positiven Zellen bzw. Zelltrümmern. Im oberen rechten Bildbereich ist eine ISEL-positive abschilfernde Karunkelepithelzelle (↓) zu erkennen (Vergrößerung: x340).

Abbildung 2: Anschnitt einer Chorionzotte eines 220 Tage graviden Rindes. Abgebildet sind drei aus dem Karunkelepithel abschilfernde ISEL-positive Zellen (↓). Bei der größeren Zelle im linken oberen Bildbereich handelt es sich vermutlich um eine eingewanderte Trophoblastriesenzelle oder um eine fetomaternale Hybridzelle (Vergrößerung: x 900, Ölimmersion).

KS= Karunkelstroma; SZ= Stroma der Chorionzotten

---

Seite 270

Abbildung 3: Gruppe von degenerierenden ISEL-positiven Karunkelepithelzellen mit apoptosecharakteristischer Chromatinstruktur in einem Plazentom eines 270 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: x1100; Ölimmersion).

KS= Karunkelstroma; T= Trophoblast

Abbildung 4: ISEL-positive Reaktionen (↓) in Resten des Karunkelepithels zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt.

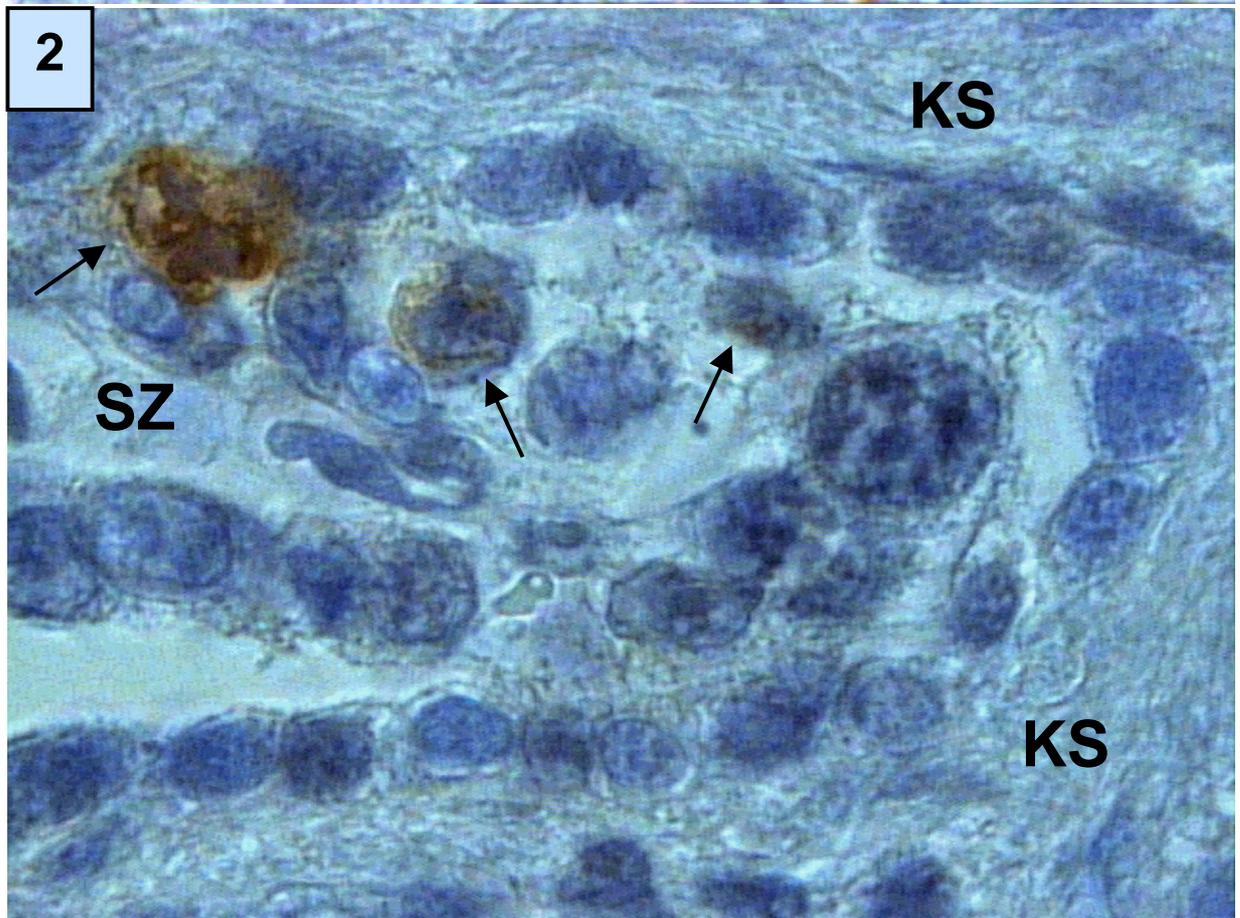
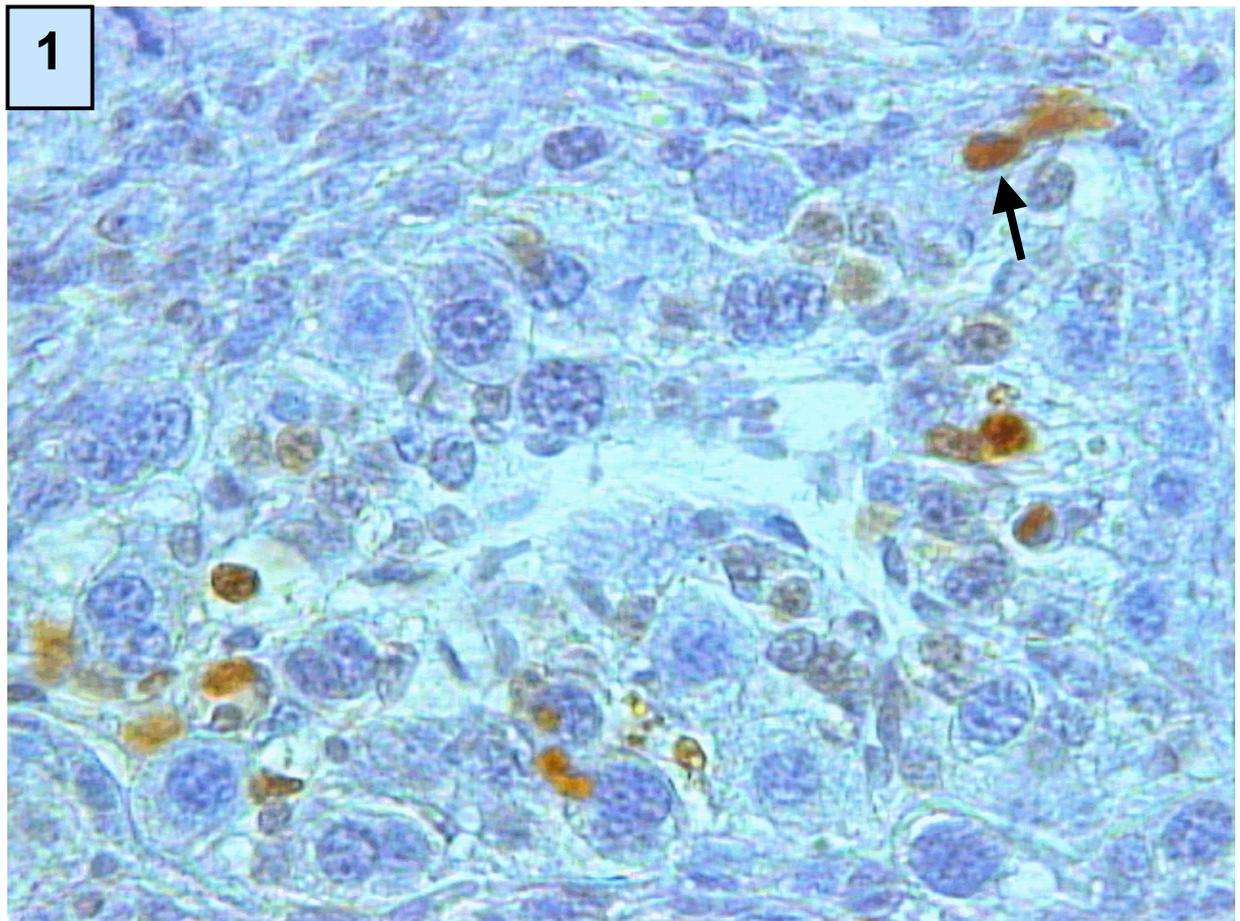
C= Anschnitte von Chorionzotten; KS= Karunkelstroma

---

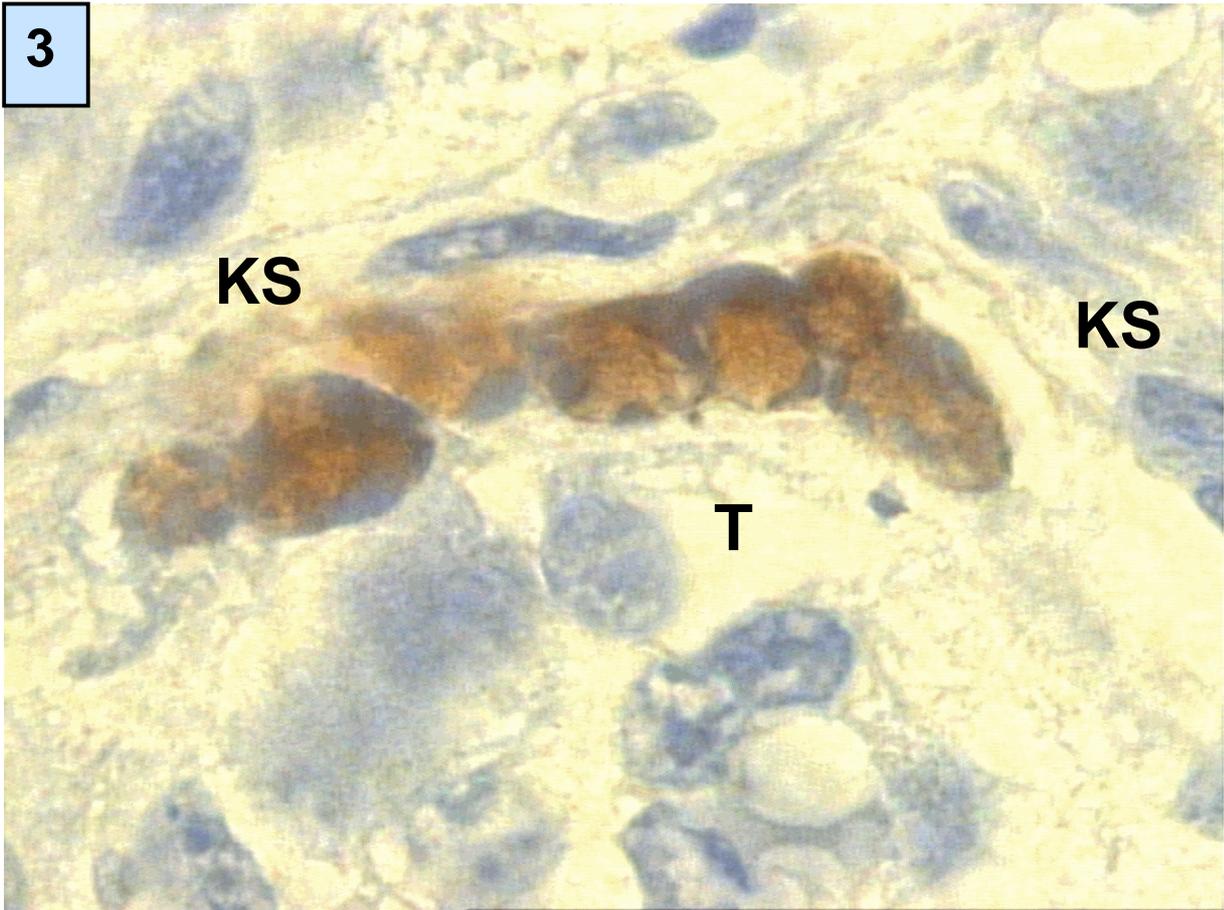
Seite 271

Abbildung 5: ISEL-positive Reaktionen in Chorionzotten zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt. Neben ISEL-positiven kompletten Zellen (\*) fanden sich unter der Geburt vermehrt positive Reaktionen in Form von Gruppen von kleinerer, verstreut liegender Zelltrümmer (↓) (Vergrößerung: x1100; Ölimmersion)

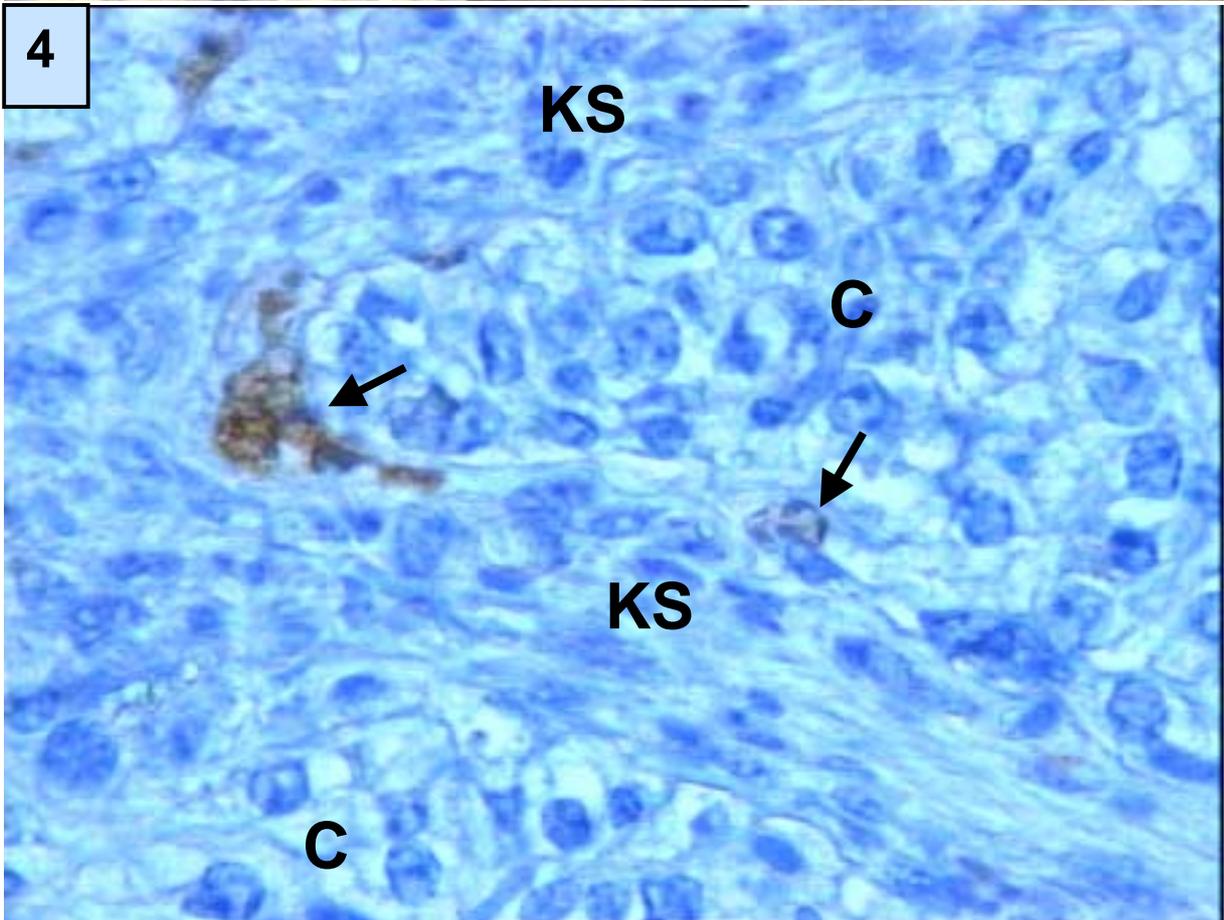
Abbildung 6: Große ISEL-positive Trophoblastzelle unter der Geburt. Vermutlich handelt es sich hierbei aufgrund der Größe um eine Trophoblastriesenzelle (Vergrößerung: x1100; Ölimmersion).

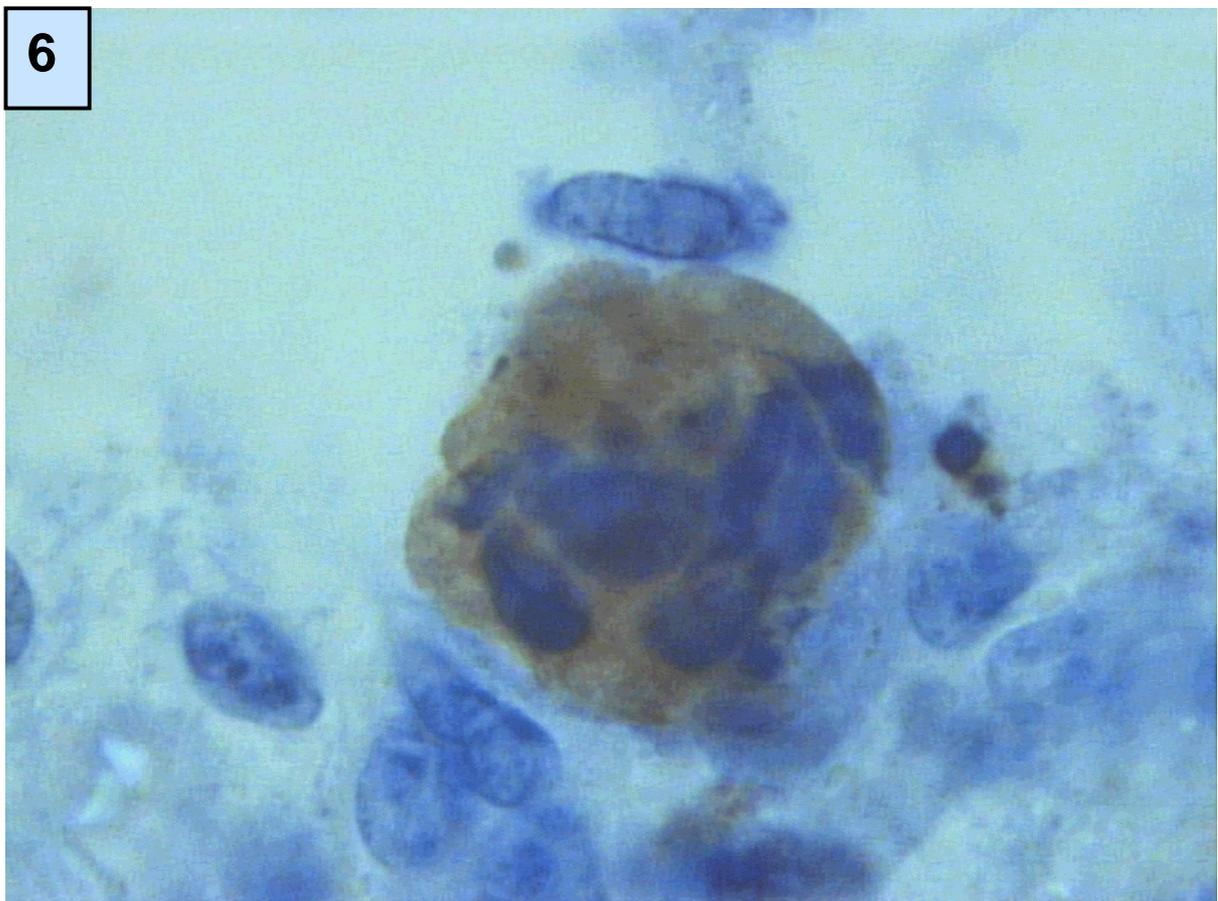
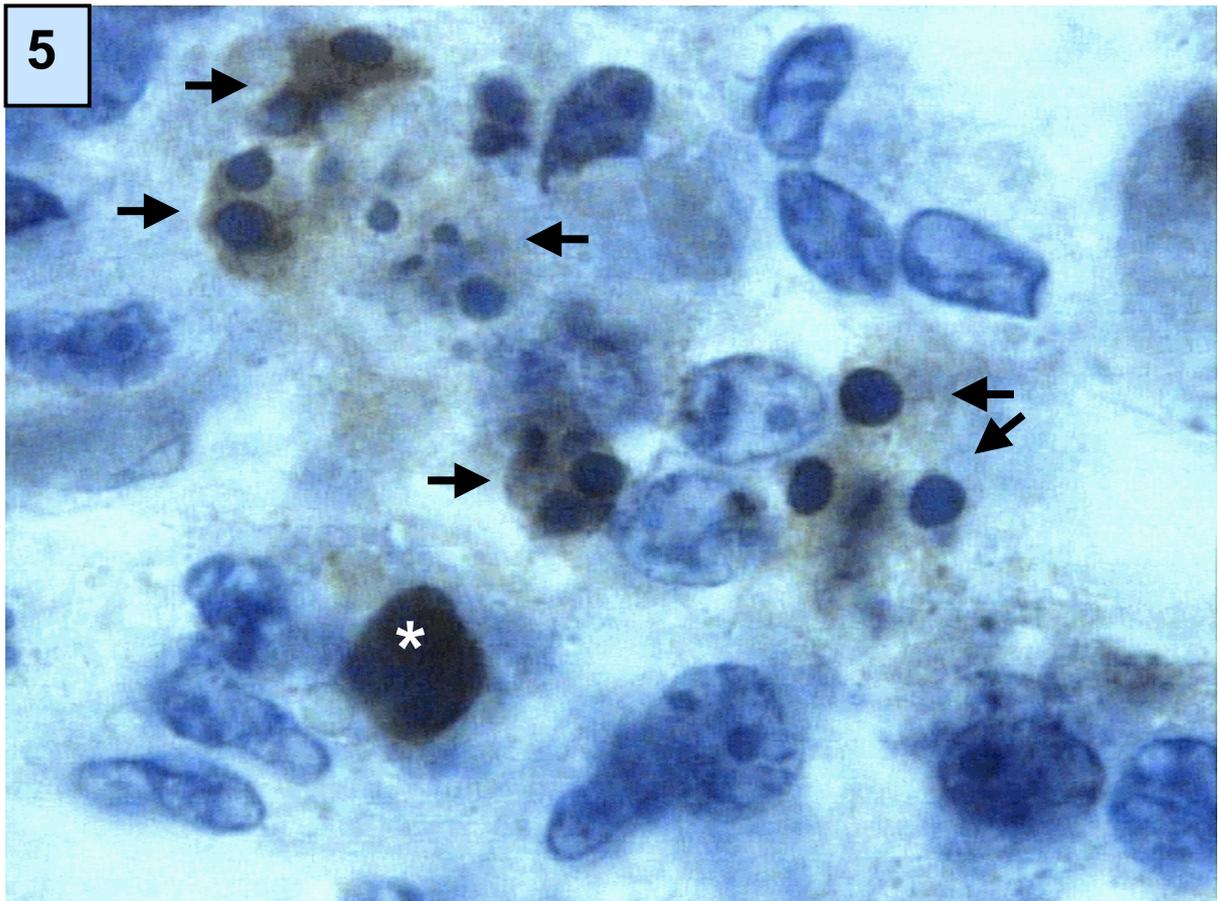


3



4





### 6.3.2.2. Ergebnisse der quantitativen Untersuchung zum Vorkommen der Apoptose in den Plazentomen des Rindes zwischen dem 150. Trächtigkeitstag und der Geburt (longitudinale Studie)

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen zur Häufigkeit apoptotischer Ereignisse (AE) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe (Graviditätstage 150, 220, 240, 270; Geburt) und der Lokalisation innerhalb der Plazentome (Zonen I-III) sind in Abbildung 7 dargestellt. Die vierfache Varianzanalyse ergab – offensichtlich bedingt durch die hohe Streuung der Messwerte innerhalb der Versuchsgruppen in Verbindung mit dem niedrigen Stichprobenumfang - keinen signifikanten Einfluß der Versuchsgruppe auf die AE-Häufigkeit (zu den Ergebnissen der statistischen Auswertung s. Tabelle 3). Es zeigte sich jedoch zwischen dem 150. Trächtigkeitstag und der Geburt eine deutliche Tendenz einer mit zunehmender Graviditätsdauer ansteigenden Apoptosehäufigkeit, wobei im Mittel die höchsten AE-Werte am 220. Trächtigkeitstag gemessen wurden. Zwischen den drei definierten Zonen des Plazentoms ergaben sich bezüglich der AE-Häufigkeit keine signifikanten Unterschiede.

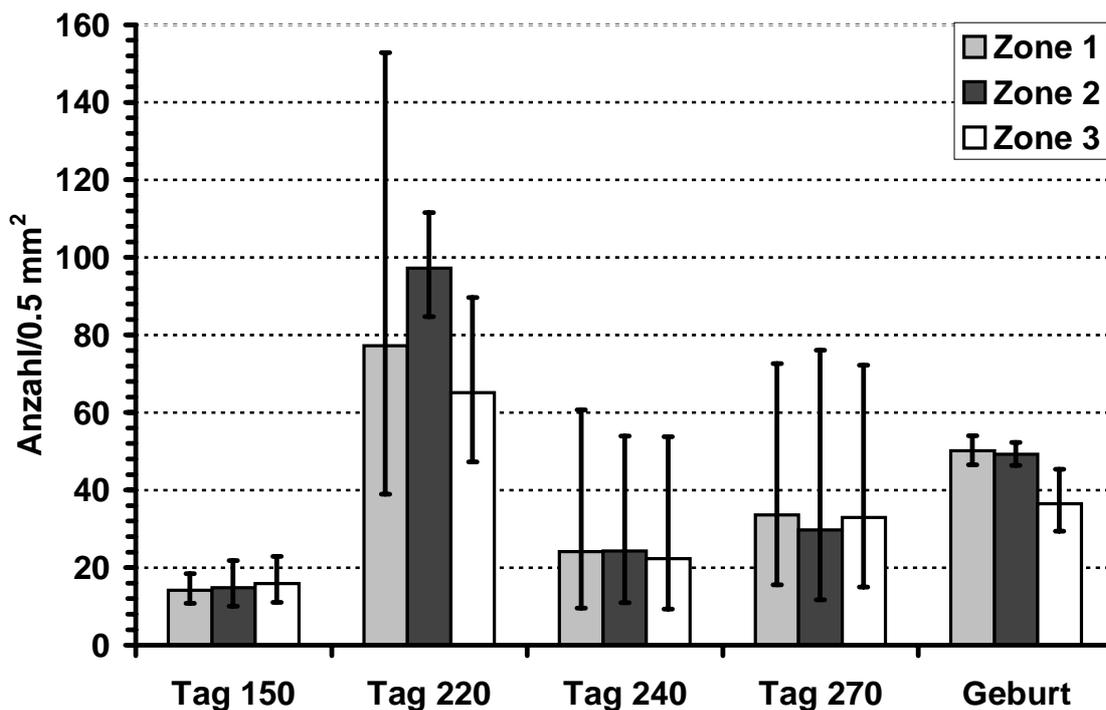


Abbildung 7: Häufigkeit apoptotischer Ereignisse (Anzahl/5 mm<sup>2</sup> Gewebeschnitt) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe (Graviditätstage 150, 220, 240, 270; Geburt - n= 3 Tiere pro Gruppe) und der Lokalisation innerhalb der Plazentome (Zonen I-III). Dargestellt ist für die Zonen I-III der aus den drei Versuchstieren pro Gruppe ermittelte geometrische Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup>.

Tabelle 3: Ergebnisse der vierfachen Varianzanalyse (s. Abschnitt 6.3.1.4.1.) zur quantitativen Untersuchung der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe (Graviditätstage 150, 220, 240, 270; Geburt; n= 3 Tiere pro Gruppe) und der Lokalisation innerhalb der Plazentome (Zonen I-III).

<b>Einflußgröße bzw. Wechselwirkung</b>	<b>p-Wert</b>
Versuchsgruppe	0.1207
Zone	0.3236
Tier	0.0000
Versuchsgruppe x Zone	0.5236

### **6.3.2.3. Ergebnisse der Untersuchung zur Variabilität des quantitativen Apoptose-Nachweises zwischen verschiedenen Plazentomen eines Individuums (horizontale Studie)**

Bei der Untersuchung zur Variabilität der AE-Häufigkeit in fünf Plazentomen unterschiedlicher Größe einer 270 Tage trächtigen Kuh (s. Tabelle 4) ergab sich eine hochsignifikant positive Streuung der Meßgröße zwischen den Plazentomen ( $p < 0.01$ ; zu den Ergebnissen der statistischen Auswertung s. Tabelle 5). Ein signifikanter Einfluß der Zone ließ sich auch bei den fünf Plazentomen dieses Einzeltieres statistisch nicht absichern. Allerdings ergab sich eine hochsignifikante Wechselwirkung Plazentom x Zone ( $p < 0.01$ ). Ein Zusammenhang zwischen dem maximalen Durchmesser der Plazentome und deren AE-Häufigkeit war statistisch nicht nachweisbar ( $p > 0.05$ ).

Tabelle 4: Variabilität der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse (AE) zwischen fünf Plazentomen verschiedener Größe und Lokalisation einer 270 Tage trächtigen Kuh. Angegeben sind die über die Zonen I-III gemittelten Meßwerte aus drei Schnitten (S1-S3) pro Plazentom in AE/5 mm<sup>2</sup> Gewebeschnitt sowie die daraus errechneten geometrischen Mittelwerte ( $X_g$ ) und Streufaktoren (SF).

Plazentom/Lokalisation	$\varnothing_{\max}$ (cm)	S1	S2	S3	$X_g$	SF
1) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	18	81.97	71.32	65.62	72.66	1.096
2) Spitze des fruchttragen- den Horns	12	62.98	64.56	47.23	57.69	1.152
3) fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	10	78.72	85.60	65.20	76.02	1.121
4) Spitze des nicht-fruchttra- genden Horns	4	45.98	60.98	63.25	56.18	1.153
5) nicht-fruchttragendes Horn; seitlich im Bereich der großen Krümmung	4	125.77	91.93	107.27	107.44	1.137

$\varnothing_{\max}$  = maximaler Durchmesser des Plazentoms

Tabelle 5: Statistische Auswertung zur Häufigkeit apoptotischer Ereignisse in fünf verschiedenen Plazentomen unterschiedlicher Größe und Lokalisation einer 270 Tage graviden Kuh (zum Aufbau des statistischen Modells s. Abschnitt 6.3.1.4.2.).

a) Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse.

Einflußgröße bzw. Wechselwirkung	p-Wert
Plazentom	0.0026
Zone	0.9597
Plazentom x Zone	0.0010

b) Ergebnis der Kovarianzanalyse auf das Vorliegen eines linearen Trends der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse bezüglich der Kontrollvariablen *maximaler Plazentomdurchmesser*.

	p-Wert
Zone (Einflußgröße)	0.8621
max. Plazentomdurchmesser	0.6047

### 6.3.3. Diskussion

#### 6.3.3.1. Diskussion der Methodik

Die Entscheidung für das in situ-End-Labeling (ISEL) als Methode zur biochemischen Absicherung bzw. zur Quantifizierung der Apoptose in den Rinderplazentomen wurde aus folgenden Überlegungen getroffen:

- 1) das primäre Interesse galt der Lokalisation apoptotischer Zellen sowie dem Typ der zugrundegehenden Zellen.
- 2) Der Anteil der internukleosomal gespaltenen DNS an der Gesamt-DNS der Plazentome war im Vergleich zu Experimenten an kultivierten Zellen mit induzierter Apoptose insgesamt als gering einzuschätzen. Unter diesen Bedingungen erschien der Einsatz der häufig zur Absicherung und auch zur Quantifizierung der Apoptose eingesetzten elektrophoretischen Darstellung der DNS-Fragmentierung (DNS-Leiter) in den eigenen Untersuchungen wenig sinnvoll (zu Vor- und Nachteilen verschiedener Methoden des Apoptose-Nachweises s. McCARTHY und EVAN, 1998).

Der Einsatz des ISEL zum Apoptosenachweis in den Plazentomen des Rindes war erst nach umfangreichen Vorversuchen zur Etablierung der Methodik möglich. Die Anwendung eines kommerziell erhältlichen Fertigkeitkits (In situ Cell Death Detection Kit - Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim) nach Gebrauchsanleitung des Herstellers resultierte in einem unrealistisch hohen Anteil ISEL-positiver Zellen, die in der überwiegenden Mehrzahl keinerlei morphologische Charakteristika der Apoptose aufwiesen. Weiterhin fiel beim Durchmustern der entsprechend behandelten Gewebeschnitte auf, daß fast alle in der Schnittebene gelegenen Kerne angefärbt waren, während sich die negativen Kerne durchweg in den tieferen Bereichen der Gewebeschnitte befanden. Offensichtlich produzierten die wenigen in der Schnittebene erzeugten freien DNS-Enden bereits ein falsch-positives Signal. Die Spezifität des Verfahrens wurde durch eine Dämpfung des sekundären Nachweissystems (Verringerung der Streptavidin-Peroxidase-Konzentration bzw. in den Vorversuchen Verringerung der Konzentration des Anti-Digoxigenin-Antikörpers) erreicht. Allerdings waren positive Reaktionen dann fast ausschließlich mit Zellen im fortgeschrittenen Zustand der Degeneration bzw. mit Zelltrümmern assoziiert, so daß die Zuordnung des Zelltyps in vielen Fällen nicht möglich war. Daher wurde auf eine separate Erfassung der Zellkategorien - wie bei der Charakterisierung der Zellproliferation durchgeführt - verzichtet. Die Tatsache, daß ISEL-positive Zellen überwiegend morphologisch erkennbare Degenerationserscheinungen aufwiesen, ist in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen zum Ablauf der Apoptose, nach denen die DNS-Fragmentierung mit charakteristischen Kernveränderungen einhergeht (ARENDS et al., 1990) und ein sehr spätes Ereignis im apoptotischen Prozeß darstellt (BEN-SASSON et al., 1995; VAUX und STRASSER, 1996; WYLLIE, 1997). Die Beobachtung, daß in apoptotischen Zellen und „apoptotic bodies“ häufig der Zytoplasmaanteil und weniger das kondensierte Chromatin angefärbt war, ist im Einklang mit den Ergebnissen von ARENDS et al. (1990),

nach denen in apoptotischen Zellen kurze oligo- und mononukleosomale DNS-Fragmente zum großen Teil vom Kern freigesetzt werden, während die größeren DNS-Fragmente im Kern verbleiben. Vermutlich sind die im Rahmen der DNS-Fragmentierung gebildeten DNS-Enden in stark kondensiertem Chromatin auch weniger zugänglich für die Nachweisreagenzien.

Da mittels der eigenen Methode nur die durch DNS-Fragmentierung gekennzeichneten Spätstadien erfaßt wurden, geben die auf der Basis des ISEL ermittelten Häufigkeiten apoptotischer Ereignisse das tatsächliche Ausmaß der in den Plazentomen stattfindenden Apoptose nur unzureichend wieder. Nach GAVRIELI et al. (1992) werden apoptotisch zugrunde gehende Zellen mittels ISEL nur in einer kurzen, 1-3 Stunden dauernden Zeitspanne detektiert. Apoptotische Zellen können mittels ISEL nur nachgewiesen werden, wenn die DNS-Fragmentierung der Elimination vorausgeht. In Geweben, in denen apoptotische Zellen rasch und effizient eliminiert werden, können diese nur zu einem sehr geringen Teil mittels ISEL erfaßt werden (BEN-SASSON et al., 1995). Wie von BJÖRKMAN (1969) beschrieben, wurden häufig auch im eigenen Untersuchungsmaterial – soweit lichtmikroskopisch beurteilbar – im Innern von Trophoblastzellen inkorporierte, ganze Zellen gefunden. Auch für die Plazenta des Schafes wurde beschrieben, daß sowohl Trophoblastriesenzellen als auch die uninukleären Hauptzellen ganze Zellen phagozytieren (WIMSATT, 1951). Weiterhin wurden in den Gewebeschnitten in Trophoblastzellen große Vakuolen gefunden, deren Inhalt bei der Herstellung der Schnitte herausgelöst wurde. Der Inhalt gleichartiger intakter Vakuolen bestand häufig aus schwach ISEL-positivem, feingranuliertem Material, welches vermutlich dem intrazellulären Abbau von Zellen bzw. Zelltrümmern entsprang. Dies spricht insgesamt dafür, daß auch im Trophoblasten apoptotische Zellen teilweise in sehr frühen Stadien anhand spezifischer Oberflächenveränderungen erkannt, rasch phagozytiert und damit zu einem erheblichen Teil der Nachweisbarkeit durch die ISEL-Methode entzogen werden. Aus dem oben gesagten kann insgesamt gefolgert werden, daß trotz der relativ niedrigen, auf der Basis der ISEL-Methode ermittelten AE-Häufigkeit in den Plazentomen des Rindes der programmierte Zelltod in ganz erheblichem Ausmaß stattfindet.

### **6.3.3.2. Diskussion der Ergebnisse**

Das primäre Interesse der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen galt den aus histomorphologischen Untersuchungen bekannten, mit Zelluntergang einhergehenden Vorgängen in den Plazentomen des Rindes:

- 1) der Degeneration invasiver Trophoblastriesenzellen (BNC = binuclear cells; TGC = trophoblast giant cells) bzw. der fetomaternalen Hybridzellen aus Trophoblastriesenzellen und Karunkelepithezellen (WOODING und WATHES, 1980; WOODING, 1992; KLISCH et al., 1999)

- 2) dem ab dem ca. 250. Graviditätstag einsetzenden sukzessiven Abbau des Karunkelepithels (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989); sowie
- 3) der erheblichen Reduktion des Anteils der Riesenzellen unter den Trophoblastzellen zum Zeitpunkt der Geburt (GROSS et al., 1991).

Aufgrund der Untersuchungen von WOODING und WATHES (1980), WOODING (1992) und KLISCH et al. (1999) sowie aufgrund eigener Beobachtungen in ISEL-gefärbten Schnitten ist anzunehmen, daß es sich bei einem erheblichen Teil der im Trophoblasten nachgewiesenen ISEL-positiven Zellen um degenerierende Trophoblastriesenzellen bzw. um Hybridzellen aus Trophoblastriesenzellen und Karunkelepithelzellen gehandelt haben dürfte. Daher kann angenommen werden, daß die Trophoblastriesenzellen nach Erfüllung ihrer bisher erst teilweise identifizierten Aufgaben apoptotisch untergehen.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß allen im Trophoblasten lokalisierten apoptotischen Ereignissen der programmierte Zelltod von Trophoblastzellen zugrunde liegt. Da nach bisher vorliegenden Informationen beim Rind - im Gegensatz zu Schaf und Ziege - nur je eine Trophoblastriesenzelle mit einer Uterusepithelzelle fusioniert (WOODING, 1992), müsste dies bei anschließender Degeneration der Hybridzelle zum Verlust der beiden ursprünglich beteiligten Zelltypen im Verhältnis 1:1 führen. Da aber - wie die in Kapitel V dargestellten Untersuchungen zum proliferativen Verhalten verschiedener Zellkategorien in den Plazentomen gezeigt haben - die proliferative Aktivität des Karunkelepithels deutlich höher ist als die des Trophoblasten, ist anzunehmen, daß ein erheblicher Anteil der Karunkelepithelzellen ohne eine Fusion mit Trophoblastriesenzellen degeneriert, abschilfert und letztendlich im Trophoblasten phagozytiert wird. Lichtmikroskopisch können tatsächlich - wie bereits in den Kapiteln IV und V beschrieben - abschilfernde Karunkelepithelzellen beobachtet werden. Bereits BJÖRKMAN (1969) beschrieb in seinen elektronenmikroskopischen Studien das häufige Auftreten von Karunkelepithelzellen in unterschiedlichen Stadien der Degeneration, wobei die von ihm beschriebenen morphologischen Charakteristika mit denen der Apoptose im Einklang stehen. Die Tatsache, daß viele der vom Karunkelepithel abschilfernden Zellen bzw. Zelltrümmer Ki67-Antigen-positiv reagieren (s. Kapitel V), deutet auf eine im Durchschnitt sehr kurze Lebensdauer und einen hohen Umsatz in dieser Zellpopulation hin. Auch BJÖRKMAN (1969) schloß aus seinen Studien, daß der Zellumsatz im Karunkelepithel deutlich höher ist als im Trophoblasten. Somit dürfte ein ganz erheblicher Anteil der im Trophoblasten nachgewiesenen ISEL-positiven Zellreste dem Karunkelepithel entstammen. Offensichtlich gehen im Karunkelepithel Zellproliferation und -untergang deutlich über das für Wachstum bzw. Gewebeumbildungen ("tissue remodelling") erforderliche Ausmaß hinaus. BJÖRKMAN (1969) schrieb den degenerierenden Zellen des Plazentoms zusätzlich eine nutritive Funktion im Sinne einer Histiotrophe zu - eine Hypothese, welche durch die eigenen Untersuchungen weiter gestützt wird.

Die Abflachung des Karunkelepithels und die Reduktion der Zellzahl pro Fläche ist ein allmählicher Prozeß, der bereits um den ca. 250.-260. Graviditätstag beginnt und sich zur Geburt

hin zunehmend beschleunigt (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989). Mit Ausnahme der oberflächlichen Bereiche der Plazentome findet das fast komplette Verschwinden des Karunkelepithels allerdings erst im kurzen Zeitintervall zwischen dem 270. Graviditätstag und der Geburt statt (BJÖRKMAN, 1954; eigene Beobachtungen). Die Ergebnisse der zur proliferativen Aktivität in den Plazentomen durchgeführten Untersuchungen (s. Kapitel V) sprechen nicht für ein Nachlassen der Proliferation im Karunkelepithel als Ursache für dessen Abbau in der Spätgravidität. Bei einem der Tiere aus der Gruppe der 270 Tage trächtigen Kühe wurden gelegentlich ganze Gruppen ISEL-positiver, morphologische Charakteristika der Apoptose aufweisende Karunkelepithelzellen beobachtet. Der tendenzielle Anstieg der Proliferation und vermutlich auch der Apoptosehäufigkeit im Karunkelepithel läßt eher den Schluß zu, daß sich der Zellumsatz im Karunkelepithel in der Spätgravidität zunehmend beschleunigt, wobei die trotz gesteigerter Zellneubildung zu beobachtende Reduktion des Karunkelepithels aus einer Verschiebung des Gleichgewichts der Zelldynamik zugunsten der Apoptose resultiert. Der rasche apoptotische Untergang direkt aus der Proliferation heraus wurde für Zellen beschrieben, welche in Abwesenheit bestimmter Wachstumsfaktoren einem proliferativen Stimulus ausgesetzt waren (EVAN et al., 1992).

Nach der eigenen Arbeitshypothese könnte der dramatische präpartale Rückgang in der Zahl der offensichtlich progesteronproduzierenden Trophoblastriesenzellen (TGC) dem lokalen Gestagenentzug unmittelbar vor und unter der Geburt dienen. Ein Ziel der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen war es daher, Informationen über die Bedeutung der Apoptose für das Verschwinden der TGC zu erarbeiten. Am Tag 270 waren diesbezüglich noch bei keinem der drei untersuchten Tiere besondere Beobachtungen zu machen. Unter der Geburt war dagegen bei allen drei untersuchten Tieren die aus der Literatur bekannte deutliche Reduktion in der TGC-Anzahl erkennbar. Die vereinzelt verbliebenen TGC zeigten sich morphologisch überwiegend unauffällig und wiesen kaum ISEL-positive Reaktionen auf. Somit konnte der dem Verschwinden der TGC zugrundeliegende Vorgang in den eigenen Untersuchungen nicht direkt verfolgt werden. Offensichtlich war die Reduktion der TGC-Zahl zum Zeitpunkt der Probenentnahme unmittelbar nach Entwicklung des Fetus - d.h. ca. 2-4 Stunden nach dem äußerlich erkennbaren Einsetzen der Geburt - bereits weitgehend abgeschlossen. Möglicherweise handelt es sich bei den unter der Geburt gehäuft beobachteten, diffus über den Trophoblasten verstreuten „apoptotic bodies“ um Überreste dieses Prozesses.

Bei der quantitativen Untersuchung der Häufigkeit apoptotischer Ereignisse zwischen dem 150. Graviditätstag und der Geburt ergab sich – offensichtlich bedingt durch den niedrigen Stichprobenumfang und die teilweise erhebliche Streuung der Meßwerte zwischen den Tieren innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen – kein signifikanter Einfluß des Untersuchungsstadiums, obwohl zwischen den Mittelwerten der Versuchsgruppen teilweise erhebliche Differenzen bestanden. Tendenziell lassen die Mittelwerte einen Anstieg der Apoptose-Häufigkeit über den Beobachtungszeitraum erkennen, welcher in der Spätgravidität im Einklang mit der postulierten Steigerung des Zellumsatzes im Karunkelepithel steht. Aus diesem kontinuierli-

chen Anstieg der Apoptose-Häufigkeit ragt die Gruppe der 220 Tage graviden Tiere heraus, in welcher im Mittel höhere Werte gemessen wurden als zu allen anderen Untersuchungsstadien. Ob diese Beobachtung ein biologisch relevantes Ereignis – wie z.B. verstärkte Umbauprozesse innerhalb der Plazentome – widerspiegelt, ist unklar. Auffällig ist jedoch, daß dieser „Ausreißer“ im Verlauf der Apoptosehäufigkeit zeitlich mit dem Abfall der plazentaren Östrogenproduktion, dem steilen Anstieg der plazentaren Progesteronsynthese (s. Kapitel III) sowie dem Tiefpunkt der Proliferation im Karunkelstroma (s. Kapitel V) zusammenfällt.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen insgesamt, daß die Apoptose in den Plazentomen des Rindes nicht nur in der Spätgravidität und unter der Geburt, wo ein Zusammenhang mit der „Plazentareifung“ unterstellt werden kann, sondern bereits ab der Graviditätsmitte in erheblichem Ausmaß nachweisbar ist. Offensichtlich dienen die während der Gravidität beobachteten apoptotischen Zelluntergänge physiologischen Prozessen wie der Eliminierung überalterter TGC, der Kompensation der destruktiven Aktivität der schwach invasiven TGC und den permanenten, auf eine ständige Intensivierung des fetomaternalen Stoffaustausches zielenden Gewebsumbildungen ("tissue remodelling"). Möglicherweise stellen die im Trophoblasten resorbierten Überreste apoptotischer Karunkelepithelzellen einen wichtigen Faktor in der Bereitstellung von Nährstoffen für das fetale Kompartiment dar.

### 6.3.4. Literatur

- AL-LAMKI RS, SKEPPNER JN, LOKE YW, KING A, BURTON GJ (1998). Apoptosis in the early human placental bed and its discrimination from necrosis using in-situ DNA ligation technique. *Hum. Reprod.* 13, 3511-3519
- AMEISEN JC (1996). The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278-1279
- AMSTERDAM A, DANTES A, SELVARAJ N, AHARONI D (1997). Apoptosis in steroidogenic cells: structure function analysis. *Steroids* 62, 207-211
- AMSTERDAM A, DANTES A, HOSOKAWA K, SCHERE-LEVY CP, KOTSUJI F, AHARONI D (1998). Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids* 63, 314-318
- ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH (1990). The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608
- BEN-SASSON SA, SHERMAN Y, GAVRIELI Y (1995). Identification of dying cells – in situ staining. *Methods Cell Biol.* 46, 29-39
- BERGES RR, FURUYA Y, REMINGTON L, ENGLISH HF, JACKS T, ISAACS JT (1993). Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8910-8914
- BJÖRKMAN NH (1954). Morphological and histochemical studies on the bovine placentome. *Acta Anat.* 22 (Suppl.), 1-99
- BJÖRKMAN NH (1969). Light and electron microscopic studies on cellular alteration in the bovine placentome. *Anat. Rec.* 163, 17-30
- BILLIG H, FURUTA I, HSUEH AJ (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133, 2204-2212
- BILLIG H, FURUTA I, RIVIER C, TAPANAINEN J, PARVINEN M, HSUEH AJW (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136, 5-12
- BILLIG H, CHUN S-Y, EISENHAUER K, HSUEH AJW (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum. Reprod. Update* 2, 103-117
- BLOBEL GA, ORKIN SH (1996). Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1687-1694
- BURLINGAME RW, BOEY ML, STARKEBAUM G, RUBIN RL (1994). The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 94, 184-192
- BURSCH W, TAPER HS, LAUER B, SCHULTE-HERMANN R (1985). Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hypoplasia. *Virchows Arch. Cell Pathol.* 50, 153-166
- COATES PJ, HALES SA, HALL PA (1996). The association between cell proliferation and apoptosis: studies using the cell cycle associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J. Pathol.* 178, 71-77
- DEMIR R, DEMIR AY, ERBENGI T (1995). Intranuclear inclusion bodies in placental septal cells and their possible relation in placental cell degeneration. *J. Obstet. Gynaecol.* 15, 88-97
- DESBARATS L, SCHNEIDER A, MÜLLER D, BÜRGIN A, EILERS M (1996). Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells. *Experientia* 52, 1123-1129
- DIXON WJ (1993). BMDP statistical software manual. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 1993

- DUVALL E, WYLLIE AH, MORRIS G (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56, 351-358
- EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS, LITTLEWOOD TD, LAND H, BROOKS M, WATERS CM, PENN LZ, HANCOCK DC (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128
- FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207-2216
- FOTEDAR R, DIEDERICH L, FOTEDAR A (1996). Apoptosis and the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* 2, 147-163
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501
- GERSCHENSON LE, ROTELLO RJ (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6, 2450-2455
- GOSDEN R, SPEARS N (1997). Programmed cell death in the reproductive system. *Br. Med. Bull.* 52, 644-661
- GROSS TS, WILLIAMS WF, RUSSEK-COHEN (1991). Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta* 12, 27-35
- GU Y, JOW GM, MOULTON BC, LEE C, SENSIBAR JA, PARK-SAGE OK, CHEN TJ, GIBORI G (1994). Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 135, 1272-1279
- HAANEN C, VERMES I (1996). Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 64, 129-133
- HUGHES FM, GOROSPE WC (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129, 2415-2422
- JACOBSON MD, BURNE JF, RAFF MC (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13, 1899-1910
- JUENGEL JL, GARVERICK HA, JOHNSON AL, YOUNGQUIST RS, SMITH MF (1993). Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132, 249-254
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257
- KING KL, CIDLOWSKI JA (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 601-617
- KLISCH K, PFARRER C, SCHULER G, HOFFMANN B, LEISER R (1999). Tripolar acytokinetic mitosis and formation of fetomaternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multicellular cells. *Anat. Embryol.* 200, 229-237
- KOKAWA K, SHIKONE T, NAKANO R (1998). Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* 19, 21-26
- KYPRIANOU N, ISAACS JT (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122, 552-562
- LAZEBNIK YA, COLE S, COOKE CA, NELSON WG, EARNSHAW WC (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 123, 7-22
- LIU Y, MULLBACHER A, WARING P (1989). Natural killer cells and cytotoxic T cells induce DNA fragmentation in both human and murine target cells in vitro. *Scand. J. Immunol.* 30, 31-37

- MAJNO G, JORIS I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15
- McCARTHY NJ, EVAN GI (1998). Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 36, 259-278
- MOHAN C, ADAMS S, STANIK V, DATTA SK, (1993). Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J. Exp. Med.* 177, 1367-1381
- MOR G, GUTIERREZ LS, ELIZA M, KAHYAOGU F, ARICI A (1998). Fas-fas ligand system induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40, 89-94
- NELSON DM (1996). Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta* 17, 387-391
- PALUMBO A, YEH J (1994). In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 51, 888-895
- PHILLIPS TA, NI J, PAN G, RUBEN SM, WEI YF, PACE JL, HUNT JS (1999). TRAIL (APO-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J. Immunol.* 162, 6053-6059
- POLLARD JW, PACEY J, CHENG SV, JORDAN EG (1987). Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell Tissue Res.* 249, 533-540
- RAFF MC (1992). Social control on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400
- REN Y, SAVILL J (1998). Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death Differ.* 5, 563-568
- ROTELLO RJ, LIEBERMAN RC, LEPOFF RB, GERSCHENSON LE (1992). Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am. J. Pathol.* 140, 449-456
- RUNIC R, LOCKWOOD CJ, LACHAPELLE L, DIPASQUALE B, DEMOPOULOS RI, KUMAR A, GULLER S (1998). Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 660-666
- SAVILL J (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br. Med. Bull.* 53, 491-508
- SAVILL JS, WYLLIE AH, HENSON JE, WALPORT PM, HENSON PM, HASLETT C (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J. Clin. Invest.* 83, 865-875
- SCHOON H-A (1989). Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität. *Vet. med. Habil.-Schrift Hannover*
- SCHULZE-OSTHOFF K, WALCZAK H, DROGE W, KRAMMER PH (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.* 127, 15-20
- SCHWARTZMAN RA, CIDLOWSKI JA (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14, 133-151
- SINHA HIKIM AP, RAJAVASHISTH TB, SINHA HIKIM I, LUE Y, BONAVERA JJ, LEUNG A, WANG C, SWERDLOFF RS (1997). Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol. Reprod.* 57, 1193-1201
- SMITH SC, BAKER PN, SYMONDS EM (1997a). Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177, 57-65
- SMITH SC, BAKER PN, SYMONDS EM (1997b). Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177, 1395-13401
- STELLER H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449

- TABIBZADEH S (1995). Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. *Hum. Reprod. Update* 1, 303-323
- TRUMP BF, BEREZESKY IK, CHANG SH, PHELPS PC (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.* 25, 82-88
- UCKAN D, STEELE A, CHERRY B, WANG BY, CHAMIZO W, KOUTSONIKOLIS A, GILBERT-BARNES E, GOOD RA (1997). Trophoblast express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 655-662
- UCKER DS (1991). Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development. *New. Biol.* 3, 103-109
- VAUX DL, STRASSER A (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2239-2244
- VERMES I, HAANEN C, STEFFKENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C (1995). A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods*
- WHITE E (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10, 1-15
- WIMSATT WA (1951). Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am. J. Anat.* 89, 233-281
- WOICKE J, SCHOON H-A, HEUWIESER W, SCHULZ L-C, GRUNERT E (1986). Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. *J. Vet. Med. A* 33, 660-667
- WOODING FBP (1992). Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13, 101-113
- WOODING FBP, WATHES DC (1980). Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fert.* 59, 425-430
- WYLLIE AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556
- WYLLIE AH (1993). Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br. J. Cancer* 67, 205-208
- WYLLIE AH (1997). Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.* 52, 451-465
- WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306
- WYLLIE AH, MORRIS RG, SMITH AL, DUNLOP D (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77
- WYLLIE AH, ARENDS MJ, MORRIS RG, WALKER SW, EVAN G (1992). The apoptosis endonuclease and its regulation. *Sem. Immunol.* 4, 389-397
- ZHENG J, FRICKE PM, REYNOLDS LP, REDMER DA (1994). Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 51, 623-632



**KAPITEL VII**

**ZUSAMMENFASSENDEN SCHLUSSFOLGERUNGEN  
UND AUSBLICKE**

## 7. Zusammenfassende Schlußfolgerungen und Ausblicke

Die Bedeutung der plazentaren Östrogenproduktion beim Rind war bisher weitgehend unklar, da einerseits den in großen Mengen produzierten konjugierten Östrogenen keine Funktion zuzuordnen war, andererseits mit Ausnahme der Endphase der Gravidität keine gesicherten Informationen über mögliche Zielorgane der plazentaren Östrogene vorhanden waren. Ebenso unklar war die Bedeutung der plazentaren Progesteronproduktion, da sie nur temporär und marginal zu den maternalen Plasmakonzentrationen beiträgt. Durch die eigenen Untersuchungen konnten einige Fragen hinsichtlich Synthese und Funktion der plazentaren Steroide beim Rind ganz oder zumindest teilweise beantwortet werden. Darüber hinaus ergaben sich aber auch eine Reihe neuer Fragestellungen und Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen. In den Inkubationen von Kotyledonen-Homogenaten mit  $^3\text{H}$ -Pregnenolon konnte eindeutig der  $\Delta 5$ -Syntheseweg als Hauptroute der plazentaren Östrogenbiosynthese identifiziert werden. Diese Inkubationsversuche ließen ebenso wie die Messungen der Östrogengewebekonzentrationen in den Kotyledonen Estron als primäres Hauptprodukt der plazentaren Östrogensynthese erkennen. Weiterhin wurde in den *in vitro*-Inkubationen die vom Schaf bekannte, auf einer drastischen Steigerung der plazentaren P450c17 $\alpha$ -Aktivität basierende präpartale Umstellung im plazentaren Steroidstoffwechsel für das Rind bestätigt, wobei deren Bedeutung im Rahmen der Geburtsinduktion beim Rind aufgrund der bis zum Ende der Gravidität dauernden Aktivität des Corpus luteum noch unklar ist. Aufgrund der Insuffizienz der C17,20-Lyase-Aktivität auf dem  $\Delta 4$ -Syntheseweg beruht der steile präpartale Östrogenanstieg bzw. Progesteronabfall nicht auf einer direkten Umwandlung von Progesteron in Östrogene. Der Progesteronabfall resultiert neben einer Steigerung der Metabolisierung via 17 $\alpha$ -Hydroxylierung vermutlich auch aus einem Entzug des Vorläufers Pregnenolon, welches unter der Geburt im Rahmen der deutlich gesteigerten Östrogensynthese verstärkt in den  $\Delta 5$ -Syntheseweg eingeschleust wird. Inkubationsversuche mit  $^3\text{H}$ -Pregnenolon und die Messungen der Progesterongewebekonzentrationen lassen übereinstimmend keine Reduktion der plazentaren Progesteronproduktion in der Spätphase der Gravidität erkennen. Dies wurde bisher aufgrund der Tatsache postuliert, daß nach Ausschaltung der Gelbkörperfunktion um den 180.-200. Graviditätstag die Gravidität in vielen Fällen bis zum ca. 240. Trächtigkeitstag aufrecht erhalten wurde, danach aber vorzeitig endete. Die eigenen Ergebnisse sprechen dafür, daß dieser Beobachtung eher ein gesteigerter Progesteronbedarf in der Spätgravidität als ein Nachlassen der plazentaren Progesteronsynthese zugrunde liegt.

In den Untersuchungen zur Bildung konjugierter Östrogene konnten vom 150. Graviditätstag bis zur Geburt eindeutig die Kotyledonen - die Stätte der Östrogenproduktion selbst - als Hauptort der Sulfokonjugation ermittelt werden. Die der Sulfokonjugation im Trophoblasten zugrunde liegenden funktionellen Zusammenhänge sind zur Zeit unklar. Möglich erscheinen die Aktivierung konjugierter Östrogene in Sulfatase-exprimierenden Zielzellen in den Karunkeln bzw. den Kotyledonen selbst (Sulfatase-Pathway; parakrine Wirkung) sowie eigenständige, von nukleären Östrogenrezeptoren unabhängige Wirkungen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß die Sulfokonjugation im Sinne eines autokrinen Regelmechanismus die Ver-

fügbarekeit freier Östrogene in den östrogenproduzierenden Zellen selbst begrenzt. Eine Klärung dieser Fragen sowie der biologischen Bedeutung der gemeinsamen Expression von Sulfotransferase und Sulfatase innerhalb von Karunkeln und Kotyledonen könnte anhand der Enzymlokalisation auf zellulärer Ebene sowie anhand geeigneter Zellkulturexperimente erfolgen. Der signifikante Abfall der OS-Aktivität unter der Geburt spricht gegen eine früher postulierte Bedeutung der OS für den steilen präpartalen Anstieg freier Östrogene im Sinne einer verstärkten Hydrolyse im fetalen Kompartiment sequestrierter konjugierter Östrogene.

In den immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von Steroidrezeptoren konnten in den maternalen Anteilen der Plazentome eindeutig Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER, PR) nachgewiesen werden. Unterstellt man, daß die nachgewiesenen Rezeptoren nicht nur vorhanden, sondern auch biologisch aktiv sind, können die Karunkelstroma- und Karunkelepithelzellen als Zielzellen plazentarer Östrogene angesehen werden. Hinsichtlich der PR-Expression im Karunkelstroma kann aufgrund der räumlichen Nähe zum Trophoblasten und des zum Teil unmittelbaren Kontaktes der Karunkelstromazellen mit dem Trophoblasten über die durch die Trophoblastriesenzellen geschaffenen Lücken im Karunkelepithel angenommen werden, daß die Karunkelepithelzellen eher dem Einfluß des plazentaren als des lutealen Progesterons unterliegen. Die eigenständige Bedeutung der plazentaren Progesteronproduktion besteht vermutlich in der Erzeugung hoher lokaler Konzentrationen, welche für den Eintritt bestimmter Progesteronwirkungen erforderlich sein könnten. Für ein weitergehendes Verständnis der Effekte plazentarer Steroide sind Untersuchungen zum Spektrum der vorhandenen Rezeptortypen (Östrogenrezeptor: ER $\alpha$ , ER $\beta$ ; Progesteronrezeptor: PR-A, PR-B) erforderlich. Die Expression von Steroidrezeptoren in Gefäßzellen bzw. gefäßassoziierten Zellen der Karunkeln läßt vermuten, daß plazentare Steroide dort eine Rolle bei der Angiogenese und/oder der Regulation des Blutflusses spielen.

Die mittels der quantitativen immunhistologischen Erfassung der Ki67-Expression erhaltenen Daten korrelieren gut mit Ergebnissen früherer Studien zur Gewichtsentwicklung von Kotyledonen, Karunkeln bzw. Plazentomen sowie mit lichtmikroskopischen Beobachtungen zur mitotischen Aktivität. Dies spricht dafür, dass mit der eigenen Methode physiologisch relevante Ergebnisse zur Zellproliferation in den Plazentomen erzielt wurden. Insgesamt deuten die Ergebnisse hinsichtlich der Proliferation in den verschiedenen Zellkategorien darauf hin, daß sich das Größenwachstum der Plazentome bereits nach dem 150. Graviditätstag erheblich verlangsamt. Der Wiederanstieg der Proliferation im Karunkelstroma in der Spätphase der Gravidität korreliert offensichtlich mit der Verbreiterung der maternalen Septen kurz vor der Geburt. Die ER-Expression der Karunkelstromazellen kann als deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung plazentarer Östrogene bei der Regulation des Wachstums des Karunkelstromas gewertet werden. Die auffällige Parallelität zwischen dem Verlauf des Anteils Ki67-Antigenpositiver Zellen im Karunkelstroma und den Estrongewebekonzentrationen in den Plazentomen deutet darauf hin, daß die Funktion der plazentaren Östrogene bei der Stimulation des Wachstums über eine rein permissive Rolle hinausgehen könnte. Hinsichtlich der überaus starken, permanenten Proliferation der ebenfalls ER-exprimierenden Karunkelepithelzellen

kann angenommen werden, daß sie erheblich über den sich aus Wachstum und Gewebeumbildungen ergebenden Bedarf hinausgeht. Möglicherweise stellen die degenerierenden Zellen des Karunkelepithels einen erheblichen Faktor in der Bereitstellung von Nährstoffen für das fetale Kompartiment dar, vergleichbar den Verhältnissen in der Frühgravidität, in welcher der Konzeptus durch ein den Uterindrüsen entstammendes, als Uterinmilch, Embryotrophe bzw. Histiotrophe bezeichnetes, zum großen Teil aus Zelltrümmern bestehendes Sekretionsprodukt der Uterindrüsen ernährt wird. Die Ergebnisse zur Proliferation im Karunkelepithel zeigen, daß der um den ca. 250. Graviditätstag einsetzenden allmählichen Abflachung des Karunkelepithels kein Nachlassen der proliferativen Aktivität zugrunde liegt. Im Zusammenhang mit den hinsichtlich der Apoptose erhaltenen Ergebnissen ist eher anzunehmen, daß sich die Proliferation zur Geburt hin noch erhöht, wobei die präpartale Abflachung und das mit Ausnahme der oberflächlichen Bereiche der Plazentome erst unter der Geburt nachzuweisende vollständige Verschwinden des Karunkelepithels aus einem gesteigerten Zellumsatz bzw. aus einer finalen Erschöpfung des Zellproliferationssystems resultiert.

Die Ergebnisse zum Auftreten der Apoptose in den Plazentomen deuten an, daß der programmierte Zelltod (PCD) dort in erheblichem Ausmaß stattfindet und eine wichtige physiologische Rolle bei deren Differenzierung und Funktionen spielt. So erscheint beispielsweise ein geordneter Aufbau des Karunkelepithels angesichts dessen hoher, teilweise wachstumsunabhängiger Proliferation ohne PCD kaum vorstellbar. Auch die schwach invasiven Trophoblastriesenzellen gehen nach Erfüllung ihrer bisher unzureichend charakterisierten Aufgaben offensichtlich apoptotisch zugrunde. Interessant erscheint die Frage, zu welchem Zeitpunkt ihres „Lebenslaufes“ das apoptoseinduzierende Signal gesetzt wird. Hierzu sind Untersuchungen unter Verwendung von frühen Apoptosemarkern erforderlich.

Das präpartale Verschwinden der Trophoblastriesenzellen (TGC), dem wahrscheinlich auch ein programmierter Zelltod zugrunde liegt, konnte in den eigenen Untersuchungen nicht verfolgt werden, da das entsprechende Zeitfenster nicht erfasst wurde. Die Tatsache, daß in den Plazentomen der 270 Tage graviden Tiere noch keinerlei Reduktion des TGC-Anteils im Trophoblasten erkennbar war, spricht dafür, daß das Verschwinden der TGC sehr kurzfristig vor der Geburt stattfindet. Eine Klärung dieses Phänomens könnte anhand von Probenmaterial erfolgen, welches zum Zeitpunkt der beginnenden Luteolyse entnommen wird.

Konkrete Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Nachgeburtsverhaltung beim Rind und einem Mangel an plazentaren Östrogenen – wie früher häufig postuliert – ergaben sich in den eigenen Untersuchungen nicht. Eine Bedeutung der plazentaren Östrogene für die Plazentareifung erscheint allerdings in der präpartalen Phase möglich, falls Östrogene an der Stimulation des finalen Verschwindens des Karunkelepithels beteiligt sein sollten. Aufgrund der Tatsache, daß Progesteronrezeptoren unter der Geburt im Karunkelstroma in hohem Ausmaß vorhanden sind, erscheint es aber eher möglich, daß Progesteron in Fällen von unvollständigem lokalem Entzug eine Rolle in der Entstehung von Geburtsstörungen und Nachgeburtsverhaltungen spielt.

**KAPITEL VIII**

**ZUSAMMENFASSUNG**

## 8. Zusammenfassung

Im breiten Spektrum der von der Plazenta des Rindes gebildeten Mediatoren finden sich wie bei vielen Säugern Steroide, hauptsächlich Östrogene und Progesteron. Zur biologischen Bedeutung der plazentaren Östrogenproduktion des Rindes lagen bisher kaum gesicherte Informationen vor. Ebenso unklar war die Funktion der plazentaren Progesteronproduktion des Rindes, da das Corpus luteum graviditatis über die gesamte Trächtigkeit die Hauptprogesteronquelle darstellt, während die Plazenta nur marginal und temporär zwischen dem ca. 180. und 240. Graviditätstag („plazentare Progesteronphase“) zu den peripheren maternalen Progesteronspiegeln beiträgt. Ziel der eigenen Arbeit war es, durch die *in vitro*-Charakterisierung der plazentaren Steroidsynthese, die Messung lokaler Gewebekonzentrationen plazentarer Steroide und die Untersuchung der Steroidrezeptorexpression sowie der Zelldynamik Informationen über eine mögliche Rolle plazentarer Steroide als lokale Regulatoren von Wachstum, Differenzierung und Funktionen der Plazentome zu erhalten.

Ziel der zunächst durchgeführten Inkubationen von Homogenaten aus Kotyledonengewebe mit  $^3\text{H}$ -markierten C21- (Pregnenolon, Progesteron und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron) bzw. C19-Präkursoren (Dehydroepiandrosteron) war es, die plazentare Steroidsynthese unbeeinflusst von peripheren Metabolisierungs- und Ausscheidungsvorgängen zu charakterisieren und Informationen über die Bedeutung der beiden möglichen Synthesewege ( $\Delta 4$ - bzw.  $\Delta 5$ -Syntheseweg) zu gewinnen. Diese Untersuchungen wurden am 220. Graviditätstag (T220; Mitte der „plazentaren Progesteronphase“), am 270. Graviditätstag (T270; Zustand nach der „plazentaren Progesteronphase“ und bei herannahender Geburt) sowie unter der Geburt (G) an jeweils drei Tieren durchgeführt. Die Analyse der gebildeten Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC. Die Ergebnisse zeigten, daß die Plazenta des Rindes alle erforderlichen Enzymsysteme zur Synthese von Östrogenen ausgehend von Pregnenolon besitzt und hierbei zu allen untersuchten Stadien fast ausschließlich der  $\Delta 5$ -Syntheseweg beschriftet wird. Als Hauptöstrogen wurde freies Estron identifiziert. Die Bildung anderer Östrogene in signifikanten Mengen konnte nicht nachgewiesen werden. Der  $\Delta 4$ -Syntheseweg endete dagegen stets auf der Stufe des  $17\alpha$ -Hydroxyprogesterons, welches kaum weiter umgewandelt wurde. Qualitativ und quantitativ waren zwischen T220 und T270 keine erheblichen Unterschiede feststellbar. Die maximalen Östrogenbildungsraten aus Pregnenolon betragen  $5.2 \pm 2.7\%$  (T220) bzw.  $6.2 \pm 0.7\%$  (T270). Als entsprechende Progesteronbildungsraten wurden  $42.5 \pm 3.9\%$  bzw.  $53.8 \pm 2.2\%$  gemessen. Unter der Geburt kam es durch eine Aktivitätssteigerung der  $17\alpha$ -Hydroxylase-C $17,20$ -Lyase (P450c $17\alpha$ ) zu einem dramatischen Anstieg der plazentaren Östrogenproduktion aus Pregnenolon ( $61.0 \pm 4.7\%$ ), während Progesteron unter den Metaboliten kaum noch nachweisbar war ( $< 5.0\%$ ). Somit wurden für das Rind dieselben präpartalen Veränderungen im plazentaren Steroidstoffwechsel wie beim Schaf bestätigt.

Zur Darstellung der Bildung von Estronsulfat, dem Hauptprodukt der plazentaren Östrogen-synthese *in vivo*, wurde ein *in vitro*-Testsystem unter Verwendung von Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe als Probenmaterial und  $^3\text{H}$ -Estron als Substrat etabliert.

Als Ursache des Widerspruchs zwischen der vorwiegenden Produktion konjugierter Östrogene *in vivo* und der ausschließlichen Bildung von freiem Estron *in vitro* (s.o.) konnten dabei die hohen Östrogensulfatase- (OS-) Aktivitäten des Probenmaterials identifiziert werden. Die OS wurde durch Inkubationsversuche mit  $^3\text{H}$ -Estronsulfat als Substrat in die Untersuchungen mit einbezogen, da unter OS-Einwirkung die konjugierten und somit rezeptorinaktiven Östrogene wieder in freie, aktive Formen überführt werden können. Mit den etablierten *in vitro*-Testsystemen wurden Trächtigkeitsprofile der Östrogensulfotransferase (OST)- bzw. OS-Aktivität in Kotyledonen- bzw. Karunkelhomogenaten vom 150. Graviditätstag bis zur Geburt erstellt. Die Probenentnahme erfolgte an T150, T220, T240, T270 und G ( $n=3-4$  Tier/Gruppe). Die Aktivitäten von OST und OS waren in Kotyledonen- und Karunkelgewebe nachweisbar, wobei sich die vergleichsweise höheren OST-Aktivitäten im fetalen, die höheren OS-Aktivitäten im maternalen Teil der Plazentome fanden ( $p$  jeweils  $< 0.01$ ). Für beide Enzyme konnten keine signifikanten Veränderungen in Abhängigkeit von der Trächtigkeitsdauer nachgewiesen werden. Unter der Geburt war die Aktivität der OS, nicht jedoch der OST, in Kotyledonen und Karunkeln signifikant erniedrigt ( $p < 0.05$ ). Durch Inkubationsversuche mit subzellulären Fraktionen konnte in Kotyledonen und Karunkeln die OST-Aktivität nahezu ausschließlich im Zytosol lokalisiert werden, während die höchsten OS-Aktivitäten in den Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen gemessen wurden.

An T150, T220, T240 und T270 wurden in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe punktuelle Bestimmungen endogener Konzentrationen an Östrogenen (HPLC-RIA) bzw. Progesteron (RIA) durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, daß Gesamtestron (frei + konjugiert) in Kotyledonen- und Karunkelgewebe gleichermaßen in deutlich höheren Konzentrationen vorliegt als im peripheren maternalen Plasma. Der Verlauf der Gesamtestronkonzentrationen in den Plazentomen läßt eine Erniedrigung der plazentaren Östrogenproduktion von T150 zu T220 erkennen, gefolgt von einem deutlichen Anstieg zu T270. Die Gesamtestradiol- $17\beta$ -Konzentrationen in den Plazentomen wiesen einen ähnlichen Verlauf auf wie die Estronkonzentrationen, jedoch auf einem ca. 10fach niedrigeren Niveau. Gesamtestradiol- $17\alpha$  war in den Plazentomen nicht bzw. nur in Spuren meßbar. Die kotyledonären Progesteronkonzentrationen stiegen von Werten  $\leq 10$  pmol/g Gewebe an T150 auf  $39.4 \pm 19.0$  pmol/g Gewebe an T220 erheblich an und blieben bis T270 auf gleichbleibend hohem Niveau, während die karunkulären Progesteronkonzentrationen über den beobachteten Zeitraum 10 pmol/g Gewebe kaum überstiegen.

Wie oben dargelegt, werden plazentare Östrogene in unmittelbarer Nähe ihrer Produktionsstätte durch Sulfokonjugation inaktiviert. Abgesehen von einer möglichen Aktivierung in entfernten Zielorganen läßt dies eine Rolle als lokale Mediatoren vermuten. Um potenzielle Zielzellen plazentarer Steroide in den Plazentomen selbst zu identifizieren, wurden diese immunhistologisch auf das Vorkommen von Progesteron- und Östrogenrezeptoren (PR, ER) untersucht. Diese Untersuchungen wurden an T150, T220, T240, T270 und G durchgeführt ( $n=3$  Tiere pro Gruppe). PR waren ausschließlich im Karunkelstroma und dort hauptsächlich in den Fibrozyten-ähnlichen Bindegewebszellen nachweisbar (Primärantikörper: 10A9).

Daneben fanden sich positive Reaktionen auch in Kapillarperizyten. Ausschließlich unter der Geburt wurden vereinzelte Signale in den Wänden kleinerer Karunkelarterien beobachtet. Der Anteil PR-positiver Karunkelstromazellen stieg signifikant von  $51.8 \pm 2.6\%$  an T150 auf  $56.2 \pm 5.6\%$  an T270 ( $p < 0.05$ ) und betrug  $58.1 \pm 1.8\%$  unter der Geburt.

Für den immunhistologischen Nachweis des ER wurden vier verschiedene monoklonale Primärantikörper (mPAK) eingesetzt, von denen jeweils zwei gegen den N-terminalen (mPAK AER314 und 1D5) bzw. C-terminalen Bereich (mPAK AER311 und HT277) des ER-Moleküls gerichtet waren. Alle vier mPAK färbten übereinstimmend spezifisch in einem als positive Kontrolle eingesetzten Endometrium eines Kalbes Kerne und Zytoplasma der Drüsenepithel- sowie der luminalen Epithelzellen und einen Teil der Stromazellkerne. Im Gegensatz zum einheitlichen Reaktionsmuster im Endometrium erzeugten die vier mPAK in den Plazentomen unterschiedliche Reaktionsmuster in Abhängigkeit von der Lokalisation des jeweiligen Epitops im ER-Molekül. Während sich unter Verwendung der C-terminal gerichteten mPAK spezifische Signale in Karunkelepithel- und Karunkelstromazellen fanden, wurden mit den beiden N-terminalen mPAK positive Reaktionen ausschließlich im Karunkelstroma beobachtet. Mögliche Ursachen für die divergierenden Reaktionsmuster sind unterschiedliche Kreuzreaktionen der eingesetzten mPAK mit ER-Varianten bzw. mit dem vor kurzem charakterisierten ER $\beta$ , oder die Maskierung von Epitopen durch Hyperphosphorylierung des ER im N-Terminus. Der Anteil ER-positiver Karunkelstromazellen (mPAK: 1D5) betrug  $39.0 \pm 5.9\%$  bei den graviden Tieren und fiel unter der Geburt signifikant auf  $17.5 \pm 8.3\%$  ab ( $p < 0.05$ ). Weiterhin war unter der Geburt die mittlere Intensität des Signals in ER-positiven Karunkelstromazellen deutlich verringert. Im Karunkelepithel fanden sich mit den C-terminalen mPAK Signale in fast allen Zellen maternalen Ursprungs, wobei das Signal in der Nähe der Chorionplatte bzw. großer Chorionzotten schwächer wurde und dort gelegentlich komplett verschwand. Auch unter der Geburt waren in den verbliebenen Resten des Karunkelepithels positive Reaktionen vorhanden. Karunkelstromazellen und Karunkelepithelzellen können somit aufgrund ihrer ER-Expression als Zielzellen plazentarer Östrogene angesehen werden.

Begleitend zur Steroidrezeptorexpression wurde die Zelldynamik in den Plazentomen zwischen T150 und G charakterisiert. Zur Erfassung der Zellproliferation wurde der immunhistologische Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen gewählt und der prozentuale Anteil Ki67-Antigen positiver Zellen ( $[\%Ki67^+]$ ) des Karunkelepithels, des Karunkelstromas, des Trophoblasten sowie des Chorionzottenstromas an T150, T220, T240 und T270 bestimmt ( $n = 3$  Tiere pro Gruppe). Unter der Geburt ( $n = 3$  Tiere) wurde eine quantitative Analyse nur für das Karunkelstroma vorgenommen, da die eindeutige Identifizierung von Zellen der übrigen Kategorien aufgrund geburtsbedingter Veränderungen nicht mit ausreichender Sicherheit möglich war. Die einzelnen Zellkategorien zeigten ein sehr unterschiedliches Proliferationsverhalten ( $p < 0.001$ ). Die niedrigste proliferative Aktivität fand sich im Stroma der Chorionzotten. Dort sinkt  $[\%Ki67^+]$  linear von  $10.5 \pm 1.7$  an T150 auf  $2.8 \pm 0.4$  an T270 ab ( $p < 0.01$ ). Ein signifikanter Einfluß des Trächtigkeitsstadiums auf die Zellproliferation ergab sich auch

für das Karunkelstroma ( $p < 0.05$ ). Dort sinkt [%Ki67<sup>+</sup>] zunächst von  $30.9 \pm 1.5$  an T150 auf  $10.6 \pm 3.4$  an T220 ab und steigt zur Geburt hin wieder auf  $45.3 \pm 5.5$  an. Für diesen Verlauf von [%Ki67<sup>+</sup>], welcher eine große Ähnlichkeit mit dem Verlauf der Estronkonzentration in den Plazentomen aufwies, konnte mittels polynomialer Regression ein nichtlinearer Trend bestätigt werden ( $p < 0.05$ ). Im Trophoblasten war [%Ki67<sup>+</sup>] von T150 bis T270 sehr konstant und schwankte lediglich zwischen  $23.3 \pm 3.4$  (T240) und  $25.4 \pm 4.7$  (T220). Die bei weitem höchste Zellproliferation mit [%Ki67<sup>+</sup>]-Werten zwischen  $58.0 \pm 6.9$  (T220) und  $68.3 \pm 5.7$  (T270) wurde im Karunkelepithel beobachtet. Die zweite Komponente der Zelldynamik, der programmierte Zelltod, wurde in den Plazentomen anhand des Apoptosenachweises mittels in situ-End-Labelings (ISEL) untersucht. Zu allen Untersuchungsstadien war die bei weitem überwiegende Mehrheit der ISEL-positiven Reaktionen im Trophoblasten vorhanden. Wegen der meist fortgeschrittenen Degeneration der betroffenen Zellen war deren Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp in den meisten Fällen nicht möglich. Lichtmikroskopische Befunde, Beobachtungen in ISEL gefärbten Präparaten sowie die hinsichtlich der Zellproliferation erhaltenen Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, daß es sich bei einem erheblichen Teil der ISEL-positiven Reaktionen im Trophoblasten neben degenerierenden Trophoblastriesenzellen (TGC) bzw. fetomaternalen Hybridzellen aus TGC und Karunkelepithelzellen um Überreste abgeschilfter Karunkelepithelzellen handelt.

Zur quantitativen Erfassung der Apoptose wurde die Häufigkeit apoptotischer Zelluntergänge pro  $5 \text{ mm}^2$  Gewebeschnitt untersucht. Hierbei ergaben sich zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (T150, T220, T240, T270, G;  $n = 3$  Tiere pro Gruppe) keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der Apoptosehäufigkeit von T150 ( $14.9 \times 1.3^{\pm 1}$ ) bis G ( $44.9 \times 1.1^{\pm 1}$ ). Aus diesem tendenziellen Anstieg fielen die Meßwerte der 220 Tage graviden Tiere heraus, bei denen die höchsten Werte ( $78.8 \times 1.1^{\pm 1}$ ) gemessen wurden. Aus den Ergebnissen kann insgesamt gefolgert werden, daß zu allen Untersuchungsstadien apoptotische Zelluntergänge in erheblichem Ausmaß stattfinden und daß der Apoptose eine wichtige physiologische Bedeutung bei der Differenzierung der Plazentome und im Rahmen plazentarer Funktionen zukommt.

Zusammenfassend ergaben sich aus den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen konkrete Hinweise auf eine Beteiligung der plazentaren Steroide an der lokalen Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktionen der Plazentome.



## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. Bernd Hoffmann danke ich für die großzügige Schaffung des Umfeldes, welches diese Habilitation ermöglichte sowie für die stets gewährte Unterstützung in Rat und Tat.

Bei den Doktoranden Sri Adiani, Frauke Hartung, Andreas Vielemeier, Kerstin Falter, Simone Weise und Christina Wirth möchte ich mich für die engagierte Durchführung der praktischen experimentellen Arbeiten bedanken.

Herrn Willi Damm und Frau Carmen Schuhmacher danke ich für die technische Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Allen Mitarbeitern sei für vielfältige direkte und indirekte Hilfestellungen gedankt, die ich während der Zeit der Habilitation erfahren habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser, Frau Dr. Christiane Pfarrer und Herrn Dr. Karl Klisch aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie möchte ich mich für die ausgezeichnete Kooperation, insbesondere für die Mitwirkung bei der Konservierung der Gewebeproben bedanken.

Herrn Dr. Klaus Failing danke ich für seine umfangreiche Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der gewonnenen Daten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Ewald und Hilde Berge-Stiftung sowie der Kogge-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Der Ewald und Hilde Berge-Stiftung danke ich weiterhin für die Übernahme der Kosten für die Drucklegung dieser Habilitationsschrift.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Frau Dina, die – obwohl selbst mit Leib und Seele Tierärztin – durch den Verzicht auf eine eigene berufliche Karriere ermöglicht hat, dass wir uns heute an dem erfreuen können, was uns beiden am meisten bedeutet auf dieser Welt: das fröhliche, unbeschwerte Lachen unserer Kinder.