

**LOKALISATION DER 17 -HYDROXYLASE-C17,20-LYASE
(P450C17), 3 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASE-
4/5 ISOMERASE (3 β -HSD) UND AROMATASE (P450_{AROM})
IN DER PLAZENTA BEIM RIND IM VERLAUF DER GRAVIDITÄT**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

R. GÖZDE ÖZALP

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

**LOKALISATION DER
17 α -HYDROXYLASE-C17,20-LYASE (P450_{c17}),
3 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASE-
 Δ 4/5 ISOMERASE (3 β -HSD) UND AROMATASE (P450_{arom}) IN DER
PLAZENTA BEIM RIND IM VERLAUF DER GRAVIDITÄT**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

R. GÖZDE ÖZALP
Tierärztin aus Bursa (Turkei)

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

Tag der mündlichen Prüfung: 3 Februar 2005

**Meinen Eltern,
meinen Großeltern und
meiner Schwester gewidmet**

***Anne ve babama, anneanneme,
babaanneme, Adil ve Ali dedeme,
ablama ithafen***

INHALTVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
2	LITERATURÜBERSICHT	6
2.1	Progesteron- und Östrogenprofile während der Gravidität des Rindes	6
2.1.1	Progesteron	6
2.1.2	Östrogene	8
2.2	Morphologie der Rinderplazenta	14
2.2.1	Makroskopischer Aufbau der Rinderplazenta	14
2.2.2	Mikroskopischer Aufbau der Rinderplazenta	16
2.2.3	Differenzierung der Trophoblastriesenzellen (TGC) in der Rinderplazenta	19
2.3	Aspekte zur funktional Bedeutung plazentarer Steroidhormone als parakrine/ autokrine Regelfaktoren	21
2.4	Die Enzyme der plazentaren Steroidbiosynthese	22
2.4.1	Side Chain Cleavage Enzyme (P450 _{scc})	22
2.4.2	17 α -Hydroxylase-C17,20-lyase (P450 _{c17})	24
2.4.3	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 4/5 Isomerase (3 β -HSD)	25
2.4.4	Aromatase (P450 _{arom})	28
2.4.5	Ziel der Untersuchungen	31
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Versuchstiere und Probenentnahmen	33
3.2	Immunhistologische Untersuchungen	35
3.2.1	Konservierung von Probenmaterial in Paraformaldehyd	35
3.2.2	Konservierung von Probenmaterial in Formalin	36
3.2.3	Immunhistochemischer Nachweis der 17 α -Hydroxylase-C17,20-lyase (P450 _{c17})	36
3.2.3.1	Färbeprotokoll	36
3.2.3.2	Semiquantitative Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte	38
3.2.4	Immunhistologischer Nachweis der Aromatase	39
3.2.4.1	Färbeprotokoll unter Verwendung des polyklonalen Aromatase-Antiserums	39
3.2.4.2	Färbeprotokoll unter Verwendung des monoklonalen Primärantikörpers H4	40

3.3	Überprüfung der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper im Western Blot	40
3.3.1	Herstellung mikrosomaler Fraktionen aus Plazentomen	40
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration in den mikrosomalen Fraktionen	41
3.3.2.1	SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese	42
3.3.2.2	Elektroblotting	43
3.3.2.3	Nachweisreaktion	44
3.4	Lokalisierung der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 4/5-Isomerase (3 β -HSD)–Expression in den Rinderplazentomen mittels In situ-Hybridisierung	45
3.4.1	Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden mittels In Vitro-Transkription unter Verwendung PCR-generierter Matrizen-DNA	45
3.4.1.1	RNA-Isolierung aus Plazentomen	46
3.4.1.2	Reverse Transkription und erster PCR Schritt	47
3.4.1.3	Zweiter PCR-Schritt unter Verwendung Promoter-gekoppelter Primer	51
3.4.1.4	Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese	52
3.4.1.5	Reinigung der DNA-Matrizen	54
3.4.1.6	In vitro-Transkription	55
3.4.1.7	Abschätzung der Arbeitsverdünnung der Digoxigenin-gekoppelten mRNA–Sonde für die In situ-Hybridisierung	55
3.4.2	In situ-Hybridisierung	56
3.4.2.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte	56
3.4.2.2	Prähybridisierung und Hybridisierung	57
3.4.2.3	Prähybridisierung	57
3.4.2.4	Vorbereitung der Sonde und Hybridisierung	57
3.4.2.5	Posthybridisierung und immunologischer Nachweis der Sondenbindung	58
3.5	Puffer und Lösungen	60
3.6	Reagenzien	67
3.7	Verbrauchsmaterialien und Geräte	70
4	ERGEBNISSE	72
4.1	Die Expression der P450c17 in den Plazentomen des Rindes	72
4.1.1	Bestätigung der Spezifität des anti-P450c17-Antiserums im Western Blot	72

4.1.2	Immunhistologische Lokalisierung der P450c17 in den Plazentomen des Rindes und Expressionsmuster im Verlauf der Gravidität	73
4.2	Die Expression der Aromatase in den Plazentomen des Rindes	78
4.2.1	Bestätigung der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper im Western Blot	78
4.2.2	Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der Aromatase in Rinderplazentomen unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers gegen die menschliche Aromatase	80
4.2.3	Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der Aromatase in Rinderplazentomen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers H4	83
4.3	Ergebnisse zur Lokalisation 3 β -HSD-spezifischer mRNA in den Rinderplazentomen mittels in situ-Hybridisierung	83
5	DISKUSSION	88
5.1	Diskussion der Ergebnisse zur Expression der P450c17	88
5.2	Diskussion der Ergebnisse zur Expression der Aromatase	90
5.3	Diskussion der Ergebnisse zur Expression der 3 β -HSD	94
5.4.	Schlussfolgerungen	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	SUMMARY	99
8	LITERATURVERZEICHNIS	101
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120

Die Evolution der Säugetiere ist an die Entwicklung der Plazenta, einem temporären, multifunktionalen Organ gebunden. Über die Plazenta wird die Verbindung zwischen maternalem und fötalem Organismus hergestellt, sie ist weit mehr als nur ein Organ, das die Ernährung des Fötus über einen selektiven Transfer von Nährstoffen vom maternalen in das fötale Kompartiment sicherstellt.

Die Vielzahl der bisher zur Morphologie und Funktion der Plazenta durchgeführten Untersuchungen hat gezeigt, dass die Funktionalität der Plazenta komplexen Regulationsmechanismen unterliegt, wobei zusätzlich speziesspezifische Gegebenheiten zu beachten sind.

Auch beim Rind ist die Plazenta durch die Produktion von Wirkstoffen gekennzeichnet, die zur Gruppe der Steroidhormone gehören. Im Vordergrund der Betrachtungen standen bisher vorwiegend die plazentaren Östrogene, deren Bedeutung zunächst vor allem in ihrer Rolle als endokrine Regelfaktoren für den maternalen Organismus gesehen wurde. Die in vorausgehenden Untersuchungen erhobenen Befunde einer zellspezifischen Expression des Östrogenrezeptors α und β sowie des Progesteronrezeptors im Karunkel- und Kotelydonengewebe lassen jedoch darauf schließen, dass die Plazenta nicht nur Produktionsort sondern auch Zielorgan der von ihr gebildeten Sexualhormone ist. Es kann daher unterstellt werden, dass diesen, über eine endokrine Funktion hinausgehend, auch parakrine bzw. ggf. auch autokrine/intrakrine Funktionen zukommen.

Nachdem beim Rind im „in vitro“ Ansatz die Biosynthese der plazentaren Steroide vom Pregnenolon bis zum Estron gezeigt werden konnte (SCHULER et al.1994), war es nun Ziel vorliegender Untersuchungen, die Expression der an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme im Plazentom auf zellulärer Ebene darzustellen, um damit - über die bisherigen Aussagen hinausgehend - mögliche parakrine bzw. und/oder autokrine/intrakrine Wirkungen näher definieren und präzisieren zu können.

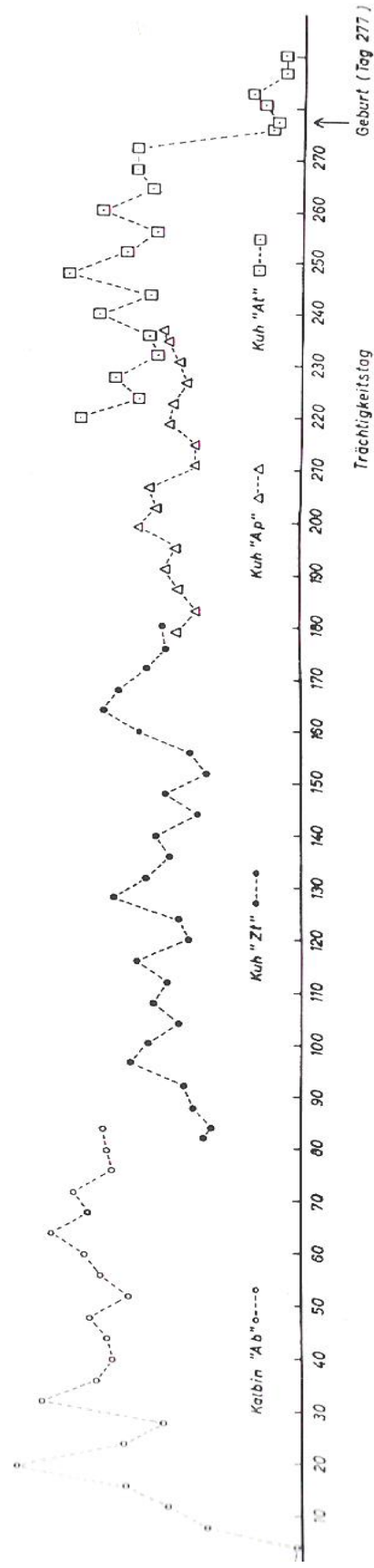
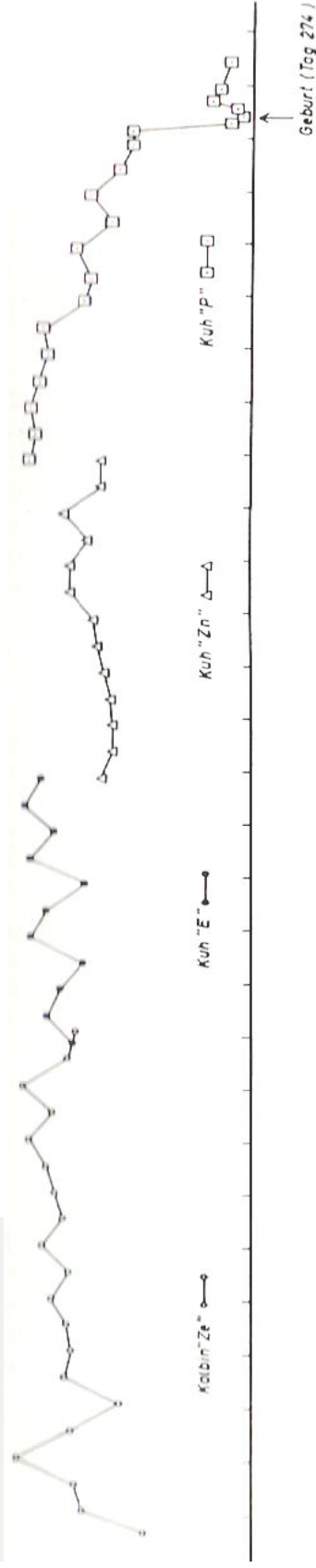
2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Progesteron- und Östrogenprofile während der Gravidität des Rindes

2.1.1 Progesteron

Beim Rind, wie bei allen Plazentalia, ist Progesteron für die Aufrechterhaltung der Gravidität erforderlich. Wichtigste Progesteronquelle beim Rind ist das Corpus luteum graviditatis, das nach abgeschlossener Anbildung ab dem 10./12. Tag post conceptionem bis unmittelbar vor die Geburt einen gleichbleibend hohen Progesteronspiegel im Blutplasma aufrecht erhält (s. Abb. 1). Auch die Rinderplazenta ist zur Progesteronproduktion befähigt (s. auch Kap 2.2.2 und 2.4), die gebildeten Mengen sind jedoch nur zwischen den Tagen von ca. 180 bis ca. 240 so hoch, dass nach Ausschaltung des Corpus luteum graviditatis die Gravidität aufrecht erhalten werden kann (HOFFMANN 1994). Diese plazentare Progesteronproduktion führt ab dem 6./7. Graviditätsmonat auch zu einem Anstieg der Progesteronkonzentrationen im Plazentagewebe. Das erreichte Konzentrationsniveau bleibt bis zum Ende der Gravidität erhalten, obwohl im Hinblick auf die Aufrechterhaltung der Gravidität plazentares Progesteron ab dem ca. 240. Tage seine Bedeutung verliert (s.o.).

ng Prog. / ml Plasma



Für die Aufrechterhaltung der Gravidität ist es notwendig, dass das Corpus luteum cyclicum in einen Graviditätsgelbkörper (Corpus luteum graviditatis) umgewandelt wird. Die dazu erforderlichen Signale werden von der Blastozyste abgegeben in Form eines als Interferon Tau ($\text{IFN}\tau$; früher bovines Trophoblastprotein) genannten Proteins. Dieses wird zwischen dem ca. 12. bis 21. Tag synthetisiert und unterdrückt die Bildung des luteolytisch wirkenden $\text{PGF}_2\alpha$ endometrialen Ursprungs (KNICKERBOCKER et al. 1986, THATCHER et al. 1989, BAZER 1992). $\text{IFN}\tau$ wirkt dabei offensichtlich hemmend auf die Transkription von Östrogen- und Oxytocinrezeptoren im Endometrium (BAZER et al. 1991).

In der Endphase der Gravidität, ca. 1-2 Tagen vor der Geburt, findet ein rascher Abfall der Progesteronkonzentration auf Werte unter 1.0 ng/ml Plasma statt (HOFFMANN et al. 1977, HOFFMANN et al. 1976). Dieser Progesteronabfall ist notwendig, um bei unveränderten Progesteronrezeptorkonzentrationen im Myometrium die Einleitung oder Geburt zu ermöglichen (KLAUKE und HOFFMANN 1992).

2.1.2 Östrogene

Wie bei vielen anderen Säugetierspezies produziert die Rinderplazenta große Mengen an Östrogenen (HOFFMANN et al. 1976), denen zunächst vor allem eine endokrine Wirkung im Hinblick auf das uterine Wachstum und die Vorbereitung des Genitaltraktes auf die Geburt zugeschrieben wurde. Über den Verlauf der Östrogenkonzentrationen während der Gravidität in peripheralen Blutplasma vom Rind liegen zahlreiche Mitteilungen vor (SMITH et al. 1973, ELEY et al. 1979, HOFFMANN et al. 1977). Eine komplexe Darstellung über den gesamten Verlauf der Gravidität, wobei auch Angaben über die Konzentrationsverläufe in Urin und Kot gemacht werden, geben HOFFMANN et al. (1997). In dieser Arbeit wurden freies und konjugiertes Estron, Estradiol- 17α und Estradiol- 17β erfasst. Freies Estradiol- 17α und Estradiol- 17β konnten im Blutplasma erst während der letzten 10 Graviditätstage nachgewiesen werden, die konjugierten Formen dagegen - vornehmlich Glucuronide - bereits 100 (Estradiol- 17β) bzw. 160 Tage (Estradiol- 17α) vor der Geburt. Dominierendes Östrogen war Estronsulfat, dessen plazentarer Ursprung bereits 1976 von HOFFMANN et al. aufgezeigt werden konnte.

Der Verlauf von Estron und Estronsulfat ist durch einen ersten Anstieg zwischen Tag 100 und 110 der Gravidität gekennzeichnet, ein zweiter und sehr deutlicher Anstieg erfolgt ab dem ca. 230. Gra-

viditätstag, bei freiem Estron ist noch ein dritter Anstieg während der letzten acht Graviditätstage zu beobachten.

Ursprung dieser Östrogene ist der fetale Trophoblast, von dem direkt freie und konjugierte Östrogene in die fetale und maternale Zirkulation abgegeben werden (HOFFMANN et al. 1979). Auch die Beobachtungen, dass bei der Geburt die Östrogene erst mit Abgang der Nachgeburt rasch auf Basalniveau abfallen (HOFFMANN et al. 1979), weisen auf den Trophoblast als Ort der plazentaren Östrogenproduktion hin.

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, liegen bis wenige Tage vor der Geburt die Konzentration von Estronsulfat um den Faktor 10-30 höher als die von freiem Estron, erst unmittelbar vor der Geburt wird der Bereich äquimolarer Konzentrationen erreicht.

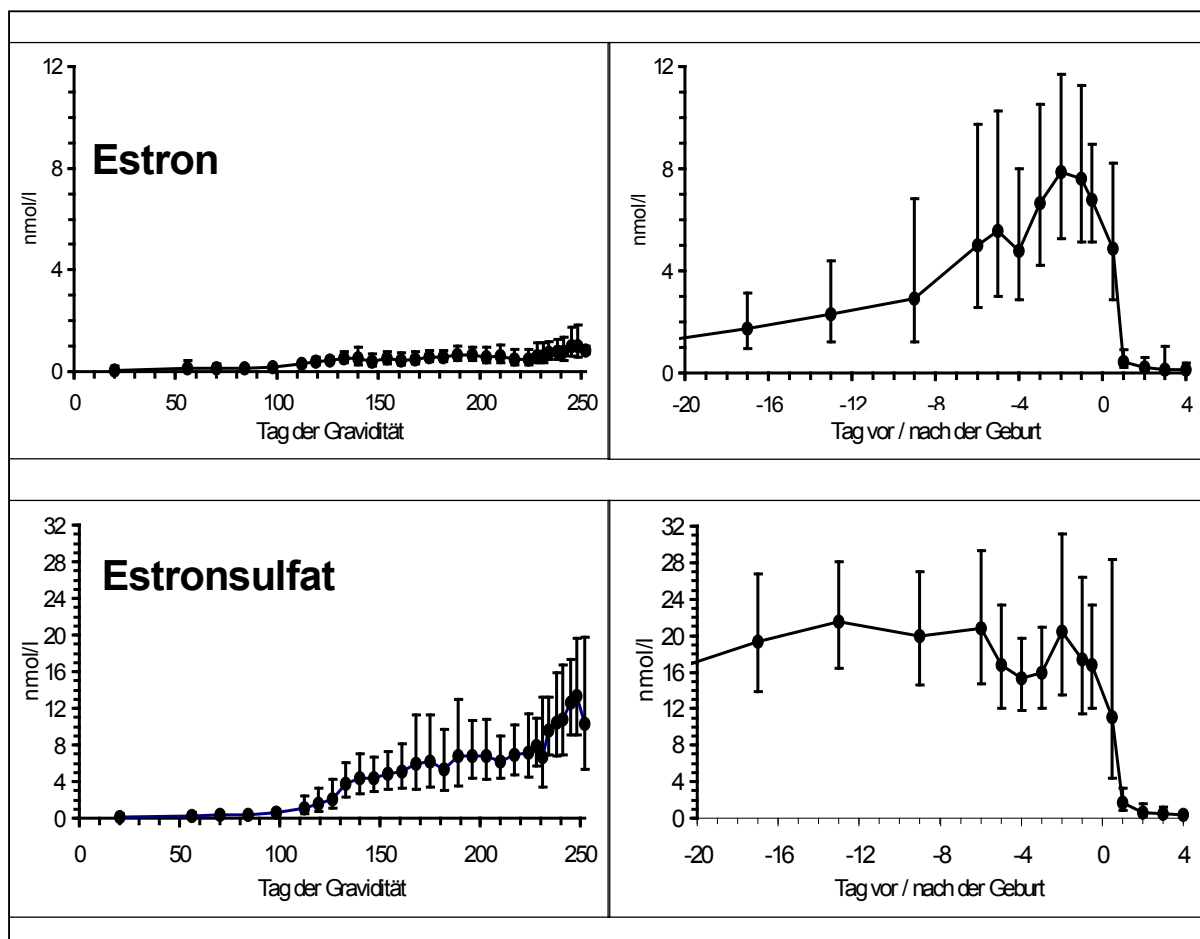
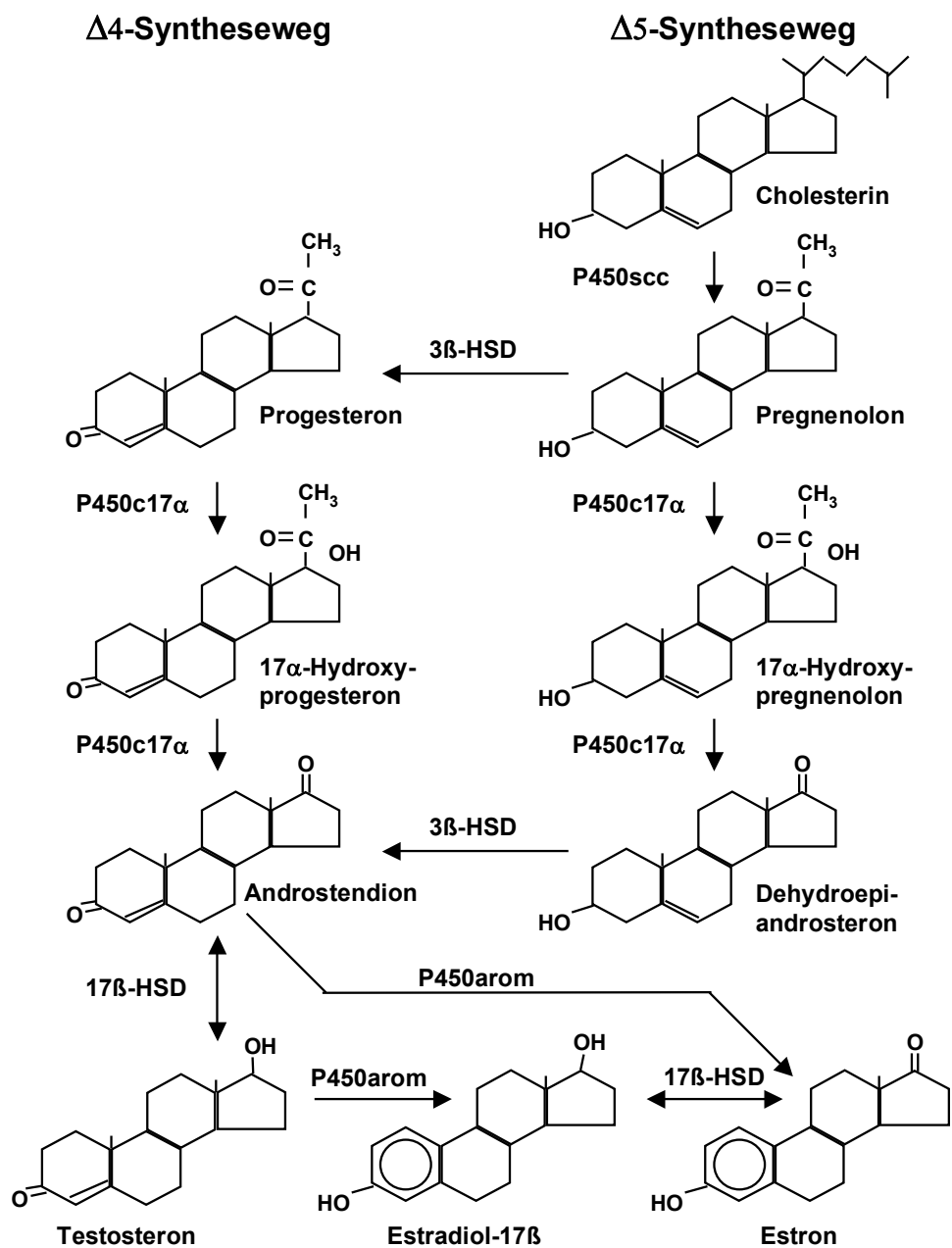


Abb. 2: Östrogenkonzentrationen im Blutplasma gravider Rinder (Hoffmann et al. 1997).

Dieser präpartale Anstieg von freiem Estron resultiert aus den in dieser Zeit stattfindenden Änderungen des plazentaren Steroidstoffwechsels. Dies erfolgt im Zuge der Reifung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und der damit verbundenen erhöhten Sekretion von Cortisol (SCHULER et al. 1994, BIRGEL et al. 1996, WOOD 1999). In Verbindung mit einer erhöhten Sekretion von $\text{PGE}_2\alpha$ kommt es zur Aktivierung der 17α -Hydroxylase-C 17/20-Lyase, wodurch Pregnenolon nur noch eingeschränkt in Progesteron sondern vor allem in 17α -OH-Pregnenolon umgewandelt wird. Damit wird der $\Delta 5$ -Syntheseweg eingeschlagen, es kommt letztendlich zur Bildung von Estron. In Abbildung 3 ist diese Umstellung des plazentaren Steroidstoffwechsels dargestellt.



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

Abb. 3: Schema der Östrogenbiosynthese.

Abbildung 4 illustriert die mit der Reifung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse einhergehenden Veränderungen.

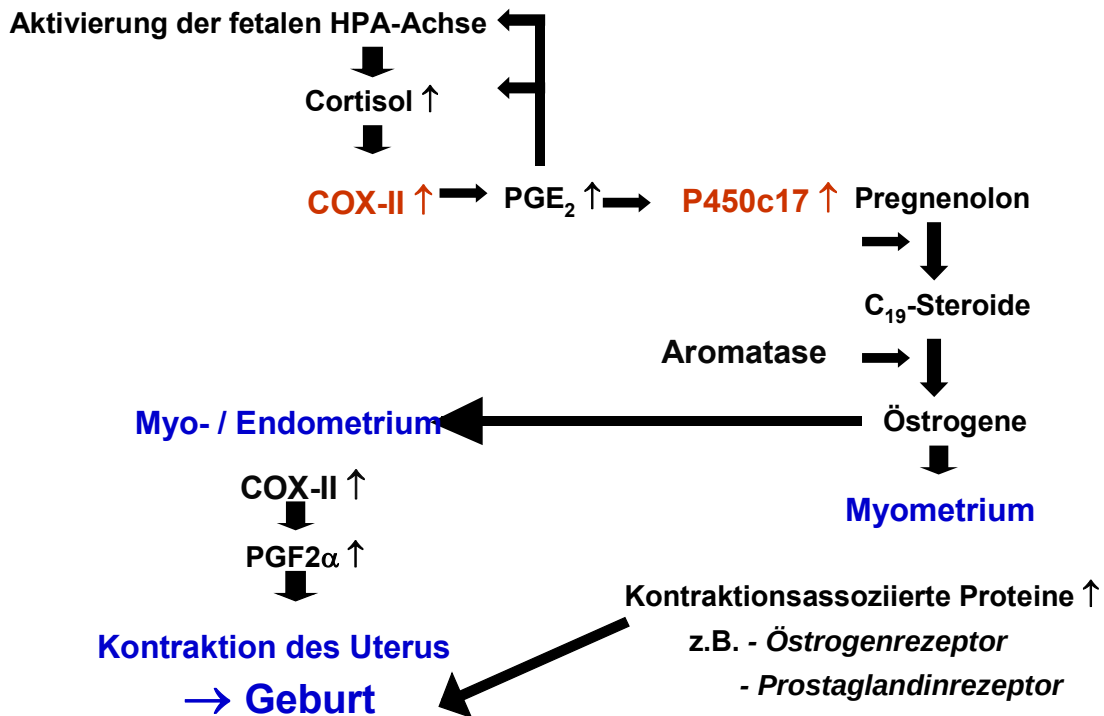


Abb. 4: Die Reifung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (nach Whittle et al. 2001).

In weiterführenden Untersuchungen konnten HOFFMANN et al. (2001), sowohl im fetalen Kotyledonengewebe als auch im maternalen Karunkelgewebe, hohe Aktivitäten einer Östrogensulfatase und Östrogensulfotransferase nachweisen. Dabei wurde für die Östrogensulfatase im Karunkelgewebe eine höhere Aktivität gemessen als im Kotyledonengewebe, bei der Östrogensulfotransferase war es genau umgekehrt.

Aus diesen Beobachtungen wurde von SCHULER (2000) folgendes Konzept abgeleitet:

Die im Trophoblasten gebildeten graviditätsassoziierten Östrogene verlassen die Kotyledonen, ausgenommen in der unmittelbaren prä- und intrapartalen Phase, überwiegend in sulfokonjugierter Form. Die Bedeutung der Produktion sulfokonjugierter Östrogene könnte darin bestehen, die Östrogenwirkung auf eine Subpopulation der insgesamt vorhandenen östrogenresponsiven Zellen zu limitieren, die neben der Expression von Östrogenrezeptoren durch die Expression einer Östrogensulfatase gekennzeichnet sind (Abb. 5). Durch den präpartalen Anstieg der freien Östrogene kann dieses Spektrum erweitert werden (SCHULER 2000).

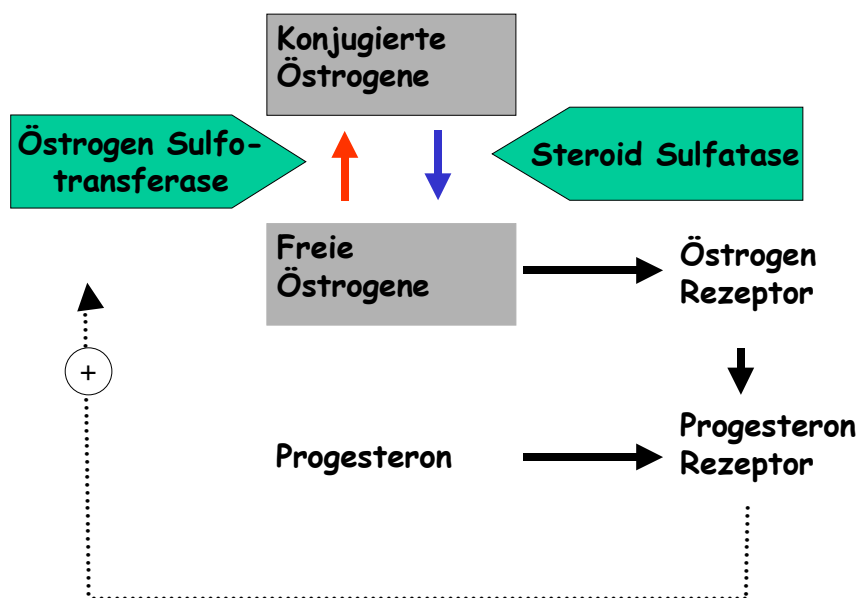


Abb. 5: Hypothetisches Schema der Bedeutung von Östrogensulfatase und Östrogensulfotransferase für die Bereitstellung freier, biologisch aktiver Östrogene im placentaren Kompartiment (Schuler 2000).

Die erste Beschreibung von Östrogenrezeptoren im Karunkelstroma und Karunkelepithel der Rinderplazenta (SCHULER et al. 2002) lässt dieses Konzept als eine Tatsache erscheinen und verweist auf eine parakrine Rolle placentarer Östrogene. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass placentare Östrogene auf parakrinem Wege an der Regulation von Wachstum und Differenzierung im maternalen Anteil der Plazentome beteiligt sind.

2.1 Morphologie der Rinderplazenta

2.1.1 Makroskopischer Aufbau der Rinderplazenta

Vom Typ her wird die Plazenta des Rindes als Semiplazenta bezeichnet, da sich – wie bei den übrigen Wiederkäuern, Schwein und Pferd – Chorion und Uterusepithel bei Abgang der Nachgeburt ohne Verluste trennen; man spricht auch von einer Plazenta addecidua.

Nach morphologischen Kriterien wird die Plazenta des Rindes als Plazenta multiplex s. cotyledonaria bezeichnet (STRAHL 1912).

Ab dem ca. 30. Tag der Gravidität beschränkt sich der feto-maternale Kontakt zunehmend auf multiple, abgegrenzte Bezirke, in denen spezifische Strukturen, die Plazentome, ausgebildet werden (LEISER 1975). Diese 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 in der Regel in jedem Uterushorn 4 Reihen mit je 10-15 Karunkelanlagen vorhanden. Entsprechend dieser 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. 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. Die danach noch auftretenden Veränderungen betreffen weniger die Grundstruktur, sie ergeben sich vielmehr aus dem danach noch stattfindenden Größenwachstum. 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. Obwohl die Karunkelanlagen in den beiden Uterushörnern gleich angelegt sind, stellten LAVEN und PETERS (2001) fest, dass im nichtträchtigen Horn offensichtlich weniger Plazentome angebildet sind als im graviden Horn.

Ungefähr um dem 200 Graviditätstag erreichen die Plazentome ihre endgültige Größe, da sich kein signifikanter Gewichtsunterschied zum 251 (+) Tag ergibt (LAVEN und PETERS 2001).

Dies erstaunt, da das fetale Wachstum bis Graviditätsende anhält; es stellt sich somit die Frage, wie die Plazenta ihrer „Nährfunktion“ nachkommt. LEISER et al. (1997) vermuten, dass eine Änderung in der Gefäßbildung und -anordnung einen Anstieg des feto-maternalen Austausches ohne Zunahme der Plazentomgewichte ermöglicht.

In Tabelle 1 sind einige Angaben hinsichtlich der Größe der Plazentome in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium wiedergeben. Daraus ergibt sich, dass eine annähernd lineare Größenzunahme bis zum ca. 200 Tag erfolgt, danach ergeben sich in Abhängigkeit von der Lokalisation erhebliche Größenunterschiede.

Tabelle 1: Plazentomgrößen beim Rind in Abhängigkeit vom Graviditätsstadium (Richter & Götze 1960).

Tag der Gravidität	Größe		
	Länge (cm)	Breite	Tiefe
1. Monat	Anlage vorhanden, ohne plazentare Verankerung		
2. Monat	Plazentation im Gange, linsengroße Kotyledonen		
3. Monat	Plazentare Verankerung vollständig		
4. Monat	6.5	3.5	2.0
5. Monat	7.5	4	2.5
6. Monat	8	4.5	2.5
7. Monat	11	5	2.8
8. Monat	11	6	3.5
9. Monat	14	6.5	4.5

2.1.2 Mikroskopischer Aufbau der Rinderplazenta

Bei entwickelten Plazentomen des Rindes überzieht die Chorionplatte 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). Entsprechend spricht man, wie aus Abbildung 6 hervorgeht, von Primär-, Sekundär und Tertiärzotten.

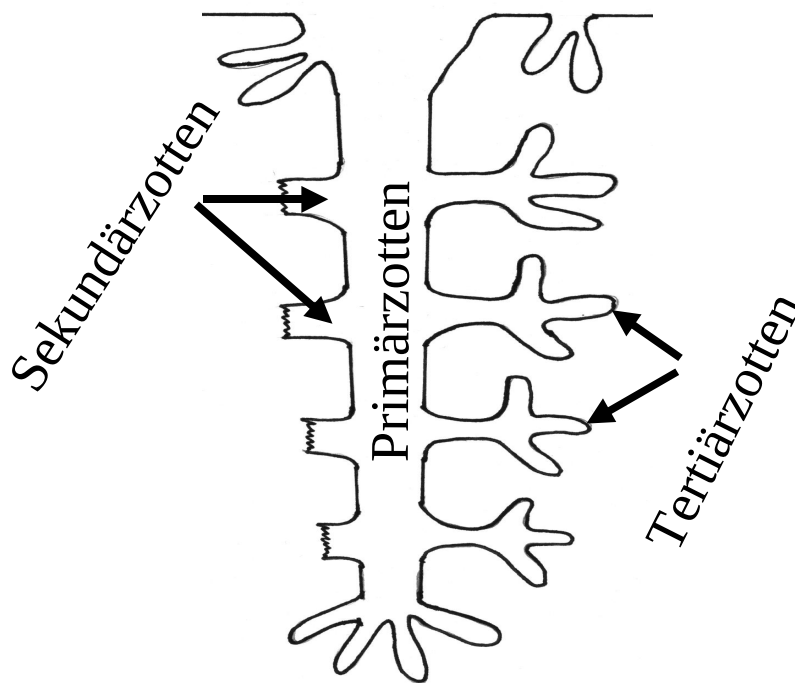


Abb. 6: Schematische Darstellung einer Chorionzotten.

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).

Bis unmittelbar vor die Geburt werden der fetale und maternale Blutkreislauf getrennt durch das jeweilige Gefäßendothel, Bindegewebe und das Karunkel- bzw. Trophoblastepithel; dies entspricht

einer Plazenta epitheliochorialis. Nachdem beim Rind unmittelbar vor der Geburt aber ein Großteil des Karunkel epithels verschwindet, wurde von LEISER und KAUFMANN (1994) der Ausdruck "Placenta synepithelochorialis" gebraucht.

Das Chorion epithel (Trophoblast) stellt die entscheidende Austauschbarriere zwischen maternalem und fetalem Organismus dar. Beim Rind 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 (UTC=Uninuclear Trophoblast Cell) mit Kontakt zur Basalmembran und Zweikernige Trophoblastriesenzellen (TGC=Trophoblast Giant Cell), die keinen Kontakt zur Basalmembran mehr aufweisen.

Als Trophoblastriesenzellen werden große Zellen des Trophoblasten bezeichnet, deren DNA-Gehalt größer ist als derjenige, welcher dem diploiden Chromosomensatz entspricht. Eine charakteristische Zellpopulation der Trophoblastriesenzellen sind die meist zweikernigen Trophoblastriesenzellen (TGC) der Wiederkäuer (HOFFMAN und WOODING 1993). Sie entstehen aus den einkernigen, uninukleären Trophoblastzellen (WIMSATT 1951) und sind bereits in sehr frühen Stadien der Plazentation nachweisbar (LEISER 1975, KING et al. 1979, 1980).

Der Anteil an Trophoblastriesenzellen im Trophoblast epithel liegt während der Gravidität relativ konstant bei 20 bis 25 %. Ungefähr 1/7 dieser Zellen kann zum maternalen Karunkel epithel migrieren und dort mit maternalen Karunkel epithelzellen fusionieren (HOFFMAN und WOODING 1993, WOODING et al. 1986).

Eine essentielle Aufgabe der Trophoblastriesenzellen ergibt sich aus ihrer Beteiligung am Aufbau des feto-maternalen Syncytiums als Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation. Eine weitere Hauptaufgabe liegt in der Bildung endokriner Signale (WOODING 1992).

Trophoblastriesenzellen enthalten im infranukleären Bereich charakteristische, glycoprotein-haltige Granula, die während der Migration vom Chorion epithel zum maternalen Epithel freigesetzt werden (HOFFMAN und WOODING 1993).

Nachdem die Expression von mRNA für plazentares Laktogen in dem Trophoblastriesenzellen gezeigt werden konnte (HOFFMAN und WOODING 1993), sind diese als Syntheseort für plazentares Laktogen definiert. Offen hingegen ist, inwieweit sie an der plazentaren Steroidhormonbiosynthese beteiligt sind.

Abbildung 7 zeigt schematisch die feto-maternale Grenzzone, die durch die apikalen Membranen des maternalen Karunkel epithels und des fetalen Trophoblast epithels gebildet wird. Daraus wird ersichtlich, dass die Trophoblastriesenzellen, losgelöst von der Basalmembran, zwischen den uni-

nukleären Trophoblastzellen liegen; bei Migration in das Karunkel­epithel stellt die karunkelseitige Basalmembran die Grenzlinie dar.

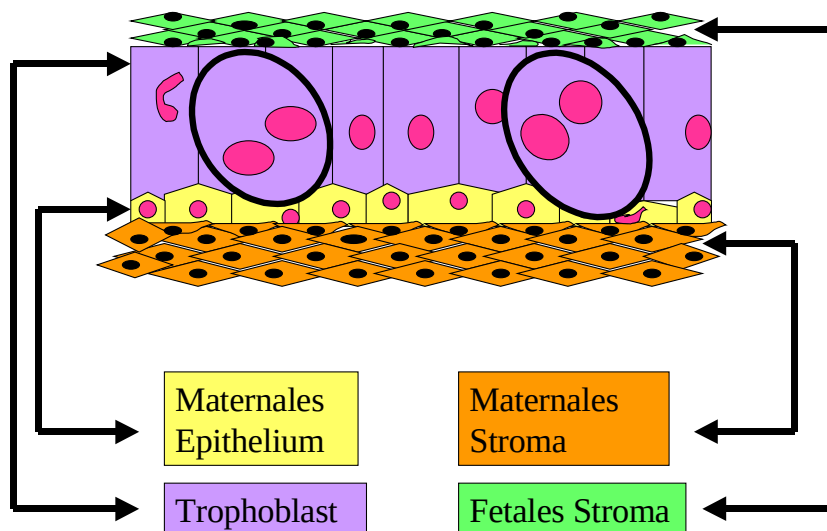


Abb. 7: Schematische Darstellung der feto-maternale Grenzzone.

Die einkernigen Trophoblastzellen sind kubisch bis hochprismatisch. Dort, wo sie an die Trophoblastriesenzellen grenzen, sind sie durch diese vielgestaltig verformt (BJÖRKMAN 1954, LEISER 1975). Aufgrund des ausgeprägten Mikrovillisaumes wird den uninukleären Trophoblastzellen eine vorwiegend resorptive Fähigkeit zugeschrieben; aber auch endokrine Funktionen werden unterstellt (GROSS und WILLIAMS 1988a, MATAMOROS et al. 1994).

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. Der von WOODING (1992) geprägte Ausdruck “Plazenta synepitheliochorialis“ be-

rücksichtigt jedoch nicht die Beobachtung von BJÖRKMAN (1954), der feststellte, dass das vollständige Verschwinden des Karunkelepithels in der Spätphase der Gravidität allenfalls in den oberflächlichsten Bereichen der Karunkeln zu beobachten ist. Die präpartale Abflachung des Karunkelepithels geht mit einer deutlichen Abnahme der Zelldichte einher. In Fällen von Nachgeburtsverhalten unterbleiben diese Reifungsvorgänge, ebenso wie der oben angesprochene drastische Abfall der Anzahl der Trophoblastriesenzellen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Plazentareifung nicht unmittelbar an die Reifung des Fetus bzw. an die geburtsinduzierenden Mechanismen gekoppelt ist (WOICKE et al. 1986, SCHOON 1989).

2.2.3 Differenzierung der Trophoblastriesenzellen (TGC) in der Rinderplazenta

Typischerweise sind Trophoblastriesenzellen (TGC) zweikernig. Gelegentlich werden jedoch auch einkernige bzw. solche mit einer höheren Anzahl an Kernen gefunden (KLISCH et al. 1999a). Die Kerne in jungen TGC sind kugelförmig, bei älteren Zellen sind sie eher ovoid. Die Kernmembran ist deutlich ausgeprägt und das Chromatin in zahlreichen Klümpchen angeordnet, offensichtlich besitzen sie keine Nucleoli. Wie bei SCHULER (2000) ausgeführt, liegen die beiden Kerne etwas oberhalb einer gedachten Äquatorialebene und teilen das Zytoplasma dadurch in einen kleineren supranucleären und einen größeren infranucleären Bereich ein.

Die beiden Zytoplasmabereiche unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, Anfärbbarkeit und bezüglich des Gehaltes an Zellorganellen. Der supranucleäre Bereich ist charakterisiert durch einen hohen Gehalt an Mitochondrien und Golgivesikeln, charakteristisch für den infranucleären Bereich sind insbesondere glykoproteinhaltige Granula (WIMSATT 1951).

Die Kontrolle der Migration der Trophoblastriesenzellen ist weitgehend unklar; sie wird durch eine Ovariectomie des Muttertieres, Reduktion der Zahl der Placentome und Entfernung von Karunkelanlagen vor dem Decken nicht beeinflusst, wie Untersuchungen an Schafen und Ziegen gezeigt haben (WOODING et al. 1986).

Die Tatsache, daß bei Zwillingssgraviditäten im Falle der Verabreichung eines ACTH-Präparates an einen der beiden Feten der Rückgang der Anzahl von TGC nur im behandelten Fetus beobachtet wurde, wurde von den Autoren dahingehend interpretiert, daß die Kontrolle über Zahl und Migrationsverhalten der TGC beim Fetus liegt (WOODING et al. 1986).

Die TGC des Rindes weisen einen Durchmesser von 30-50 µm auf. Es wird vermutet, daß diese in der Wiederkäuerplazenta von den einkernigen Trophoblastzellen durch acytokinetische Mitosen abstammen (KLISCH et al. 1999a). KLISCH et al. (1999b) konnten in dieser Untersuchung für die

TGC einen typischen DNA-Gehalt von 8 C nachweisen und widerlegen damit frühere Befunde von HOFFMAN und WOODING (1993), die von diploiden Kernen ausgehen. Aufgrund ihrer Ergebnisse postulieren KLISCH et al. (1999b), 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 32 C.

Nach WOODING (1992) gibt es kein Anzeichen für eine Stammzellenpopulation, offensichtlich kann sich jede beliebige der Basis des Chorionepithels aufliegende uninukleäre Zelle im Trophectoderm in eine Trophoblastriesenzellen entwickeln. Die Bedeutung der Genom-Multiplikation liegt vermutlich in einer erhöhten Synthesekapazität.

LEISER und KAUFMANN (1994) interpretieren die TGC 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 entstehen. Da die Syncytien aufgrund des hohen Differenzierungsgrades ihre Teilungsfähigkeit verloren haben, müssen sie permanent aus der Stammzellreserve, den Zellen des Cytotrophoblasten, neu gebildet werden (übersicht bei BENIRSCHKE und KAUFMANN 1995).

Bei Schaf und Ziege werden in den Plazentomen an der fetomaternalen Grenzfläche durch Verschmelzung von BNCs mit uterinen Epithelzellen vielkernige Hybridzellen aufgebaut. Die Mehrzahl der Kerne dieser Riesenzellen entstammen hierbei den TGCs. Die Bedeutung der Hybridzellbildung wird in einer Förderung des fetomaternalen Stoffaustausches gesehen (WOODING 1984, WANGO et al. 1990, WOODING et al. 1993). In fortgeschrittenen Stadien fusionieren die einwandernden TGC mit jeweils einer Karunkel epithelzelle zu einer trinukleären fetomaternalen Hybridzelle, welche nach Freisetzung der aus den TGC entstammenden spezifischen Granula degenerieren (WATHES und WOODING 1980, WOODING und BECKERS 1987, HOFFMAN und WOODING 1993, KLISCH et al. 1999a). Unter der Geburt wurde ein Absterben bzw. Vitalitätsverlust der TGC beobachtet, was für den termingerechten Abgang der Nachgeburt von Bedeutung sein soll. Der Mechanismus, welcher dem Verschwinden bzw. dem Vitalitätsverlust der TGC zugrunde liegt, ist derzeit unklar (WILLIAMS et al. 1987, GROSS und WILLIAMS 1988b, GROSS et al. 1991).

2.3 Aspekte zur funktionalen Bedeutung plazentarer Steroidhormone als parakrine / autokrine Regelfaktoren

Wie bereits in Kapitel 2.1 dargestellt, werden von der Plazenta des Rindes mit zunehmender Graviditätsdauer vermehrt Östrogene gebildet; die plazentare Progesteronproduktion ist während der Tage 180-240 am höchsten, die Bedeutung plazentaren Progesterons als endokriner Regelfaktor scheint auf diese Zeitspanne beschränkt zu sein.

Auf die möglichen endokrinen Wirkungen plazentarer Steroide wurde bereits oben hingewiesen. Für Progesteron kann im Hinblick auf den „Allo - Antigen“ Embryo auch eine mögliche, lokale immunsuppressive Wirkung nicht ausgeschlossen werden (HANSEN 1995, PEPE und ALBRECHT 1995), obwohl dies eher unwahrscheinlich ist, da am Anfang der Gravidität ausschließlich luteales Progesteron zur Verfügung steht.

Neue Aspekte der Bedeutung plazentarer Steroide ergaben sich jedoch aus der Beobachtung, dass sowohl der Progesteron- als auch der Östrogenrezeptor in der Rinderplazenta exprimiert werden. So wurde von SCHULER et al. 1999 erstmals das Vorkommen des Progesteronrezeptors und 2002 das des Östrogenrezeptors α im Karunkelgewebe des Rindes beschrieben, 2004 erfolgte die Beschreibung der Expression des Östrogenrezeptors β (SCHULER et al. 2004). Im Zusammenhang mit weiteren Befunden (BOOS et al. 2000) ergeben sich daraus interessante Hinweise auf parakrine und autokrine Wirkungen der plazentaren Steroide.

Als Progesteronrezeptor positiv erwiesen sich die Kerne von Fibrozyten-ähnlichen Zellen im Karunkelstroma maternaler Septen (SCHULER et al. 1999). Östrogenrezeptor α positiv waren ebenfalls die Kerne der Fibrozyten-ähnlichen Karunkelstromazellen, aber auch die des Karunkelepithels; im fetalen Teil des Plazentoms waren der Progesteron- und Östrogenrezeptor α nicht nachweisbar. Dagegen konnte der Östrogenrezeptor β sowohl im Karunkel- als auch Kotyledonengewebe nachgewiesen werden, mit der offensichtlich stärksten Expression in den Trophoblastriesenzellen (SCHULER et al. 2004). Diese Befunde weisen auf eine parakrine Rolle plazentaren Progesterons und der plazentaren Östrogene hin. Die Lokalisation des Östrogenrezeptor β im Kotyledonengewebe lässt möglicherweise aber auch auf eine autokrine Funktion plazentarer Östrogene schließen.

HOFFMANN und SCHULER (2002) sehen hier zunächst eine das Karunkelwachstum fördernde Wirkung, da die proliferative Aktivität des Karunkelepithels, gemessen am Ki-67-Antigen, parallel mit den Estron-Gewebekonzentrationen ansteigt. Speziell die Proliferation des Karunkelepithels wird als excessiv und unabhängig vom allgemeinen Karunkelwachstum beschrieben (SCHULER et al. 2000). Neben der These, dass durch diese hohe Proliferationsrate und Umsetzung die Bildung ei-

nes hohen, mehrschichtigen Epithels vermieden wird, wird darauf hingewiesen, dass über die durch die Trophoblastriesenzellen phagozytierten und in das Kotyledonenepithel zurückgeführten Karunkel-epithelzellen eine besondere Art der Nährstoffversorgung des Fetus erfolgen könnte.

Die spezifische, differenzierte Expression des Östrogenrezeptor α und Östrogenrezeptor β im Karunkel- und Kotyledonengewebe lässt weiter darauf schließen, dass über sie unterschiedliche Vorgänge geregelt werden. So gehen SCHULER et al. (2004) davon aus, dass plazentare Östrogene via Östrogenrezeptor β an der Differenzierung der Trophoblastzellen beteiligt sind. Die Beobachtung, dass auch Endothelzellen den Progesteronrezeptor sowie den Östrogenrezeptor α und Östrogenrezeptor β exprimieren (SCHULER et al. 1999, 2002, 2004) weist darauf hin, dass die plazentaren Steroide über die Beeinflussung der Angiogenese auch den utero-placentaren Blutfluss und damit die Entwicklung des Fetus regulieren.

2.4 Die Enzyme der Plazentaren Steroidbiosynthese

Charakteristisch für die Steroidhormonbiosynthese sind die Cytochrom-P450 Systeme. Diese Steroid-Hydroxylasen (Monooxygenasen) finden sich in den Membranen von Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Sie katalysieren position- und substratspezifische Hydroxylierungen sowie oxidative Spaltungen von C-C Bindungen. Die Substratspezifität ist groß. Bei Ausfall eines Enzymes in der Biosynthesekette wird das Substrat vielfach vom folgenden Enzym nicht mehr akzeptiert (KARLSON et al. 1994).

2.4.1 Side Chain Cleavage Enzyme (P450scc)

Der erste und gleichzeitig „rate-limiting“ Schritt in der Steroidbiosynthese ist die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon. Diese Umwandlung wird katalysiert durch das Cholesterol-Side-Chain Cleavage Cytochrome P450scc System (LIEBERMAN und LIN 2001). P450scc liegt an der inneren Mitochondrienmembran und kooperiert mit zwei Co-Enzymen, dem Ferredoxin und der Ferredoxin Reduktase. Erster Schritt der Biosynthese ist eine Hydroxylierung am C-22, die zu der Bildung von 22R-Hydroxycholesterol führt; als nächstes wird das 20 α , 22R-Dihydroxycholesterol gebildet, nach Abspaltung der C 20-25 Seitenkette entstehen Pregnenolon und Isocaproinsäure.

Als der eigentliche „rate-limiting“ Schritt wird die initiale Oxygenierung von Cholesterol zu 22R-Hydroxycholesterol angesehen. Die gesamte Reaktionskette ist Sauerstoff-abhängig, NADPH⁺ ist

essentieller Cofactor. Die Verfügbarkeit von NADPH als Elektronenspender muss daher gesichert sein (SCHULSTER et al. 1976, LIEBERMAN und LIN 2001, TUCKEY und HEADLAM 2002).

Das Cholesterol wird von den hormonsynthetisierenden Drüsenzellen entweder aus der Blutbahn genommen oder selbst synthetisiert. In vielen Zellen ist Cholesterol in Form von Lipidtröpfchen als Ester mit Fettsäuren gespeichert. Erster Schritt der Hormonbiosynthese ist demnach die Freisetzung von Cholesterol aus seiner Speicherform durch die Cholinesterase. Danach wird freies Cholesterol an die innere Mitochondrienmembran durch das *Steroide Acute Regulatory Protein* (StAR) transportiert (STOCCO 2000, PILON et al. 1997, TUCKEY und HEADLAM 2002).

Das P450_{scc} (Side Chain Cleavage Enzym) ist das Produkt des CYP11A Gens (ARAKANE et al. 1997). Die Transkription dieses Gens im Rinderovar wird durch das gonadotrope Hormon LH (Luteinisierendes Hormone) reguliert, dessen Wirkung nach Bindung an den Membranrezeptor über cAMP als Second Messenger erfolgt. In der Nebennierenrinde wird dieses Gen auf gleichem Wege durch Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) reguliert.

Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor (SF-1) an definierte Sequenzen des CYP11A1 Gens bindet. Diesem Transkriptionsfaktor kommt demnach eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Genaktivität zu. So zeigt sich nach Mutation der SF-1 Bindungsregionen in CYP11A1 eine verringerte basale Aktivität und Verlust der hormonalen Antwort in transgenen Mäusen (HUANG et al. 2001). Bei Verlust des SF-1 Gens waren bei knock out Mäusen Nebennieren und Gonaden nicht angebildet, der Tod der Tiere trat kurz nach der Geburt ein (SADOVSKY et al. 1995).

Untersuchungen an der Ratte haben gezeigt, dass – anders als in Nebennierenrinde und Ovar – dem Transkriptionsfaktor SF-1 bei der Steroidbiosynthese in der Plazenta keine Bedeutung zukommt (SADOVSKY et al. 1995). Dort kommt diese Rolle einem Activating Protein- 2 (AP-2) zu, wie Untersuchungen von BEN-ZIMRA et al. (2002) ergeben haben.

2.4.2 17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase (P450c17)

Cytochrom P450c17 katalysiert sowohl die Umwandlung von Pregnenolon über 17 α -Hydroxypregnenolon in Dehydroepiandrosteron (Δ 5-Syntheseweg) als auch die Umwandlung von Progesterone über 17 α -Hydroxyprogesteron in Androstendion (Δ 4-Syntheseweg). Dieses Enzyme wird von CYP17 kodiert. P450c17 weist zwei deutliche Aktivitäten auf, die 17 α -Hydroxylase als Schlüsselaktivität für die Cortisolsynthese sowie die 17 α -Hydroxylase-17,20-Lyase zur Synthese von Androstenedion bzw. Dehydroepiandrosteron (DHEA) als Ausgangssubstrate für die Synthese von Androgenen und Östrogenen (MOORE und MILLER 1991).

Substrat für P450c bei Ratte und Schwein sind sowohl Pregnenolon als auch Progesteron; in vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass die Androgensynthese sowohl auf dem Δ 5- als auch auf dem Δ 4-Synthesewegen erfolgen kann. Auf den Δ 4-Syntheseweg erfolgt Mensch und Rind zwar noch die 17 α -Hydroxylierung, nicht mehr jedoch die Abspaltung der C17,20-Seitenkette (CONLEY und BIRD 1997). Dies haben auch Untersuchungen von SCHULER et al. (1994) in der Rinderplazenta bestätigt, die zeigen konnten, dass 17 α -Hydroxyprogesteron der Endpunkt der Steroidsynthese auf dem Δ 4 Syntheseweg ist; die Östrogensynthese erfolgt auf dem Δ 5-Syntheseweg.

Die Tatsache, dass in den von SCHULER et al. (1994) durchgeführten in-vitro Untersuchungen noch am 270. Graviditätstag Pregnenolon praktisch ausschließlich in Progesteron/17 α -Hydroxyprogesteron umgewandelt und der Δ 5-Syntheseweg erst unter der Geburt aktiviert wurde, erkennbar an der Bildung von Estron, weist darauf hin, dass eine zeitlich gezielte Expression der 17 α -Hydroxylase-17,20-Lyase Aktivität erfolgt.

CONLEY und BIRD (1997) sprechen in diesem Zusammenhang von einem relativen Funktionsblock bei Rind, Mensch und Schaf.

Die Steuerung der 17 α -Hydroxylase sowie die der 17,20-Lyase-Aktivität unterliegt einem komplexen Mechanismus (MILLER 2002, COMPAGNONE und MELLON 2000, MELLON et al. 1998). Nach COMPAGNONE und MELLON (2000) und MELLON et al. (1998) tritt die durch die 17 α -Hydroxylase vermittelte Reaktion rascher ein als die durch die 17,20-Lyase vermittelte, als Substrat bevorzugt die 17,20-Lyase Δ 5-Verbindungen. Nach MILLER (2002) erfolgt die Regulation der beiden Enzymaktivitäten auf einer der Genaktivität nachgeschalteten Ebene. Ein Faktor wird in den Bereitstellung von NADPH über ein Flavoprotein, die P450 Oxidoreduktase (OR), gesehen, wobei bei einem hohen molaren Verhältnis von OR zu P450c17 die 17,20-Lyase Aktivität gefördert wird. Zusätzlich zur Oxidoreduktase kann Cytochrome b5 die 17,20-Lyase Aktivität stimulieren.

Nach MILLER und AUCHUS (2000) erfolgt dies jedoch nicht über dessen bekannte Funktion als Elektronendonator sondern aufgrund allosterischer Effekte, da Apo-b5 (Protein enthält kein Häm) und Holo-b5 gleichermaßen effektiv sind.

Ein weiteren Faktor, durch den die Enzymaktivität gesteuert werden kann, ergibt sich aus der Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste des P450c17-Proteins, was zu einer Steigerung der 17,20-Lyase-Aktivität führt; eine Dephosphorylierung bewirkt den gegenteiligen Effekt. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht bekannt, eine Möglichkeit wird jedoch in einer Steigerung der Bindungsaffinität von P450c17 zur Oxidoreduktase und/oder Cytochrome b5 gesehen.

2.4.3 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 4/5-Isomerase (3 β -HSD)

3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 4/5-Isomerase (3 β -HSD) ist ein NAD⁺ abhängiges, im endoplasmischen Retikulum und in der Mitochondrienmembran lokalisiertes Enzym, das nicht zur Cytochrom P-450-Gruppe gehört. 3 β -HSD ist ein Mitglied der Familie kurzkettiger Alkoholdehydrogenasen [short-chain alcohol dehydrogenases (SCAD)] und katalysiert die Oxidation der 3 β -OH-Gruppe und die Umlagerung der Doppelbindung von Kohlenstoff C-5/C-6 in die Doppelbindung von C4/C5. Die 3 β HSD weist demnach zwei enzymatische Aktivitäten auf. Substrate sind sowohl Pregnenolon als auch Dehydroepiandrosteron. Die Bildung der 4-en-3-keto-Steroide aus diesen 3 β -Hydroxy-5-en-Vorläufern ist ein obligatorischer Schritt in der Biosynthese von hormonal wirksamen Steroiden wie Glucocorticoiden, Mineralocorticoiden, Östrogenen und Androgenen (KARLSON et al. 1994).

Beim Mensch wurden zwei Isoenzyme der 3 β -HSD nachgewiesen. Typ1 wird in der Plazenta, Mamma und Haut exprimiert, Typ 2 in der Nebennierenrinde und den Gonaden (GINGRAS und SIMARD 1999).

Die cDNA für das Typ 1 Enzym kodiert ein Protein von 372 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 42,216 kDa. Das Typ 2 Enzym besteht aus 371 Aminosäuren. Die Homologie zwischen den beiden Enzymen liegt bei 93.5 % (PENNING, 1997).

Untersuchungen an der Plazenta des Rindes haben gezeigt (TSUMAGARI et al. 1994), dass die 3 β -HSD Aktivität in den Kotyledonen höher ist als in den Karunkeln. Die im 7. Trächtigkeitsmonat in den Kotyledonen gemessene Aktivität lag bei $150.6 \pm 5.8 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$. Ein Maximalwert von $221.0 \pm 34.9 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$ ergab sich während des 8. Trächtigkeitsmonats, unmittelbar vor der Geburt erfolgte ein Abfall (Abbildung 8).

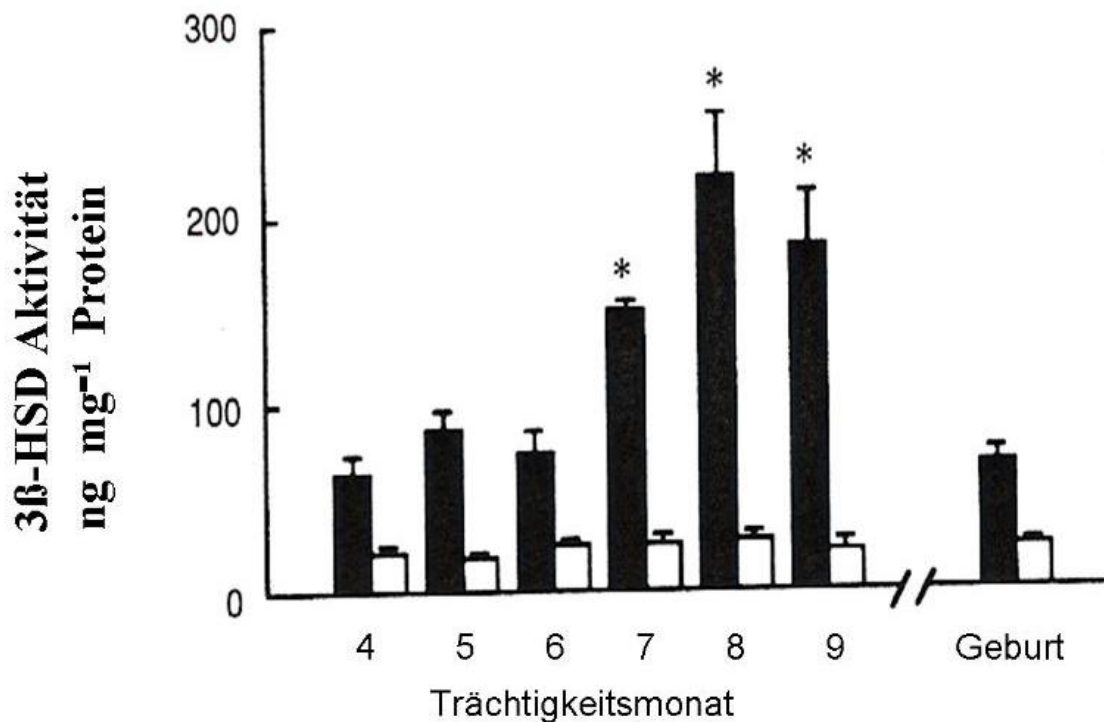


Abb. 8: Konzentration von 3 β -HSD in den Kotyledonen (■) und Karunkeln (□) der Rinderplazenta (nach Tsumagari et al. 1994).

Die Progesteron- und 20 α -Hydroxyprogesteron-Konzentrationen in den Kotyledonen erhöhen sich sprunghaft vom 6. auf den 7. Monat der Trächtigkeit. Ein Abfall wird erst unmittelbar vor der Geburt beobachtet (Abbildung 9). Diese Veränderungen verlaufen synchron zu denen der 3 β -HSD. Im Gegensatz zu Progesteron und 20 α -Hydroxyprogesteron wurden entsprechende Veränderungen für 17 α -OH-Progesteron nicht beobachtet (s. Abbildung 9).

Dieser Befund weist darauf hin, dass 20 α -Hydroxyprogesteron offensichtlich ein Hauptmetabolit der placentaren Progesteronsynthese beim Rind ist.

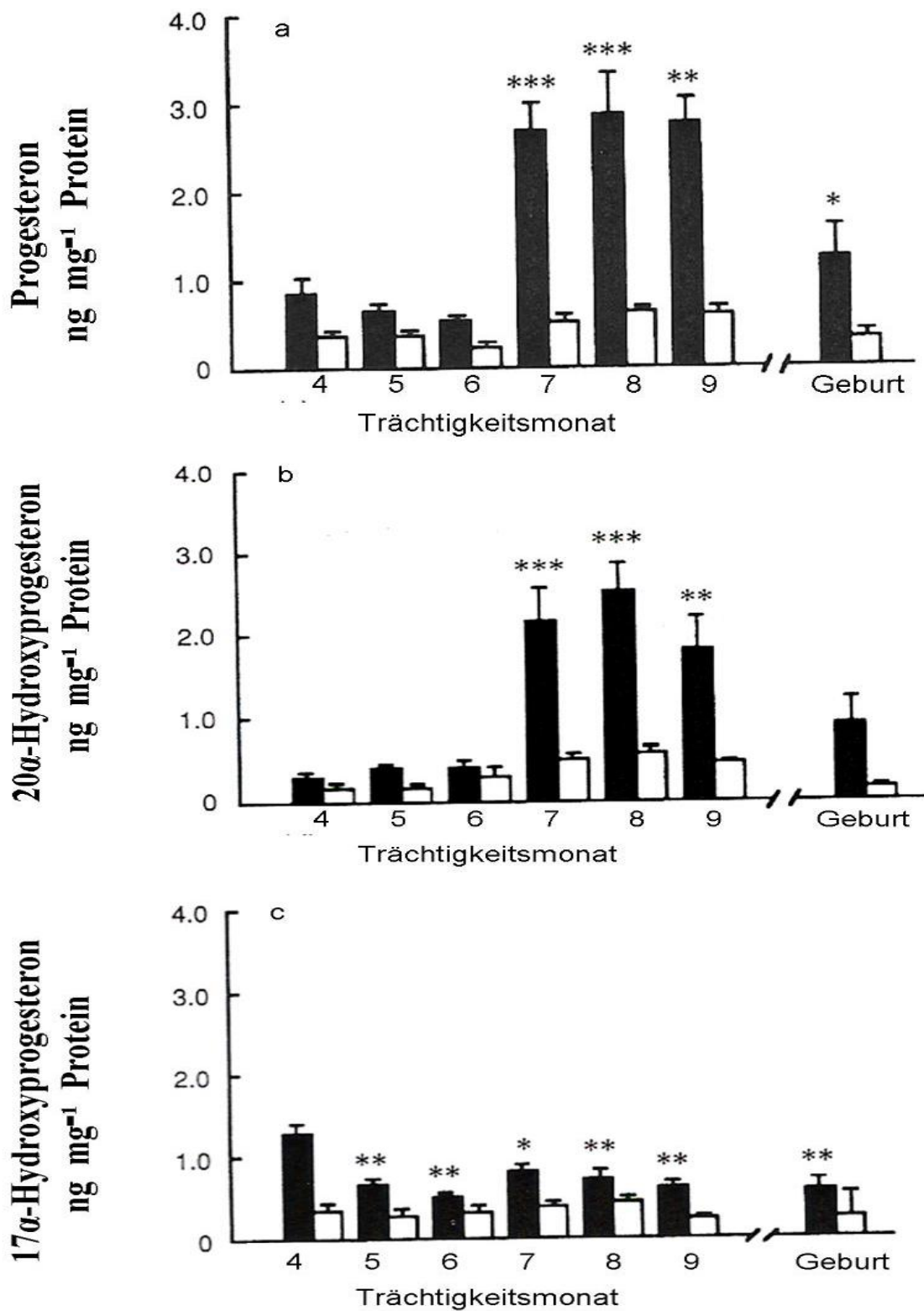


Abb. 9: Konzentrationen von **a)** Progesteron **b)** 20 α -Hydroxyprogesteron und **c)** 17 α -Hydroxyprogesteron in Kotyledonen (■) und Karunkelgewebe (□) (nach Tsumagari et al. 1994).

2.4.4 Aromatase (P450_{arom})

Aromatase P450 Cytochrom ist das Schlüsselenzym für die Biosynthese der Östrogene (C₁₈-Steroide) aus C₁₉-Vorstufen (BRUEGGMEIER 1990, CONLEY und HINSHELWOOD 2001, HARADA et al. 2003). Bei der Aromatase handelt es sich um ein membrangebundenes Cytochrom P450-Monooxygenase System, das aus zwei Proteinen besteht, der Cytochrom P450-Aromatase und einer NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Cytochrom P450_{arom} ist ein Häm-Protein, das die als Substrat dienenden Steroide sowie molekularen Sauerstoff bindet und die Oxydation katalysiert. Bei der Reduktase handelt es sich um ein Flavoprotein, das ubiquitär im Endoplasmischen Retikulum vorkommt und verantwortlich ist für die Übertragung von H⁺-Ionen von NADPH auf Cytochrom P450_{arom} (BRUEGGMEIER 1990).

Aromatase wird in den zahlreichen Zellen und Geweben, wie z.B. Plazenta, Ovar, Testis, Fettgewebe und Gehirn exprimiert (BRUEGGMEIER 1990, SIMPSON 2000).

Bei der Aromatisierung handelt es sich um einen komplexen, in drei Schritten ablaufenden Prozess. Wie Abbildung 10 zeigt, wird im Schritt 1 das Ausgangssubstrat Androstendion an C₁₉ zum C₁₉-Hydroxyandrostendion hydroxyliert. Über die Bildung von 19,19-Dihydroxyandrostendion erfolgt in einem zweiten oxidativen Schritt die Bildung von 19-Oxoandrostendion. Der über eine weitere Oxydation zur Bildung von Estron führende dritte Schritt ist nach wie vor nicht völlig aufgeklärt; diskutiert werden die in Abbildung 10 angegebene drei Zwischenprodukte.

Bei dieser Reaktion sind drei Mol NADPH und drei Mol molekularer Sauerstoff für die Umwandlung von einem Mol Androstendion notwendig (BRUEGGMEIER 1990).

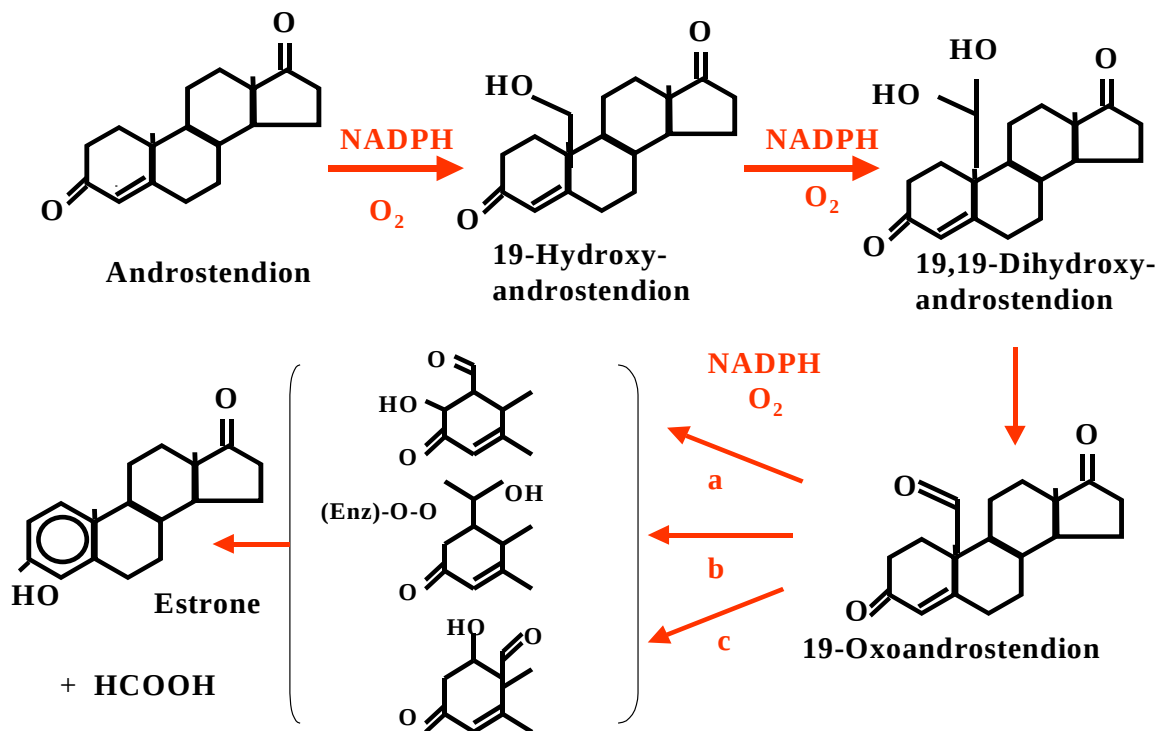


Abb. 10: Schematische Darstellung der Aromatisierung von Androstendion

Aromatase (Cytochrome P450_{arom}) ist ein Glykoprotein, dessen enzymatische Aktivität durch die Glykolisierung offensichtlich nicht beeinflusst wird (SHIMOZAWA et al. 1993, MEINHARDT und MULLIS 2002).

Cytochrome P450_{arom} ist das Produkt des CYP19 Genes, einem Mitglied der Cytochrome P450 Gen-Superfamilie. Diese setzt sich aus bis zu 100 Familien mit insgesamt mehr als 600 Mitgliedern zusammen. Cytochrome P450_{arom} ist das einzige Mitglied der Familie Nr.19 (THOMPSON und SIITERI 1974). Die Expression erfolgt gewebe-unspeziesspezifisch bei stark variierender Art und Lokalisation der Promotoren. Promotor in der Rinderplazenta ist P1.1., der keine Ähnlichkeiten in der Sequenz zum entsprechenden Promotor in der Human- oder Schafplazenta aufweist (Übersicht s. FÜRBASS et al. 2001). Daraus, sowie in Kombination mit alternativem Splicing, resultieren unterschiedlich Transkripte mit gewebespezifischen, nicht-translatierten 5'-Regionen aber identischen Kodierungs-Sequenzen (Geöffnete Leserahmen -, „Open Reading Frame“).

Daraus ergibt sich auch, wie für die Situation beim Menschen festgestellt wurde, dass das nach der Translation gebildete Protein „Aromatase“, unabhängig von der Lokalisation der Synthese, eine

praktisch identische Aminosäuresequenz aufweist (NELSON et al. 1996, SHIMOZAWA et al., 1993, SIMPSON et al. 1993, 1994, 2001, MEINHARDT und MULLIS 2002). Auch zwischen den Spezies weisen die kodierenden Sequenzen eine hohe Homologie auf. So konnte z.B. gezeigt werden, dass bei Mensch und Schwein das Splicing an der gleichen Stelle des CYP19-Gens erfolgt (HINSELWOOD et al. 1995). CONLEY und HINSELWOOD (2001) weisen darauf hin, dass das Festhalten an einer hoch konservierten kodierenden Region unbeschadet der sonstigen, unterschiedlichen Entwicklungen hinsichtlich der Größe des Gens stattgefunden hat. In der Literatur beschriebene monoklonale Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung von Aromatase konnten so durch gezielte Verwendung hoch konservierter Peptidsequenzen hergestellt werden (TURNER et al. 2002).

Nach TSUMAGARI et al. (1993) ist die $P450_{\text{arom}}$ Aktivität in den Kotyledonen höher als in den Karunkeln. Die im 4. Trächtigkeitsmonat in den Kotyledon gemessene Aktivität lag bei $1.10 \pm 0.36 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$. Ein Maximalwert von $2.76 \pm 0.96 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$ ergab sich während des 5. Trächtigkeitsmonats, gefolgt von einem Abfall ab dem 6. Monat der Gravidität. Unmittelbar vor der Geburt erreicht die $P450_{\text{arom}}$ Aktivität Maximalwerte um $3.62 \pm 0.78 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Die Aktivität der $P450_{\text{arom}}$ in den Kotyledonen zeigt zwei Gipfel über den Verlauf der Gravidität; die Aktivität in den Karunkeln ist dabei signifikant niedriger (Abbildung 11).

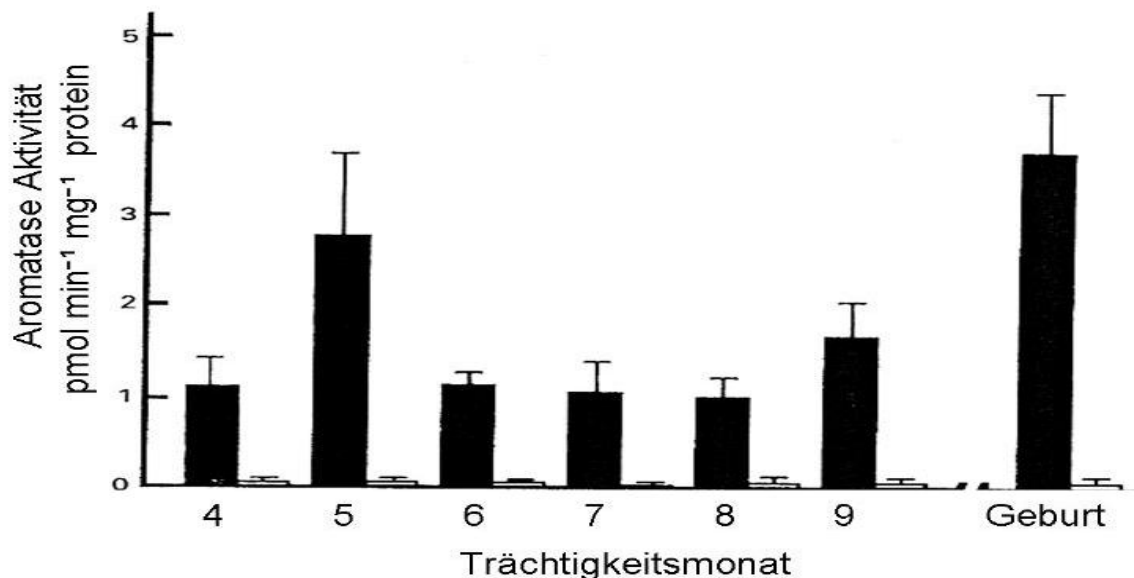


Abb. 11: Die Aktivität und die Konzentrationen der $P450_{\text{arom}}$ in Kotyledonen (■) und Karunkeln (□) (nach Tsumagari et al. 1993).

2.4.5 Ziel der Untersuchungen

Die Bildung von Steroidhormonen, hauptsächlich von Östrogenen und Progesteron, wird in der Plazenta der verschiedenen Haussäugetiere beobachtet. Beim Rind ist die Plazenta durch die Produktion großer Mengen an Östrogenen charakterisiert. Die biologische Bedeutung dieser placentaren Östrogenproduktion war bisher weitgehend unklar, sieht man davon ab, dass Östrogenen eine Rolle für das uterine Wachstum und die Mammogenese während der Gravidität zugeschrieben wurde. Obwohl das Corpus luteum über die gesamte Trächtigkeit in ausreichendem Umfang Progesteron zu deren Aufrechterhaltung produziert, sezerniert auch die Plazenta zwischen den Tagen 180 bis ca. 240 so viel Progesteron, dass dieses ausreicht, bei Abwesenheit eines Corpus luteum die Trächtigkeit aufrecht zu erhalten. In Erweiterung des bisherigen Kenntnisstandes konnte in vorausgehenden Untersuchungen die Expression von Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren im Plazentom des Rindes nachgewiesen werden (SCHULER et al. 1999, HOFFMANN und SCHULER 2002). Diese Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung der placentaren Östrogene und des placentaren Progesterons als lokale, parakrine Regelfaktoren des placentaren Wachstums und der placentaren Differenzierung hin (SCHULER et al. 1999).

Im Gegensatz zur ovariellen Steroidogenese liegen über die zeitliche Steuerung der placentaren Steroidogenese beim Rind und die daran beteiligten Zelltypen bisher nur wenige bzw. praktisch keine Informationen vor. Bekannt ist aus biochemischen Untersuchungen (SCHULER et al. 1994), dass die Rinderplazenta über ein komplettes Enzymspektrum zur Bildung von Östrogenen aus Pregnenolon verfügt. Unbekannt hingegen ist, zu welchem Zeitpunkt die jeweiligen, die Steroidbiosynthese steuernden Enzyme exprimiert werden, und in welchen Zellen dies der Fall ist. Erst mit dieser Information wird es möglich sein, auf parakrine und/oder autokrine Wirkungen zu schließen.

Ziel vorliegender Untersuchungen war es daher, die steroidogenen Enzyme auf zellulärer Ebene zu lokalisieren, um die folgenden Fragen beantworten:

- Ist die plazentare Steroidbiosynthese beim Rind auf zellulärer Ebene kompartmentiert?
- Ändert sich das Expressionsmuster steroidogener Enzyme im Verlauf der Differenzierung der einkernigen Trophoblastzellen zu Trophoblastriesenzellen?
- Gibt es regionale Unterschiede des Expressionsmusters steroidogener Enzyme innerhalb der Plazentome?
- Welche Änderungen ergeben sich mit dem massiven Anstieg der plazentaren Progesteronproduktion um den Tag 180 bzw. mit der präpartalen Umstellung der Progesteron- zur Östrogenproduktion?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere und Probenentnahmen

Die Untersuchungen wurden an Plazentomen von insgesamt 27 Kühen durchgeführt. Davon erfolgte die Probenentnahme in 18 Fällen nach der kommerziellen Schlachtung der Tiere auf dem Schlachthof Giessen. Die Bestimmung des Gestationsalters erfolgte anhand der Scheitel-Steiß-Länge (siehe Tabelle 2) (SCHNORR und KRESSIN 2001). Die entnommenen Plazentome wurden innerhalb von 30 Minuten in PBS-Puffer auf Eis vom Schlachthof zum Labor transportiert und dort aufbereitet.

Zur Erfassung unmittelbar präpartal ablaufender Regelvorgänge wurden weiterhin vier hochgravide Tiere mit bekanntem Besamungsdatum gekauft und zur Detektion des präpartalen Progesteronabfalls Messungen (ACS:180 Bayer-Progesterone-ACS Kit, Fernwald) in 8-stündigen Intervallen vorgenommen. Ziel war es, im Rahmen von Schnittentbindungen die Entnahme von Plazentomen vorzunehmen, sobald der maternale Progesteronspiegel nach einem kontinuierlichen Abfall eine Konzentration von 1,5 ng/ml (4.8 nmol/l) unterschritten hatte. Dies gelang bei drei Tieren, welche im Folgenden die als „präpartal“ bezeichnete Gruppe bilden (siehe Tabelle 3).

Bei keinem dieser Tiere waren äußerliche Anzeichen einer eingetretenen Geburt zu erkennen. Bei dem vierten Tier musste aufgrund eines technischen Defekts der Meßapparatur der Zeitpunkt der Probenentnahme (Tag 283) anhand klinischer Anzeichen einer unmittelbar bevorstehenden Geburt (hochgradiges Vulvaödem; zervikaler Schleimpfropf in Verflüssigung, Milchfüllung der Zitzen) festgelegt werden. Eine retrospektive Messung der Progesteronwerte zeigte jedoch, dass der präpartale Progesteronabfall zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch nicht eingetreten war. Das Probenmaterial dieses Tieres wurde ebenso wie das Probenmaterial einer in einem früheren Versuchsvorhaben gezielt am 270. Graviditätstag geschlachteten Kuh der Gruppe der graviden Tiere zugeordnet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Probenentnahme von graviden Rindern (Tag 100-243)

Nr.	Fetale Scheitel-Steiß-Länge	Trächtigkeitsdauer	Quelle	Rasse
1	20	100	KS	Hellbraun
2	23	109	KS	Hellbraun
3	24	112	KS	Hellbraun
4	33.5	136	KS	Schwarzbunt
5	36	142	KS	Hellbraun
6	41.5	154	Ks	Hellbraun
7	42	155	KS	Braun
8	55.5	182	KS	Hellbraun
9	56	183	KS	Rotbunt
10	57	185	KS	Dunkelbraun
11	58	187	KS	Schwarzbunt
12	63	196	KS	Schwarzbunt
13	72	211	KS	Schwarzbunt
14	76	217	KS	Rotbunt
15	86	233	KS	Schwarzbunt
16	87	234	KS	Rotbunt
17	-	270	VS	Rotbunt
18	-	283	S	Fleckvieh

KS : Probengewinnung bei kommerziellen Schlachtungen auf dem Schlachthof Giessen;

Berechnung der Graviditätsdauer aus der fetalen Scheitel–Steiß–Länge

VS: Gezielte Schlachtung eines Tieres mit bekanntem Besamungsdatum

S: Probengewinnung bei einem Tier mit bekanntem Besamungsdatum im Rahmen einer Schnittentbindung

Tabelle 3: Übersicht über die Probenentnahme bei präpartalen Rindern

Nr.	Tag der Gravidität zum Zeitpunkt der Probenentnahme	Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Probenentnahme	Rasse
1	277	0.7 ng/ml (2.2 nmol/l)	D. Rotbunt
2	273	0.3 ng/ml (0.9 nmol/l)	D. Rotbunt
3	283	1.4 ng/ml (4.5 nmol/l)	Fleckvieh

Zur Charakterisierung des Zustandes zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt wurden weiterhin einzelne Plazentome von 5 Tieren entnommen, die nach Ablauf einer physiologischen Gravidität und spontanem Geburtseintritt eine Dystokie infolge einer (relativ oder absolut zu großen Frucht) einer Schnittenbindung unterzogen werden mussten. In allen Fällen wurden reife und vitale Kälber entwickelt. Die Probengewinnung von lebenden Tieren wurde vorab der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Giessen) angezeigt und genehmigt (Aktenzeichen II 25.3 – 19c 20 / 15cG / 18 / 14).

Corpora lutea wurden als positives Kontrollgewebe ebenfalls nach kommerziellen Schlachtungen auf dem Schlachthof Giessen gewonnen und im weiteren Verlauf der Konservierung analog den Plazentomen behandelt.

3.2 Immunhistologische Untersuchungen

3.2.1 Konservierung von Probenmaterial in Paraformaldehyd

Die gefroren aufbewahrte Paraformaldehyd-Lösung (4 %) wurde vor Gebrauch 1 Stunde auf 55-60 °C erwärmt und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Ankunft im Labor wurden die Plazentome in maximal 1 cm³ große Stücke geschnitten und 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben zum Auswaschen des Fixans 24 Stunden bei 4 °C in PBS-Lösung aufbewahrt und anschließend über eine ansteigende Ethanolreihe (30 %-50 %-70 %) dehydriert. Zuletzt wurden die Gewebestücke in Paraffin eingebettet und auf kleine Holzstückchen aufblockt. In Paraformaldehyd fixierte und in Paraffin eingebettete Graaf'sche Rinderfollikel wurden von Frau Mar Fenech, Departement de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spanien, bereitgestellt.

3.2.2 Konservierung von Probenmaterial in Formalin

Die Plazentome wurden in maximal 1 cm³ große Stücke geschnitten und in 4 % igem neutral-gepuffertem Formaldehyd über Nacht fixiert. Danach wurden die Gewebeproben zum Auswaschen des Fixans in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2) 5-6 Tage aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde die Pufferlösung mehrfach gewechselt. Die Gewebeproben wurden schließlich 24 Stunden bei 4 °C in 70 % Ethanol dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. In Paraffin eingebettete, formalinfixierte Humanplazenta als Positivkontrolle für den immunhistologischen Aromatase-nachweis wurde von der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Verfügung gestellt.

3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis der 17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase (P450c17)

3.2.3.1 Färbeprotokoll

Die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der P450c17 wurden an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt. Zum Entparaffinieren wurden die ca. 4 μ m dicken Schnitte 2 x 4 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurde jeweils zweimal 2 Minuten in 100 %-, 95 %- bzw 70 %-igem Ethanol inkubiert. Danach wurden die Präparate 5 Minuten in laufendem Leitungswasser gespült. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden sie 30 Minuten in 0.3 %igem Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert und danach in einer 5-minütigen Inkubation in ICC-Puffer gewaschen.

Der immunhistologische Nachweis der P450c17 erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen rekombinante bovine P450c17 (PETERSON et al. 2001 - Quelle Prof. Dr. A. J. Conley, Department of Population Health and Reproduction, University of California, Davis, USA) und des VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Die Objektträger wurden aus der Küvette entnommen und überschüssiger Puffer durch vorsichtiges Aufschlagen der langen Kanten auf Papierhandtücher entfernt, wobei - wie bei den nachfolgenden Waschschritten - ein vollständiges Austrocknen der Gewebeschnitte unbedingt zu vermeiden war. Der Puffer wurde für die Dauer der Untersuchung bei Raumtemperatur aufgehoben und für die folgenden Waschschriffe wiederverwendet. Die Gewebeschnitte wurden auf der Oberfläche der Objektträger mit einem PapPen (G. Kisker - Biotech, Steinfurt) eng eingekreist. Zur Blockierung

unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit jeweils 150 µl Blockierungslösung, bestehend aus 1.5 % Ziegen Serum (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit) in ICC-Puffer, überschichtet und die Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die restliche Blockierungslösung wurde für die Verdünnung des Sekundärantikörpers aufgehoben.

Nach Absaugung der Blockierungslösung mit Papierhandtüchern wurden die Schnitte mit dem 1:5000 in ICC-Puffer verdünnten Primärantikörper überschichtet und in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht (ca. 20 Stunden) inkubiert. Danach wurden die Schnitte 5 Minuten in ICC-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger aus dem Puffer genommen und überschüssige Flüssigkeit mit Hilfe von Papierhandtüchern von den Schnitten entfernt. Es folgte das Auftragen des Sekundärantikörpers (biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen IgG, aus VECTASTAIN® Kit) in einer Verdünnung von 1:200 in verdünntem Ziegen Serum. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger 5 Minuten in ICC-Puffer gewaschen, mit Papiertüchern abgesaugt und mit dem Avidin-Biotin Komplex (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit) inkubiert, der zuvor nach Herstellerangaben in ICC-Puffer verdünnt und zur Äquilibration 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert worden war. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationsdauer wurden die Schnitte 5 Minuten in ICC-Puffer gewaschen, mit Papierhandtüchern abgesaugt und mit der nach Herstellerangaben vorbereiteten Substratlösung (Vector® Nova-RED, Vector Laboratories, Burlingame, USA) überschichtet. Die 8-minütige Entwicklung des Signals fand im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Die Schnitte wurden dann in Aqua dest. gewaschen, zur leichten Gegenfärbung zwei Sekunden in Hämatoxylin-Lösung getaucht und dann 10 Minuten im laufendem Leitungswasser gespült. Schließlich wurden sie über eine ansteigende Ethanolreihe (jeweils zwei 5-minütige Inkubationen, 70 %-80 %-95 %-100 %) sowie zwei 10-minütigen Inkubationen in Xylol dehydriert. Die Eindeckelung der Schnitte erfolgte mittels Histokitt (Assistent, Osterode).

In den Negativkontrollen wurde das spezifische Antiserum durch das gleichermaßen verdünnte Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens ersetzt.

3.2.3.2 Semiquantitative Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte

Die semiquantitative Auswertung der Färbereaktion erfolgte lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung. Von jedem Tier kamen jeweils drei von drei verschiedenen Paraffinblöcken stammende Schnitte zur Auswertung. Die immunhistologische Färbereaktion in den einkernigen Trophoblastzellen wurde anhand des Vergleichs mit zuvor definierten photographischen Standards als intensive Färbung (+++), deutliche Färbung (++), schwache Färbung (+) und keine Färbung (-) bewertet. Die Beurteilung erfolgte an definierten Lokalisationen des Zottenbaumes (s.Abb 12), wobei letztendlich für jedes Tier jeweils die insgesamt an den definierten Lokalisationen vorherrschende Signalstärke ermittelt wurde.

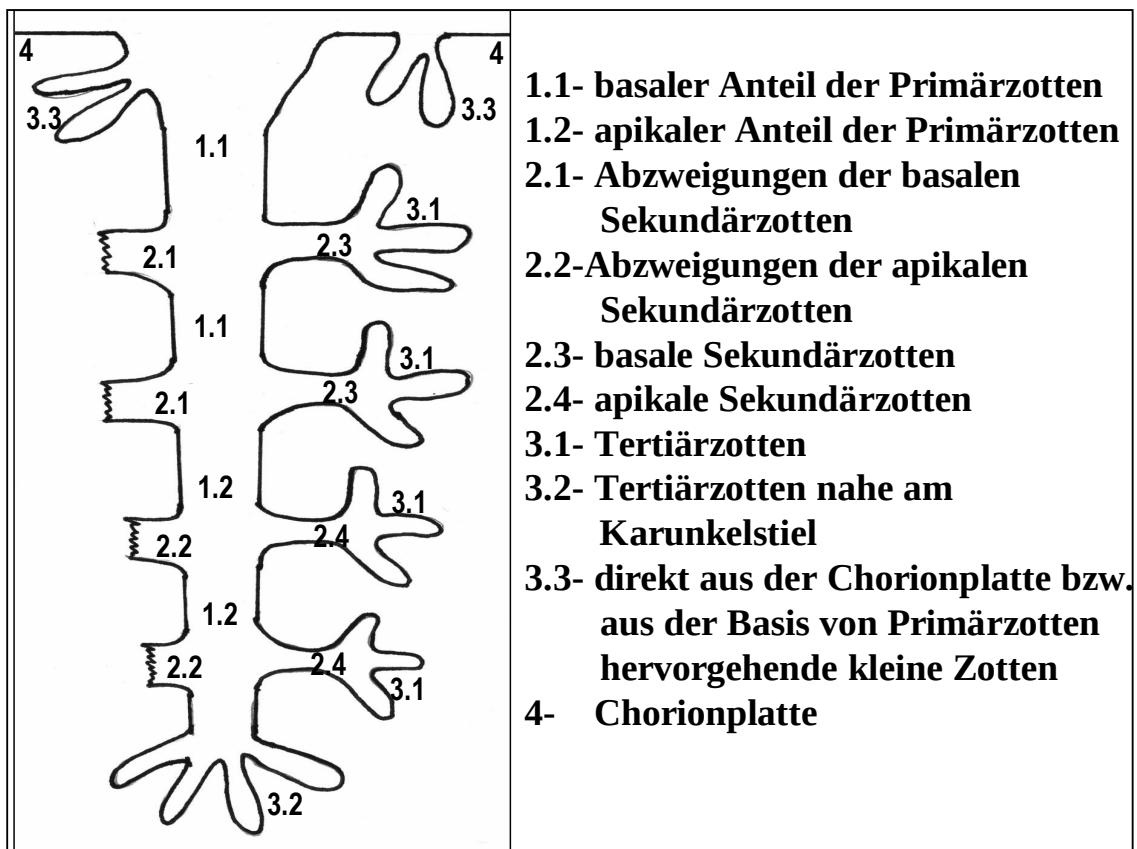


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Chorionzotte mit den definierten Lokalisationen, an denen eine semiquantitative Auswertung der Signalstärke vorgenommen wurde.

3.2.4 Immunhistologischer Nachweis der Aromatase

Die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der Aromatase wurden vergleichend mit zwei verschiedenen Primärantikörpern durchgeführt.

- 1) ein polyklonales Kaninchenantiserum, welches nach Immunisierung gegen rekombinante menschliche Aromatase gewonnen worden war. Dieses Antiserum wurde von Herrn Dr. N. Harada, Department of Biochemistry, Fujita Health University, School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan, zur Verfügung gestellt. Arbeitsverdünung in der Immunhistologie war 1:2000 in ICC-Puffer.
- 2) ein monoklonaler muriner Antikörper (Klon H4; Serotec, Düsseldorf, Katalog Nr: MCA2077), der gegen ein den Aminosäuren 376-390 der menschlichen Aromatase entsprechendes Peptid erzeugt wurde (TURNER et al. 2002). Dieser Abschnitt des Aromatasemoleküls ist bei zahlreichen Säugerspezies - darunter das Rind - vollständig konserviert. Angewendete Arbeitsverdünnungen in der Immunhistologie waren: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 in ICC-Puffer.

Da in Vorversuchen an formalinfixierten Plazentomproben sowie an Gefrierschnitten mit beiden Primärantikörpern keine eindeutig spezifischen Signale zu erzielen waren, wurden für diese Untersuchungen paraformaldehydfixierte Gewebeproben herangezogen, die in Vorversuchen eine bedingte Eignung erkennen ließen. Als Positivkontrollen diente ein präovulatorischer Ovarfollikel eines Rindes sowie Humanplazenta.

3.2.4.1 Färbeprotokoll unter Verwendung des polyklonalen Aromatase-Antiserums

Das Färbeprotokoll entsprach grundsätzlich dem in Abschnitt 3.2.3.1 für die immunhistologische Darstellung der P450c17 beschriebenen Verfahren. Als einziger Unterschied wurde nach Abschluss der Rehydrierung der Schnitte ein Antigen Retrieval durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte in eine Küvette mit Antigen Unmasking Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, USA) mit einem Zusatz von 0.5 % SDS platziert, in einem Wasserbad allmählich auf 95 °C erhitzt und für weitere 20 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert. Nach dem langsamen Abkühlen auf ca. 40 °C durch Herausnehmen der Küvette aus dem Wasserbad, wurden die Schnitte 2 x 2 Minuten in Aqua dest. gespült und weiter wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben behandelt. In den Negativkontrollen wurde das spezifische Antiserum durch das Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens in einer Verdünnung von 1:2000 in ICC-Puffer ersetzt.

3.2.4.2 Färbeprotokoll unter Verwendung des monoklonalen Primärantikörpers H4

Das Färbeprotokoll entsprach grundsätzlich dem in Abschnitt 3.2.4.1 beschriebenen Verfahren. Der einzige Unterschied bestand darin, dass - passend zur Wirtsspezies des Primärantikörpers - als Blockierungslösung und zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers die entsprechenden Reagenzien aus dem Maus-IgG-spezifischen VECTASTAIN® PK-6102 Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet wurden. In den Negativkontrollen wurde der spezifische monoklonale murine Primärantikörper durch einen isotypspezifischen irrelevanten Kontrollantikörper (MsIgG_{2a} Beckman Coulter Miami, USA) in den dem Primärantikörper entsprechenden Verdünnungen in ICC-Puffer ersetzt.

3.3 Überprüfung der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper im Western Blot

3.3.1 Herstellung mikrosomaler Fraktionen aus Plazentomen

Schockgefrorenes Plazentomgewebe wurde mit steriler Aluminiumfolie umwickelt und durch Schläge mit einem Hammer auf einer sauberen Oberfläche zertrümmert. Nach dem Auspacken aus der Aluminiumfolie wurden Gewebestückchen mit einem Gesamtgewicht von ca. 0.5 g in Plastik – Reaktionsgefäße (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) eingewogen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Puffer wurden am Tag der Verwendung frisch zubereitet und ebenso wie die verwendeten Behältnisse und Geräte auf Eis gekühlt.

Die abgewogenen Gewebeportionen wurden in das Hand-Homogenisiergerät (B.Braun, Melsungen AG) überführt und pro 0.1 g Gewebe 1.0 ml Mikrosomenpuffer zugegeben. Nach möglichst vollständigem Gewebeaufschluss wurden die resultierenden Homogenate in verschraubbare Zentrifugengläser (Omega Scientific, Tarzana) überführt und für die Zentrifugation austariert. Danach wurden sie bei 15000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Ultrazentrifugenröhrchen (Nalgene, MAGV, Rabenau-Londorf) abgegossen und bei 130000 g 1 Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die resultierenden Überstände entfernt und die Pellets in 500 µl Solubilizationspuffer resuspendiert. Bis zur Proteinbestimmung wurden die gewonnenen Mikrosomenfraktionen in 100 µl Aliquots bei –20 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in den mikrosomalen Fraktionen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch unter Verwendung des Protein Assay & Albumin Standard Kits (Pierce Biotechnology - Rockford, Illinois). Dieser Messmethode liegt die Biuret-Reaktion zugrunde.

Für jede Probe wurden jeweils 100 µl Stammlösung A, 2 µl Stammlösung B und 5 µl der Mikrosomenfraktionen in Glasröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) einpipettiert und die Reaktionsansätze bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurden 5 µl-Aliquots der Reaktionsätze in Messküvetten überführt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Probe durch Vergleich mit einer BSA-Standardreihe bestimmt.

3.3.2.1 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese wurde das Hoefer® Mighty Small SE 260 system (Amersham Pharmacia, Biotech) verwendet. Die verwendeten Minigele besaßen die Dimension 10 cm x 10.5 cm x 1.5 mm.

Vor dem Zusammenbau der Gelkassette wurden die Bestandteile mit Aqua dest und 96 %igem Ethanol gereinigt und an der Luft vollständig getrocknet. Zur Herstellung des Trenngels wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Komponenten in der dort angegebenen Reihenfolge in einen Erlenmeyerkolben vereinigt und durchmischt. Die so hergestellte Trenngellösung wurde dann mit einer Pasteurpipette luftblasenfrei in die Gelkassette eingefüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel ca. 3 cm unter dem oberen Rand der Gelkassette stand. Zur Ausbildung einer möglichst linearen Grenzfläche während der Polymerisation wurde die Trenngellösung vorsichtig mit Aqua dest überschichtet.

Tabelle 4: Herstellung der Trenngellösung mit 10 %iger Acrylamidkonzentration

30 % Acryla Gel	5.8 ml
2 % Bis-Acryla Gel	2.3 ml
1.5 M Tris pH 8.8	4.5 ml
Glycerin	2.7 ml
2 % Polyacrylamid	2.7 ml
20 %-ige APS-Lösung	30 µl
TEMED	6 µl

Tabelle 5: Herstellung der Sammelgellösung mit 5 %iger Acrylamidkonzentration

30 % Acryla Gel	590 µl
2 % Bis Acryla-Gel	180 µl
0.5 M Tris pH 6.8	1.5 ml
Aqua dest	3.7 ml
20 %-ige APS-Lösung	50 µl
TEMED	5 µl

Nach der vollständigen Polymerisation (ca. 30-45 Minuten bei Raumtemperatur) wurde das über dem Trenngel stehende Wasser abgegossen und Wasserreste vollständig mit fusselfreien Papiertüchern (Kimwipes, Ladd Industries, Williston) abgesaugt. Danach wurde mit einer Pasteurpipette die 5 %-ige Sammelgellösung (Herstellung s. Tabelle 5) bis zum oberen Rand der Gelkassette auf das Trenngel gegossen und zur Herstellung der Ladetaschen die kammförmige Taschenschablone eingesetzt. Nach ca. 30-minütiger Polymerisation bei Raumtemperatur war das Gel gebrauchsfertig. Die Gelkassetten wurden dann in die Elektrophoresekammer (Hoefer® Mighty Small SE 260 System, Amersham Pharmacia, Biotech) eingespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt.

Zur Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut, durchmischt und ein der gewünschten Proteinmenge entsprechendes Aliquot im Volumen-verhältnis 4:1 (Probe/

Puffer) mit dem Roti® Load 1 Ladepuffer (Carl Roth GmbH Co., Karlsruhe) versehen. Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend zur Denaturierung der Proteine für 3 Minuten im Wasserbad gekocht.

Nach Entfernung der Taschenschablone wurden die vorbereiteten Proben sowie die Molekulargewichtsmarker-Lösung SDS-7B (Sigma, Deisenhofen) mittels einer Spritze (Syringe Hamilton Company, Reno, Nevada) auf den Boden der Ladetaschen im Sammelgel verbracht. Die Elektrophorese wurde in zwei Phasen durchgeführt. Für das Durchwandern des Sammelgels wurde eine Spannung von 90 V und eine Stromstärke von 20 mA gewählt. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 180 V bei Stromstärken zwischen 20-30 mA. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front (aus dem Ladepuffer) den unteren Gelrand erreicht hatte.

3.3.2.2 Elektroblothing

Für den elektrischen Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran (Millipore Transferrmembrane, Immobilon-P, Bedford, USA) wurde die Blot-Einrichtung (BioRad Mini Trans Blot® 37 / S, Italy) mit Blotpuffer gefüllt und das zugehörige Kühlelement in der entsprechenden Halterung befestigt. Als weitere Vorbereitung wurden eine der Größe des Gels entsprechende Nitrozellulose-Membran sowie zwei Filterpapiere (Munktell, Schweden) zugeschnitten. Zur Aktivierung wurde die Nitrozellulose-Membran 10 Sekunden in Methanol geschwenkt und 2 Minuten in Aqua bidest. gespült. Auf die Bodenplatte der Kassette der Blotapparatur wurden eine Schaumstoffmatte und darüber ein Filterpapier gelegt, welche zuvor mit Blotpuffer durchtränkt worden waren. Darauf wurde das aus der Gelkassette herausgenommene und vom Sammelgel befreite Trenngel aufgebracht. Hierauf wurde die Nitrozellulose-Membran und ein weiteres feuchtes Filterpapier aufgelegt. Erkennbare Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab entfernt. Nach Auflegen einer feuchten Schaumstoffmatte auf den Stapel wurde die Blot-Kassette geschlossen und in der Apparatur platziert. Der Proteintransfer erfolgte über eine Stunde bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA. Die Blotapparatur war hierbei auf einem Magnetrührer platziert, welcher einen Rührkern in der Blotkammer bewegte, um einer lokalen Erhitzung der Apparatur entgegenzuwirken.

3.3.2.3 Nachweisreaktion

Nach Ablauf der Übertragungsdauer wurde die Membran aus der Blot-Kassette herausgeholt und zur Orientierung durch Abschneiden der rechten oberen Ecke gekennzeichnet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran dann über Nacht bei 4 °C in einer Blockierungslösung, bestehend aus 2.5 g Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell) in 50 ml PBST-Puffer, inkubiert.

Am zweiten Tag wurde die Membran zunächst unter leichtem Schwenken kurz in PBST-Puffer gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper, verdünnt in PBST, 75 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung für das P450c17-Antiserum war 1:5000, für das Aromatase-Antiserum 1:2000 und für den monoklonalen anti-Aromatase-Antikörper H4 1:200. Zum Einsparen der Primärantikörper wurde die Membran in eine untere Ecke eines kleinen haushaltüblichen Gefrierbeutels platziert und die dritte Seite mit einem Folienschweißgerät knapp entlang der Kante der Membran verschlossen und der überstehende Anteil abgeschnitten. Danach wurde in den so verkleinerten Beutel 1 ml der Primärantikörperlösung eingefüllt. Nach Entfernen von Luftblasen durch vorsichtiges Abrollen eines Glasstabes auf dem senkrecht gegen eine ebene Fläche gehaltenen Beutel von unten nach oben, wurde die vierte obere Seite zugeschweißt. Dann wurde die eingeschweißte Membran mit Klebeband möglichst gestreckt auf einer Glasplatte befestigt und diese auf einem Taumelschüttler platziert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer von 75 Minuten wurde die Membran von der Folienhülle befreit und dreimal 10 Sekunden und dann dreimal 5 Minuten in einer Schale mit PBST-Puffer auf dem Taumelmischer gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Spülschritten die Spüllösung gewechselt wurden. Die Inkubation in der Sekundärantikörperlösung erfolgte nach dem für den Primärantikörper beschriebenen Verfahren. Für die polyklonalen primären Kaninchen-Antiseren gegen P450c17 bzw. Aromatase wurde als Sekundärantikörper ein Peroxidase-gekoppelter Esel anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Chemicon International, Temecula) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBST-Puffer verwendet. Als Sekundärantikörper für den monoklonalen anti-Aromatase-Antikörper H4 diente ein Peroxidase-gekoppelter Schaf anti-Maus-IgG-Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg), welcher 1:5000 in PBST-Puffer verdünnt worden war. Nach Ablauf der 45-minütigen Inkubationsdauer wurde die Membran aus der Folienhülle entnommen und nach dem oben beschriebenen Verfahren gewaschen. Zur Darstellung der Immunreaktion wurde ein Chemoluminiszenzverfahren angewendet. Dazu wurde nach Abschluss des Waschens die Membran auf eine dünne, haushaltsübliche Frischhaltefolie platziert, mit der ECL-Lösung – bestehend aus jeweils 0.5 ml Supersignal® West Pico Stable / Peroxidase Lösung bzw. Supersignal® West Pico

Stable / Luminol Enhancer Lösung (Pierce, Rockford) - benetzt und dann vollständig in die Frischhaltefolie eingeschlagen. Die umhüllte Membran wurde an den Ecken mit Klebeband auf dem Boden einer Röntgenfilmkassette fixiert. Nach dem Auflegen eines Röntgenfilmes im Dunkeln wurde die Kassette geschlossen. Um ein optimales Signal / Hintergrund-Verhältnis zu erzielen, wurden von einer Membran mehrere Filme mit ansteigender Expositionsdauer, ausgehend von 10 Sekunden, belichtet. Nach Ablauf der jeweiligen Expositionsdauer wurden die belichteten Filme im Dunkeln aus der Kassette entnommen und in einem vollautomatischen praxisüblichen Röntgenentwickler entwickelt.

3.4 Lokalisierung der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 4/5 Isomerase (3 β -HSD) – Expression in den Rinderplazentomen mittels In situ Hybridisierung

Zur immunhistologischen Darstellung der 3 β -HSD auf zellulärer Ebene stand kein entsprechender kommerziell erhältlicher Primärantikörper zur Verfügung. Ein von Prof. Ian Mason (University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland) bereitgestelltes polyklonales Kaninchenserum (RI484) gegen die 3 β -HSD Typ II des Menschen (adrenale / gonadale Isoform) wurde an bovinem Plazenta- bzw. Lutealgewebe mit negativem Ergebnis getestet. In Ermangelung eines Verfahrens zur Lokalisation der 3 β -HSD auf Proteinebene wurde daher auf die RNA-Ebene ausgewichen und anhand der von ZHAO et al. (1989) publizierten Nukleinsäuresequenz (Accession Nr. X17614) ein In Situ Hybridisierungsverfahren etabliert.

3.4.1 Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden mittels In Vitro-Transkription unter Verwendung PCR – generierter Matrizen – DNA

Die verwendete Digoxigenin-markierte mRNA-Sonde wurde in Anlehnung an das von DIVJAK et al. (2002) beschriebene Verfahren durch in vitro-Transkription hergestellt, wobei als Matrize das Produkt einer Nested PCR diente, in deren zweiten Schritt die Promoter-Sequenzen für SP6 bzw. T7 an das 5'-Ende der Primer angehängt waren (s. Abb.13).

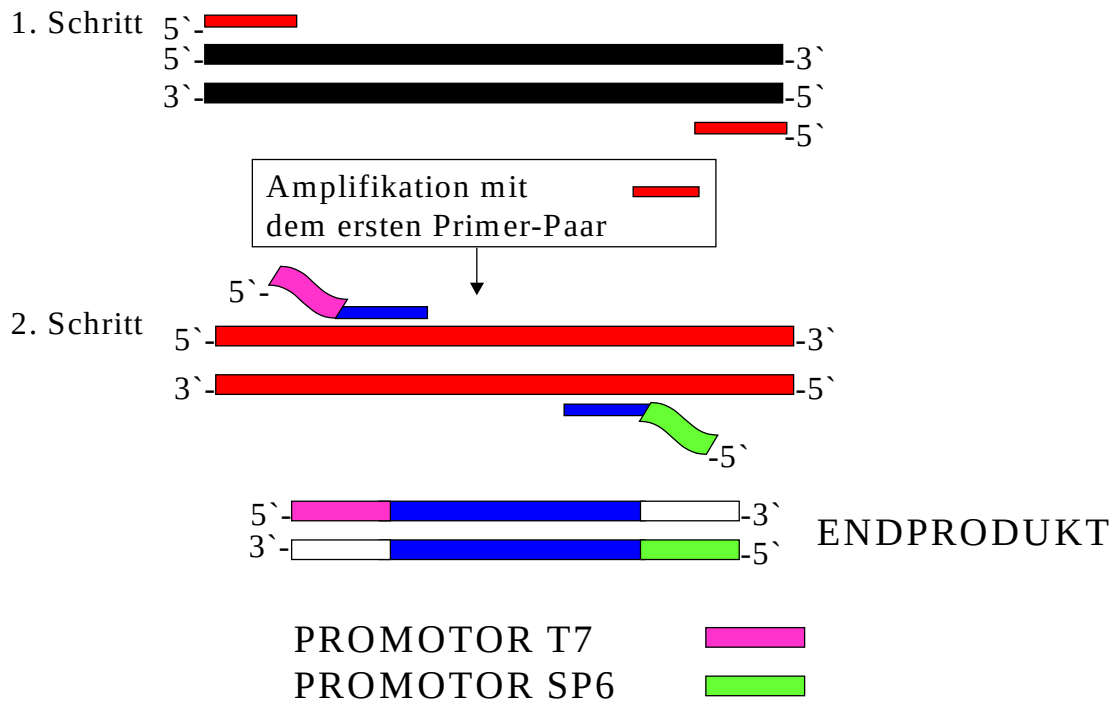


Abb. 13: Schematische Darstellung der Herstellung der DNA-Matrize für die Sonderherstellung

3.4.1.1 RNA-Isolierung aus Plazentomen

Für die Vorzerkleinerung des Gewebes wurde ein steriler bei -85°C vorgekühlter Mörser in einem Eisbad plziert und mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Die großen, zuvor bei -85°C gelagerten Gewebestücke (Kotyledonen) wurden mit einer Aluminiumfolie umwickelt und durch Schläge mit einem sauberen Hammer vorzerkleinert. Die resultierenden Gewebesplitter wurden rasch aus der Aluminiumfolie herausgenommen, in den vorbereiteten Mörser überführt und mit einem sterilen vorgekühlten Pistill unter flüssigem Stickstoff zerrieben. Nach Abschluss des Zerkleinerungsprozesses wurden ca. 200 mg des gefrorenen Gewebepulvers in sterile Glaszentrifugenröhrchen eingewogen, die 3 ml RLT Puffer aus dem RNeasy RNA Isolation Kit (Qiagen GmbH, Hilden) mit einem Zusatz von 30 μl β -Mercaptoethanol enthielten.

Die weitere RNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des oben genannten Kits exakt nach dem Protokoll der Herstellerfirma.

Die RNA-Konzentrationen (mg/µl) in den aufbereiteten Präparationen wurden mittels eines UV-Spektrometers (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Hamburg) bestimmt. Dazu wurden jeweils 5 µl RNA-Präparation und 95 µl DEPC Wasser in Kunststoff-Einmalküvetten (Eppendorf Uvette® 220-1600 nm, Westbury, USA) pipettiert und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Als Leerwert wurde DEPC-Wasser verwendet.

Schließlich wurde die isolierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.4.1.2 Reverse Transkription und erster PCR Schritt

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des RT-PCR Core Kits (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) durchgeführt. Zunächst wurde aus den RNA-Aufarbeitungen eine Vorverdünnung in DEPC-Wasser mit einer Konzentration von 10 ng in 1.5 µl hergestellt. Die Ansätze für die reverse Transkription (RT) wurden in Plastikreaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) auf Eis aus 1.5 µl RNA-Vorverdünnung und 8.5 µl RT-Mastermix (Zusammensetzung s. Tabelle 6) angesetzt.

Tabelle 6: Die Zusammensetzung des RT-Mastermixes für die reverse Transkription

Komponenten	Einfacher Ansatz (in µl)	Stammlösung	Gebrauchslösung
MgCl ₂	2	25 mM	5 mM
10 x PCR-Puffer*	1	10 x	1 x
dGTP	1	10 mM	1 mM
dTTP	1	10 mM	1 mM
dATP	1	10 mM	1 mM
dCTP	1	10 mM	1 mM
Random Hexamers	0.5	50 µM	2.5 µM
RNAse-Inhibitor	0.5	20 U/µl	1 U/µl
Reverse Transkriptase	0.5	50 U/µl	2.5 U/µl
Gesamtvolumen	8.5		

* bestehend aus 500 µM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3

Die reverse Transkription wurde in einem T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen) bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

8 min. bei 21 °C

15 min. bei 42 °C

5 min. bei 99 °C

5 min. bei 5 °C

bis zur Entnahme aus dem Thermozykler : 4 °C

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden zunächst die zuvor aus der Anzahl der Ansätze errechneten benötigten Mengen an MgCl₂-Lösung, 10 x PCR-Puffer und DEPC-Wasser zum PCR-Prämix vereinigt (Zusammensetzung siehe Tabelle 7)

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Prämix. Das Pipettieren erfolgt auf Eis.

Komponenten	Einfacher Ansatz (in µl)	Stammlösung	Gebrauchslösung
MgCl ₂	2	25 mM	1 mM
10 x PCR-Puffer	4	10 x	1 x
DEPC-Wasser	32.75		
Gesamtvolumen	38.75		

Im zweiten Schritt wurden aus dem PCR-Prämix, den Primern und der DNA-Polymerase der Primer-Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) hergestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Primer-Mix. Das Pipettieren erfolgt auf Eis.

Komponenten	Einfacher Ansatz (in µl)	Stammlösung	Gebrauchslösung
PCR-Prä-Mix	38.75	-----	-----
Primer-Vorverd.-Mix*	1.00	10 pmol/µl	0.2 pmol/µl
GOLD Amplitaq	0.25	5 U/µl	0.025 U/µl
Gesamtvolumen	40		

* Vorverdünnungen für Sense- und Antisense-Primer (jeweils 20 pmol/µl in DEPC-Wasser) wurden im erforderlichen Volumen im Verhältnis 1:1 vereinigt. Im Primer-Vorverdünnungs-Mix liegen die beiden Primer somit in einer Konzentration von 10 pmol/µl vor.

Im letzten Pipettierschritt wurde dann pro Ansatz 40 µl Primer-Mix zu den 10 µl RT-Ansatz (cDNA aus der reversen Transkription) zugegeben. Vor dem Start der PCR wurden die Ansätze für 10 Sekunden zentrifugiert. Die Reaktionsbedingungen des ersten PCR-Schritts sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen der ersten PCR innerhalb der Nested PCR zur Herstellung der DNA-Matrizen für die Sondenherstellung

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94 °C	1 min	
Beginn der Zyklen			
Denaturierung	94 °C	1 min	39 Wiederholungen
Anlagerung	58.5 °C	2.15 min	
Verlängerung	72 °C	1.30 min	
Ende der Zyklen			
Finale Verlängerung	72 °C	6 min	
Bis zur Entnahme	4 °C		

Das verwendete Primer-Paar (s. Tabelle 10) wurde mit Hilfe der Software Oligo Analyser 1.0.2 / Oligo Explorer 1.1.0. (freeware aus dem Internet; © Teemu Kuulasmaa, University of Kuopio, 70211 Kuopio, Finnland) erstellt und führt zur Amplifizierung eines 690 Basenpaare großen Fragments (s. Abbildung 14).

Tabelle 10: Nukleotidsequenzen des im ersten Schritt der Nested PCR verwendeten Primerpaares und deren Position in einer publizierten rinderspezifischen 3 β -HSD-mRNA (Accession Nr. X17614). Die Länge des entsprechenden Amplikons beträgt 690 Nukleotide (nt).

Primer	Basensequenz	Position(nt)
3 β -HSD-for	5´ - CTA AGC TCC AGA GCA AGA TCA AG -3´	247 – 269
3 β -HSD-rev	5´ - GCG TGT CGT CTG AGA TGT AGT AG -3´	885 – 863

3.4.1.3 Zweiter PCR-Schritt unter Verwendung Promoter-gekoppelter Primer

Die Reaktionsansätze im zweiten PCR-Schritt setzten sich jeweils aus 80 µl Primer-Mix und 20 µl des Reaktionsproduktes des ersten PCR-Schrittes (s. Abschnitt 3.4.1.2) zusammen. Vor dem Start der PCR wurden die Ansätze für 10 Sekunden anzentrifugiert. Die Reaktionsbedingungen des 2. PCR-Schritts sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die verwendeten, innerhalb des ersten amplifizierten Fragments ansetzenden Sense- und Antisense-Primer setzten sich aus einem 3β-HSD-spezifischen Anteil sowie einer am 5'-Ende angehängten Promotorsequenz der SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase zusammen (s. Tabelle 12). Hierdurch wurde ein 286 Basenpaare langes DNA-Fragment amplifiziert, dessen interner 3β-HSD-spezifischer Anteil in Sense-Richtung am 5'-Ende vom Sp6-Promoter, in Antisense-Richtung vom T7-Promoter flankiert wurde (s. Abbildung 13 in Abschnitt 3.4.1).

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der zweiten PCR innerhalb der Nested PCR zur Herstellung der DNA-Matrizen für die Sondenherstellung. Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen im ersten Zyklus und den Folgezyklen erklären sich dadurch, dass im ersten Zyklus nur jeweils der 3β-HSD-spezifische Anteil der Primer binden kann.

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95 °C	1 min	erster Zyklus
Anlagerung	53 °C	2 min	
Verlängerung	72 °C	1.30 min	
1 Beginn der Folgezyklen			
Denaturierung	95 °C	1 min	39 Wiederholungen
Anlagerung	65 °C	2 min	
Verlängerung	72 °C	1.30 min	
2 Ende der Zyklen			
Finale Verlängerung	72 °C	6 min	
Bis zur Entnahme	4 °C		

Tabelle 12: Sequenzen der im 2. Schritt der Nested PCR verwendeten Primer, die sich aus einem 3 β -HSD-spezifischen Anteil sowie den Promotersequenzen für Sp6 RNA-Polymerase (Sense) bzw. T7 RNA-Polymerase (Antisense) zusammensetzen. Die Promotersequenzen sind durch Unterstreichen gekennzeichnet. Weiterhin sind die Positionen der 3 β -HSD-spezifischen Primeranteile in einer publizierten rinderspezifischen 3 β -HSD-mRNA (Accession Nr. X17614) angegeben. Die Länge des entsprechenden Amplikons beträgt 286 Nukleotide (nt).

Primer	Basensequenz	Position(nt)
SP6 + 3 β -HSD (ANTISENSE PROBE)	5' -CG <u>ATT TAG GTG ACA CTA TAG</u> ACC TGT CCT TGG ATG TTT GG-3'	619 - 638
T7+3 β -HSD (SENSE PROBE)	5' -AAT <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG</u> CTC TGA AAA ATG GTG GC-3'	845 - 860

3.4.1.4 Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte beider Schritte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurde 0.68 g Agarose in 34 ml 1 x TBE Puffer durch vorsichtiges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der 2 %-igen Agaroselösung bei Raumtemperatur auf 60-65 °C wurden 0.8 μ l Ethidiumbromidlösung (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugegeben, die Lösung durch vorsichtiges Schwenken unter Vermeidung von Luftblasenbildung durchmischt und luftblasenfrei in ein Geltablett der horizontalen Gelelektrophoresekammer (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) gegossen und der 20-zählige Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Taschenschablone und die Gummi-Endblöcke des Geltablets entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingelegt und diese mit Laufpuffer bis ca. 0.5 cm oberhalb des Agarosegels gefüllt. Nach Zusatz von 1.5 μ l Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zu jeweils 15 μ l der Proben wurde das Gemisch in die Geltaschen einpipettiert. 1.5 μ l des DNA-Größenstandards (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurden nach Zugabe von 1.5 ml Ladepuffer und 7 μ l DEPC-Wasser ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde der Sicherheitsdeckel geschlossen und die Anschlüsse mit dem Stromgeber (LKB Bromma, Golden, USA) verbunden. Die ca. 30 minütige Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 125 V und einer Stromstärke von 300 mA. Die Detektion der elektrophoretisch getrennten Pro-

ben erfolgte mittels UV-Licht. Durch die Interkalierung von Ethidiumbromid mit der DNA werden die Amplifikate unter UV-Licht als helle Bänder sichtbar.

Bei der Analyse des Reaktionsproduktes aus der ersten PCR war in allen untersuchten Proben nur eine einzige kräftige Bande im erwarteten Bereich von 680 Basenpaaren nachweisbar (s. Abbildung 14). Bei der Sequenzierung (Qiagen, Hilden) bestätigte sich eine vollständige Identität der Nukleotidfolge des PCR-Produkts mit dem entsprechenden Abschnitt der von ZHAO et al. (1989) publizierten Sequenz (Accession Nr. X17614).

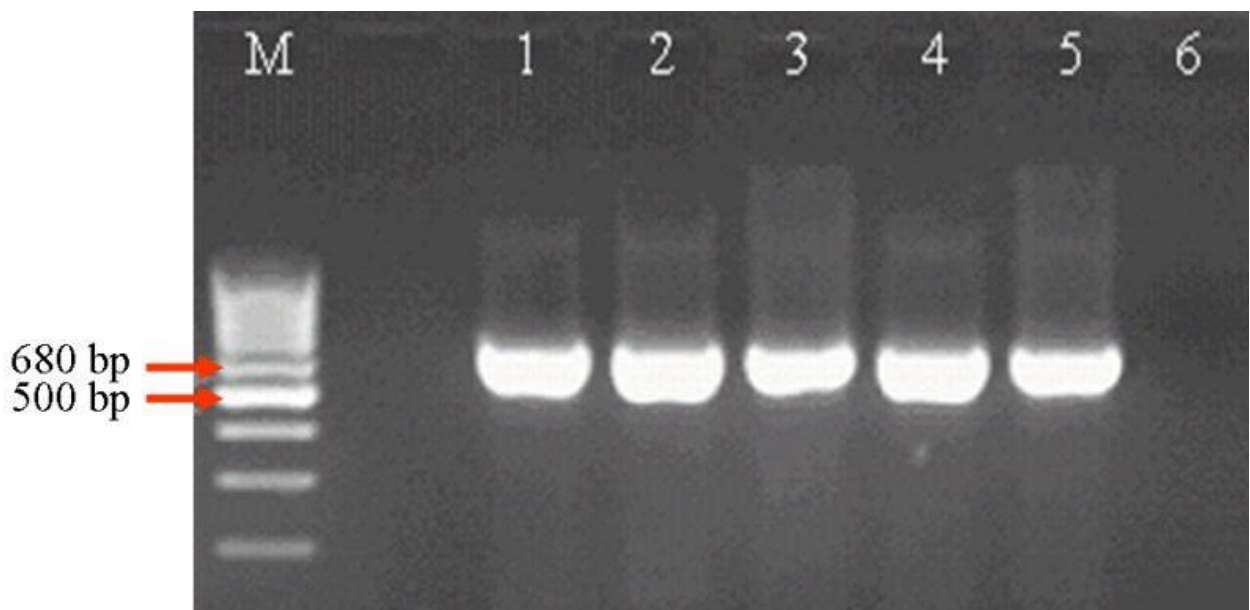


Abb. 14: Analyse von Reaktionsprodukten aus dem ersten Schritt der für die 3 β -HSD des Rindes spezifischen Nested PCR.

- M** = Größenmarker (100 bp Ladder).
- 1-5** = Reaktionsprodukte unter Verwendung von Kotyledonen aus 220-260 Tage graviden Rindern als Probenmaterial.
- 6** = Negativkontrolle (RT-PCR unter Verwendung von DEPC-Wasser anstelle einer RNA-Präparation).

Bei der Analyse der Reaktionsprodukte aus dem zweiten Schritt der RT-PCR war in allen Proben neben einer kräftigen Bande im erwarteten Bereich von 286 Basenpaaren eine schwächere Bande im Bereich von 680 Basenpaaren zu erkennen (s. Abbildung 15). Hierbei handelte es sich offensichtlich um das als Matrize verwendete Reaktionsprodukt aus der ersten PCR.

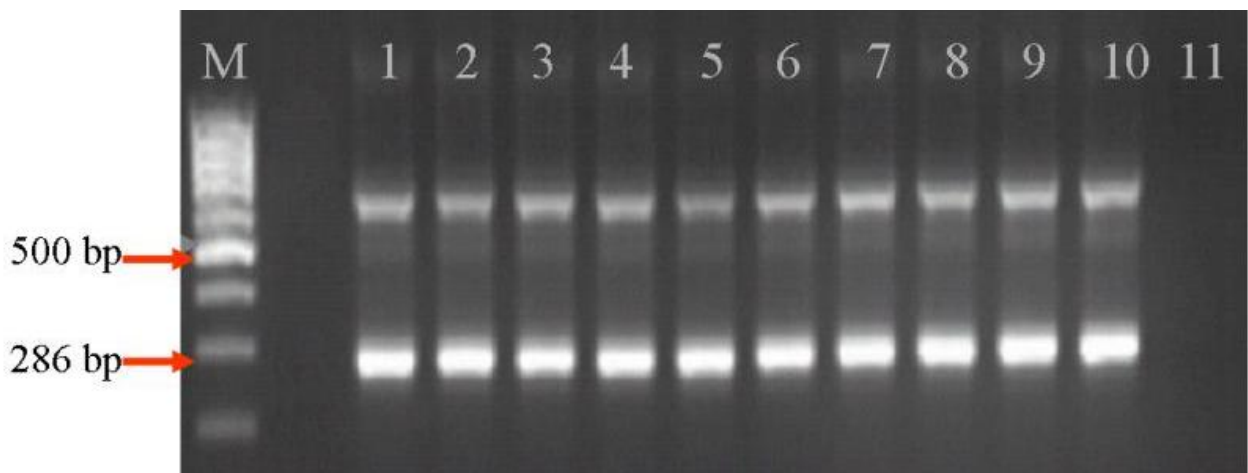


Abb. 15: Analyse von Reaktionsprodukten aus dem zweiten Schritt der für die 3 β -HSD des Rindes spezifischen Nested PCR unter Verwendung von Primern, an deren 5'-Ende die Promotoren für die in vitro-Transkription angehängt waren. Neben der spezifischen Bande mit der erwarteten Länge von 286 bp ist eine weitere Bande im Bereich von 680 bp zu erkennen, bei der es sich offensichtlich um das als Matrice in die Reaktionsansätze eingebrachte Produkt der ersten PCR handelte.

- M** = Größenmarker (100 bp Ladder).
1-10 = Reaktionsprodukte unter Verwendung von Kotyledonen aus 220-260 Tage graviden Rindern als Probenmaterial.
11 = Negativkontrolle (RT-PCR unter Verwendung von DEPC-Wasser anstelle einer RNA-Präparation).

3.4.1.5 Reinigung der DNA-Matrizen

Das von den Sp6- bzw. T7-Promoter-Sequenzen flankierte PCR-Produkt aus Abschnitt 3.4.1.3. wurde vor dem Einsatz als Matrice für die Sondenherstellung säulenchromatographisch unter Verwendung des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden) gereinigt, wobei exakt dem Protokoll der Herstellerfirma gefolgt wurde. Im letzten Schnitt wurden zur Elution der an das Säulenmaterial adsorbierten DNA 50 μ l Aqua bidest. aufgetragen und nach Ablauf einer Minute die Säule bei 10000 g 60 Sekunden zentrifugiert. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde im Spektrophotometer gemessen.

3.4.1.6 In vitro-Transkription

Für die Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde mittels in vitro-Transkription wurde der DIG RNA Labeling Kit (SP6 / T7) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) exakt nach Herstellerangaben verwendet. Als Matrize dienten 13 µg des aufgereinigten Produktes aus der in Abschnitt 2.4.1.3. beschriebenen PCR. Die Transkription in antisense-Richtung unter Verwendung der SP6-Polymerase ergab die für die 3ß-HSD des Rindes spezifische Sonde. Durch die Transkription in sense-Richtung unter Verwendung der T7-Polymerase wurde eine "Sonde" für die negativen Kontrollen synthetisiert. Nach Abschluss der in vitro-Transkription wurde zu den Reaktionsgefäßen 2 µl DNase I-Lösung (aus DIG RNA Labelling Kit SP6 / T7) pipettiert, um die Matrizen-DNA zu verdauen. Nach Ablauf der 15-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde der DNA-Verdau durch Zugabe von 2 µl Stopplösung (0.2 M EDTA, pH 8.0) beendet.

3.4.1.7 Abschätzung der Arbeitsverdünnung der Digoxigenin-gekoppelten mRNA-Sonde für die In situ-Hybridisierung

Zum Nachweis der erfolgreichen Herstellung Digoxigenin-gekoppelter RNA (dig-RNA) und zur Abschätzung der Arbeitsverdünnung der hergestellten Sonde in der in situ-Hybridisierung wurde das Reaktionsprodukt aus der in vitro-Transkription (s. Abschnitt 3.4.1.6.) an eine Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gebunden und anschließend ein immunologischer Digoxigenin-Nachweis analog dem Detektionsverfahren bei der in situ-Hybridisierung geführt. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe den hergestellten dig-RNA in autoklaviertem Wasser in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 hergestellt. Ebenso wurden als Positivkontrolle und zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung Verdünnungen des dig-RNA-Standards (100 ng/µl) aus dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) in den Konzentrationen 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.625 ng/µl vorbereitet. Zur Bindung der dig-RNA an die Nylonmembran wurden jeweils 1 µl der Lösungen aus den Verdünnungsreihen in regelmäßigen Abständen aufgetragen und die Membran nach dem Eintrocknen der Spots 30 Minuten bei 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 30 Minuten in Detektionspuffer I mit einem Zusatz von 2 % Schafserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) und 0.3 % Triton X-100 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran unter leichtem Schütteln 3 x 5 Minuten in Detektionspuffer I mit 0.1 % Tween 20 gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation in einer Verdünnung des Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Schaf-anti-Digoxigenin Antiserums (1:1000

verdünnt in Detektionspuffer I / 1 % Schafserum / 0.3 % Triton X-100) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran 2 x 5 Minuten in Detektionspuffer I mit 0.1 % Tween 20 und dann 5 Minuten in Detektionspuffer III mit 0.1 % Tween 20 gewaschen. Schließlich wurde die Membran mit der NBT/BCIP-Substratlösung (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) überschichtet und nach einminütiger Inkubationsdauer die Farbreaktion durch gründliches Abspülen der Substratlösung mit Leitungswasser beendet. Empirisch hat sich die höchste Sonden-Verdünnung als geeignet für erste Testversuche in der in situ-Hybridisierung erwiesen, die nach einminütiger Substrat-Inkubation noch ein deutliches blau-schwarzes Signal erzeugte. Vergleiche mit der parallel inkubierten dig-RNA-Verdünnungsreihe ergaben, dass dies einer dig-RNA-Konzentration zwischen 1.25 bis 2.5 ng / μ l entsprach.

3.4.2 In situ-Hybridisierung

3.4.2.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA in den Plazentomen des Rindes erfolgte in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Probenmaterial. Als positives Kontrollgewebe diente ein Rinder gelbkörper. Von den Gewebelöcken wurden ca. 8-10 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden zur Entparaffinierung einmal 5 Minuten im Brutschrank bei 60 °C und zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in Xylol inkubiert. Die Rehydrierung erfolgte durch Inkubationen zweimal 5 Minuten in reinem Ethanol, kurz in 96 %igem Ethanol und 5 Minuten in 70 %igem Ethanol. Die Objektträger wurden dann kurz in Wasser, 20 Minuten in 0.2 M HCl zur Entfernung basischer Proteine und 15 Minuten in 2 x SCC-Puffer im Wasserbad bei 70 °C inkubiert. Dies diente der Reduzierung von unspezifischen Hintergrundsignalen und unterstützte die nachfolgende proteolytische Behandlung. Dazu wurden die Schnitte kurz in PBS-MgCl₂ gespült, mit einer Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)-Lösung (20 μ g/ml in PBS-MgCl₂) überschichtet und anschließend in einer feuchten Kammer 25 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Konzentration der Proteinase K-Lösung sowie die Verdauzeit sind kritische Parameter für eine erfolgreiche in situ Hybridisierung. Für jeden Gewebetyp müssen die optimalen Bedingungen empirisch ermittelt werden, wobei mit steigendem Grad der Verdauung die Zugänglichkeit der mRNA für die Sonde gesteigert, die Gewebeintegrität jedoch bis hin zum vollständigen Verlust zunehmend beeinträchtigt wird. Für das eigene Probenmaterial wurden die besten Ergebnisse mit den oben genannten Bedingungen erzielt. Zur Beendigung des Proteinase K-Verdaus wurden die Gewebeschnitte 5 Minuten in PBS-

MgCl₂ / 0.2 % Glycin und zur Reduktion unspezifischer Sondenbindungen 15 Sekunden in 4 °C kalter 20 %-iger Essigsäure inkubiert. Nach kurzer Spülung in PBS-MgCl₂ wurden sie 10 Minuten in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung nachfixiert und danach erneut kurz in PBS-MgCl₂ gespült.

3.4.2.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

3.4.2.3 Prähybridisierung

Zur Prähybridisierung, die der Öffnung des Gewebes für die Sonde und der Reduktion unspezifischer Bindungen dient, wurden die Schnitte für eine Stunde in 20 % igem Glycerin / H₂O inkubiert, kurz in 2 x SSC-Puffer gespült, 10 Minuten auf eine 70 °C warme Heizplatte gelegt und dann auf dem Kühlplatz (ungefähr 4-8 °C) abgeschreckt. Die Schnitte wurden bis zum Ende der Vorbereitung der Sonde auf dem Kühlplatz gelassen.

3.4.2.4 Vorbereitung der Sonde und Hybridisierung

Die Sondengemische (Zusammensetzung s. Tabelle 13) wurden unmittelbar vor dem Gebrauch für Sense- bzw. Antisense-Sonde hergestellt, 10 Minuten im Wasserbad bei 70 °C erhitzt und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt. Sondengemisch und Hybridisierungspuffer wurden im Volumenverhältnis 1:100 zusammenpipettiert und von der entstehenden Lösung jeweils ca. 50 µl auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden mit sterilen Deckgläsern (Menzel-Gläser SuperFrost® Plus, Braunschweig) abgedeckt und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht in der feuchten Hybridisierungskammer inkubiert. Die Hybridisierungskammer wurde mit einem Gemisch aus 250 ml 4 x SCC-Puffer, 125 ml 50 % Formamid und 125 ml Aqua. dest. angefeuchtet.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Sondengemische und des Hybridisierungspuffers

SUBSTANZEN	SENSE-PROBE	ANTISENSE-PROBE
Sonden-Gemisch		
DEPC-Wasser	2 µl	2 µl
Salmon sperm DNA (1 mg/ml)	2 µl	2 µl
Yeast t-RNA (1 mg/ml)	4 µl	4 µl
DIG-RNA-Sonde (antisense bzw. sense)	2 µl	2 µl
Hybridisierungs-Puffer		
DEPC-Wasser	28 µl	28 µl
20 x SCC-Puffer	20 µl	20 µl
50 % Dextransulfat (in Aqua. dest)	40 µl	40 µl
Auf 70 °C erhitzen!		
Denhardt-Reagenz (1 x)	2 µl	2 µl
Deionisiertes Formamid (50 %)	100 µl	100 µl

3.4.2.5 Posthybridisierung und immunologischer Nachweis der Sondenbindung

Nach Ablauf der Hybridisierungsdauer wurden die Deckgläser in Bechergläsern mit 37 °C warmem 4 x SCC-Puffer abgespült und die Schnitte in Küvetten nacheinander dreimal 5 Minuten in 4 x SCC-Puffer bei 37 °C, 15 Minuten in 2 x SCC-Puffer bei 60 °C, 15 Minuten in 0.2 x SCC-Puffer bei 42°C, 5 Minuten in 0.1 x SCC-Puffer bei Raumtemperatur und abschließend 5 Minuten in 2 x SCC-Puffer bei Raumtemperatur zur Entfernung unspezifisch gebundener dig-RNA gewaschen.

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur eine Stunde in 3 %-igem BSA-Blockpuffer belassen. Anschließend wurden auf die Schnitte der AP-konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:4000 in Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton (TNMT)-Puffer mit einem Zusatz von 3 % BSA aufgetragen und diese bei 4 °C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Danach wurden sie zweimal 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer gewaschen. Zur Blockade endogener Phosphatase wurden die Schnitte für 5 Minuten in 1 x NTB (Natriumchlorid-Tris-Puffer) mit einem Gehalt von 4 µg/ml Levamisol inkubiert.

Danach wurden die Schnitte in einer dunklen, feuchten Kammer platziert und die Substratlösung (NBT / BCIP, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) aufgetragen. Die Farbreaktion wurde je nach

Intensität des Signals nach 1-1.5 Stunden durch 5 minütiges Waschen in 1 x (NTB) mit einem Zusatz von 4 µg/ml Levamisol und 5 Minuten in Wasser beendet.

Auf die feuchten Gewebeschnitte wurde ein Tropfen des Eindeckmediums (Histokitt, Osterode) gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt.

3.5 Puffer und Lösungen

Ethanol (Alkohol)-Reihe

Ethanol (95 %)		Ethanol (70 %)	
Ethanol reinst (100 %)	95 ml	Ethanol reinst (100 %)	70 ml
Aqua dest	5 ml	Aqua dest	30 ml

Formaldehyd 4 %-ig, gepuffert, pH 7,0 für die Gewebefixierung (Formol nach Lillie)

Formol (ca. 40 %-ige wässrige Formaldehyd-Lösung)	500 ml
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	20 g
Na ₂ HPO ₄	32,50 g
Aqua dest	ad 5000 ml

H₂O₂-Lösung 0.3 %-ig

H ₂ O ₂ 30 %-ig	2 ml
Aqua dest	ad 200 ml

ICC-Puffer (pH 7.45)

Na ₂ HPO ₄	1.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
NaCl	8.0 g
Aqua dest	ad 1 Liter

Nach der pH-Kontrolle Zugabe von 3 ml Triton X-100

Paraformaldehyd-Lösung für die Gewebefixierung (pH 7,4)

Paraformaldehyd	4 g
Aqua bidest	95 ml
20 x PBS	5 ml
NaOH (1,025 N)	150 µl

Erwärmen bei 70 °C, bis die Lösung klar wird. Lagerung bei -20 °C; Auftauen unmittelbar vor Gebrauch.

PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2*5 x Stammlösung:*

NaCl	41 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	11 g
KH ₂ PO ₄	2,75 g
Aqua dest	ad 1 Liter

PBS-Gebrauchslösung (1x PBS)

5 x PBS	200 ml
Aqua dest	ad 1000 ml

PBS-MgCl₂ Puffer

PBS-Tablette	1
Aqua dest	200 ml
1 M MgCl ₂ Lösung	1 ml

PBST-Puffer

PBS-Puffer (pH 7,5)	1000 ml
Tween 20	1 ml

10 mM Zitratpuffer für die Mikrowellenbehandlung der Gewebeschnitte (pH 6,0)*Stammlösung A: 0.1 M Zitronensäure*

C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	21,0 g
Aqua dest	ad 1 Liter

Stammlösung B: 0.1 M Natriumcitrat

C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ x 2H ₂ O	29,41 g
Aqua dest	ad 1 Liter

Gebrauchslösung

Stammlösung A:	9 ml
Stammlösung B:	41 ml
Aqua dest	450 ml

Phosphatpuffer für die Aufbewahrung von Gewebeproben nach Formalin-Fixierung

Lösung 1:

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	13.8 g
Aqua dest	ad 1000 ml

Lösung 2:

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	17.8 g
Aqua dest	ad 1000 ml

Lösung 1: 14,15 ml

Lösung 2: 35,85 ml

0.5 M EDTA-Na₂ x 2H₂O (Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

EDTA-Na ₂ x 2H ₂ O	37.22 g
Aqua dest	ad ca. 160 ml
pH-Wert mit ca. 4 g NaOH-Plätzchen auf pH 8.0 einstellen	
Aqua dest	ad 200 ml

Detektionspuffer I pH 7,5

TRIS-HCL	12,70 g
TRIZMA Base	2,36 g
NaCl	8,76 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Detektionspuffer II pH 9,6

TRIS-HCL	1,52 g
TRIZMA Base	10,94 g
NaCl	5,84 g
MgCl ₂	4,76 g
Aqua dest	ad 1000 ml

10 x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer pH 8,8 (10 x TBE-Puffer)

Tris	108 g
Borsäure	55 g
0.5 M EDTA pH 8.0	40 ml
Aqua dest	ad 1000 ml

1 x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (1x TBE-Puffer)

10 x TBE	100 ml
Aqua dest	ad 1000 ml

20 x SCC Puffer pH 7,0 (Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer; standard saline citrate)

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$	88,23 g
NaCl	175,29 g
Aqua dest	ad 1000 ml

1 x TNMT-Puffer pH 7,5 (Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton)

TRIS-HCl	121,10 g
NaCl	58,4 g
MgCl ₂	4,17 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Autoklavieren und nach dem Erkalten 5 ml Triton-X-100 zugeben.

5 x Natriumchlorid-Tris Puffer pH 9,6

TRIS-HCl	60,5 g
NaCl	29,2 g
1M MgCl ₂	50 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Autoklavieren.

Proteinase K-Lösung für den Proteinverdau vor der In situ-Hybridisierung (20 µg/ml)

Proteinase K	10 mg
0,5 M EDTA-Lösung	200 µl

Paraformaldehyd-Lösung pH 7,0 zur Nachfixierung in der In situ-Hybridisierung

Paraformaldehyd	25 g
1 x PBS-MgCl ₂ -Puffer	500 ml
4 N NaOH-Lösung zugeben, bis Lösung klar wird	

50 %-ige Dextransulfat-Lösung

Dextransulfat	5 g
Aqua dest	10 ml
Lagerung bei -20 °C	

Denhard-Reagenz

BSA	200 mg
Ficoll 400	200 mg
Polyvinylpyrrolidon	200 mg
Aqua dest	10 ml

Levamisol-Lösung zur Hemmung der endogenen AP-Aktivität

Levamisol	2,4 g
1 x Natriumchlorid-Tris Puffer	10 ml

20 %-ige Essigsäure

Eisessig	40 ml
Aqua dest	160 ml
Lagerung bei 4 °C	

1 M MgCl₂ Lösung

MgCl ₂	81,4 g
Aqua dest	ad 400 ml

0,2 %-ige Glycin-Lösung

Glycin	200 mg
PBS-MgCl ₂ Puffer	100 ml
Lagerung bei RT	

Ammoniumperoxodisulfat-Lösungen für den Western Blot

0,1 %-ig für Trenngel

Ammoniumperoxodisulfat	0,1 mg
Aqua dest	100 ml

0,21 %-ig für Sammelgel

Ammoniumperoxodisulfat	0.21 mg
Aqua dest	100 ml

Mikrosomen-Puffer pH 7,4 für die Differentialzentrifugation

1 M K ₂ HPO ₄ (wässrige Stammlösung)	6,000 ml
1 M KH ₂ PO ₄ (wässrige Stammlösung)	1,485 ml
Glycerin	15 ml
β-Mercaptoethanol	26,25 µl
Aqua dest	ad 70 ml

* unmittelbar vor der Benutzung:

PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)	750 µl
Aprotinin	75 µl
Aqua dest	ad 75 ml

Solubilisierungs-Puffer pH 7,4 für die Differentialzentrifugation

1 M K ₂ HPO ₄ (wässrige Stammlösung)	0,802 ml
1 M KH ₂ PO ₄ (wässrige Stammlösung)	0,198 ml
Glycerin	2,000 ml
β-Mercaptoethanol	3,5 µl
CHAPS	40 µl
Aqua dest	ad 70 ml

* Unmittelbar vor der Benutzung:

PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)	100 µl
Aprotinin	10 µl
Aqua dest	10 ml

Trenngelpuffer pH 8,8 für die Gelelektrophorese

TRIS-Base	18,17 g
10 %-ige SDS-Lösung	4 ml
Aqua dest	100 ml

Sammelgelpuffer pH 6,8 für die Gelelektrophorese

TRIS-Base	6,06 g
10 %-ige SDS-Lösung	4 ml
Aqua dest	100 ml

Transfer Puffer Lösung

TRIS-Base	2.4 g
Glycin	11.2 g
Methanol	200 ml
Aqua dest	930 ml

Elektrophorese-Gebrauchlösung pH 8,3

TRIS	6,0 g
Glycin	28,8 g
10 % SDS	10 ml
Aqua dest	800 ml

3.6 Reagenzien

- ABC-Lösung: Vector® - VECTASTAIN® Elite ABC Kit, PK-6101, Rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- ACS:180 Kits – Progesterone (PRGE) (Bayer Health Care, Fernwald)
- Acryla Gel (30 %): National Diagnostics Cat # EC-810 (Georgia, USA)
- Ammoniumperoxodisulfat (BIO-RAD Laboratories, Hercules)
- Anti-DIG-Fab-Antikörper (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)
- Antigen Unmasking Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Aprotinin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Assay& Albumin Standard Kits (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA)
- BCIT: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, toluidine salt (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)
- BisAcryla Gel (2 %) (National Diagnostics, Georgia, USA)
- Borsäure, Pufferan® (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Bovine Serum Albumin (Fluka, Neu-Ulm)
- β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- CHAPS(3- [(3-Cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]–1 propanesulfonate) (Fluka, Neu-Ulm)
- Denhard's Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- DIG RNA Labelling Kit (SP6 / T7) (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)
- Di-Natriumhydrogenphosphat reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
- Ethanol: 99.6%, DAB 10 (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Ethidiumbromidlösung 1% (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Ficoll 400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)
- Formamide (Fluka, Neu-Ulm)
- Gene Amp RNA Core Kit® (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
- Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

- Glycerin Rotipuran®: 99,5 % Wasserfrei (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- HCl, Salzsäure, rauchend, 37 %ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- Histokitt (Assistent, Osterode)
- Kaliumchlorid reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
- Kaliumphosphat monobasisch (Fluka, Neu-Ulm)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka Chemie GmbH, Buchs)
- Ladepuffer für die Elektrophorese, Roti®-Load1 (4x-Konz) (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Levamisol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Magnesium Chlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Molekulargewichtsmarker-Lösung: SDS-7B (Sigma, Deisenhofen)
- MsIgG_{2a} (Beckman Coulter Miami, USA)
- Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Natrium dodecylsulfat: SDS (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Merck KGaA, Darmstadt)
- NTB: 4-Nitroblue Tetrazolium Chloride (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Papanicolaou-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt)
- Pap Pen G.Kisker (Biotech, Steinfurt)
- Paraformaldehyd (Fluka, Neu-Ulm)
- Peroxidase-gekoppelter Esel anti-Kaninchen-Antikörper (Chemicon International, Temecula)
- Peroxidase-gekoppelter Schaf anti-Maus-IgG-Antikörper (Amersham Biosciences, NA931, Freiburg)
- PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Peroxidase Kit: Vector® (Nova-RED) (Linearis Biologische Produkte GmbH, Wertheim)
- Phosphate Buffered Saline Tablets (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Prestained Molecular Weight Standard Mixture: SDS-7B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

- Ribonucleic acid transfer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- RNase-Away (Molecular Bioproducts, San Diego, USA)
- RT-PCR Core Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
- Salmon Testes DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Schaf Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA)
- TEMED: (N,N,N',N'–Tetramethylethylenamin)(Boi-Rad Laboratories, Hercules)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Tris hydroxymethylaminomethane (Trizma® Base) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Tris Pufferan® (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- TRIS: Tris hydroxymethyl aminomethan (Fluka, Neu-Ulm)
- Triton 100 (Serva, Heidelberg)
- Tween 20, Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Xylol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Wasserstoffperoxid, 30 %ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- Zitronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

3.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- ACS: 180® ; Automated Chemiluminescence System, Bayer (Ciba Corning Diagnostics GmbH, Fernwald)
- Blot – Einrichtung: BioRad Mini Trans Blot ® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, München)
- Deckgläser Menzel-Gläser: SuperFrost®, 24x40 mm, 24x50 mm und 24x60 mm (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig)
- Einbettungsautomat: (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg)
- Eindeckmedium: Histokitt (Assistent, Osterode)
- Einmalmesser für Mikrotom: Leica DB 80L, Leica Microsystems (Nußloch GmbH, Nußloch)
- Elektrophoresekammer-Agarosegel: (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Elektrophoresekammer: (Hoefer® Mighty Small SE 260 System, Amersham Pharmacia, Biotech)
- Eppendorf Biophotometer: (Eppendorf AG, Hamburg)
- Filterpapiere: (Munktell, Sweden)
- Flachgel-Elektrophoresekammer: „Midi“ 100 x150 mm, Gießkammer und Kamm (Keutz Labor-technik GmbH, Reiskirchen)
- Glasröhrchen für Ultrazentrifuge: Nalgene Ultra Plus Centrifuge Ware 3423-1613 (MAGV, Rabenau-Londorf)
- Glasröhrchen: (Sarstedt, Nümbrecht)
- Hand-Homogenisiergerät: Konische Form, 20 ml, B.Braun Biotech Int, Sartorius Group (Melsungen AG)
- Heraeus Sepatech Biofuge 28RS: (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Handschuhe UniGloves®: (Troisdorf)
- Laborwasseraufbereitungsanlagen: Aqua demineralisata Seral-Anlage mit angeschlossener Millipore-Reinigungsanlage: Milli Q, Water Purification System Firma Millipore, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn)
- Magnetrührer: MR 2002 (Heidolph Instruments GmbH&CoKG, Kelheim)
- Messerhalter: Halterset 24 cm lang, 2 Andrückplatten (Leica Vertrieb GmbH, Bensheim)
- Mikrotom: (Reichert Jung AG, Heidelberg)
- Nitrozellulose-Membran: Millipore Transfermembrane Immobilion-P (Bedford, USA)

- Nylon Membran - positively charged: (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Papertücher: (Kimwipes, Ladd Industries, Williston)
- PapPen: (G. Kisker - Biotech, Steinfurt)
- Paraffinausgießstation: Histoembedder EG 1160 (Leica Instruments GmbH, Nußloch)
- PCR-Tubes: 0,5 ml, ultradünn, RNase-/DNase-Pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hesisch Oldendorf)
- pH-Meter: (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte Rabenau-Londorf)
- Powersupply (PCR): 2301 Macrodrive 1 Powersupply (LKB Bromma, Golden, USA)
- Powersupply: Western Blott (EPS 301 Amersham Biosciences, Sweden)
- Reaktionsgefäße: (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf)
- Schüttler: Heidolph Polymax 1040, (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Spritze: 50 µl Rheodyne (Hamilton Company, Reno, Nevada)
- T1 Thermocycler 49: (Whatman Boimetra, Göttingen)
- Ultra-Turrax ®: T-8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5g (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- Ultrazentrifuge: Ultrazentrifuge TGA-65 (TEG/MENTA AG, Rothkreuz)
- UV-Transluminator mit Bildarbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01: (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- UV-Spektrometer (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Hamburg) mit Eppendorf Uvette® 220-1600 nm (Westbury, USA)
- Vakuum Pumpe: KNF Neuber, Typ: No 035.1.2 AN. 18, Nr: 472678; VDE 0530, Nr: 83424, Motortyp: MW 63/4, IP 44, Volt:220, 1,8 A, 0,12kW, 50 Hz, 1400 U/min (Freiburg)
- Vortexer: Heidolph REAX control (MAGV, Rabenau-Londorf)
- Waage „Mettler AE160“, F.Nr.38600: (Fa. Mettler-Toledo, Giessen)
- Waage „Mettler PJ300“, F.Nr.33650: (Fa. Mettler-Toledo, Giessen)
- Wasserbad: Typ WB-24; V220; W 550; Fabrik-Nr.;8810, max. 90C; (Medax Nagel KG Kiel)
- Wärmeschrank: Memmert, Typ: 3 26, F-Nr: 340 073, 220 Volt, 380 Watt, 50/60 Hz, Din 12880-Kl. 0, Nenntemp.: 70C, Schutzart Din 40050-IP20 (Schwabach)
- Zentrifugengläser: greiner bio-one CELLSTAR®, Cat. No: 210261 (Omega Scientific, CA 91356, Tarzana)

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Expression der P450c17 in den Plazentomen des Rindes

4.1.1 Bestätigung der Spezifität des anti-P450c17-Antiserums im Western Blot

Die Spezifität des als Primärantikörper in der Immunhistologie eingesetzten polyklonalen anti-P450c17-Antiserums wurde im Western Blot überprüft. Als Probenmaterial wurden aus Plazentomen gewonnene mikrosomale Fraktionen verschiedener Tiere eingesetzt, die sich in unterschiedlichen Graviditätsstadien befanden (s. Abb.16). In allen Proben war nur eine einzige deutliche Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 58 kDa vorhanden.

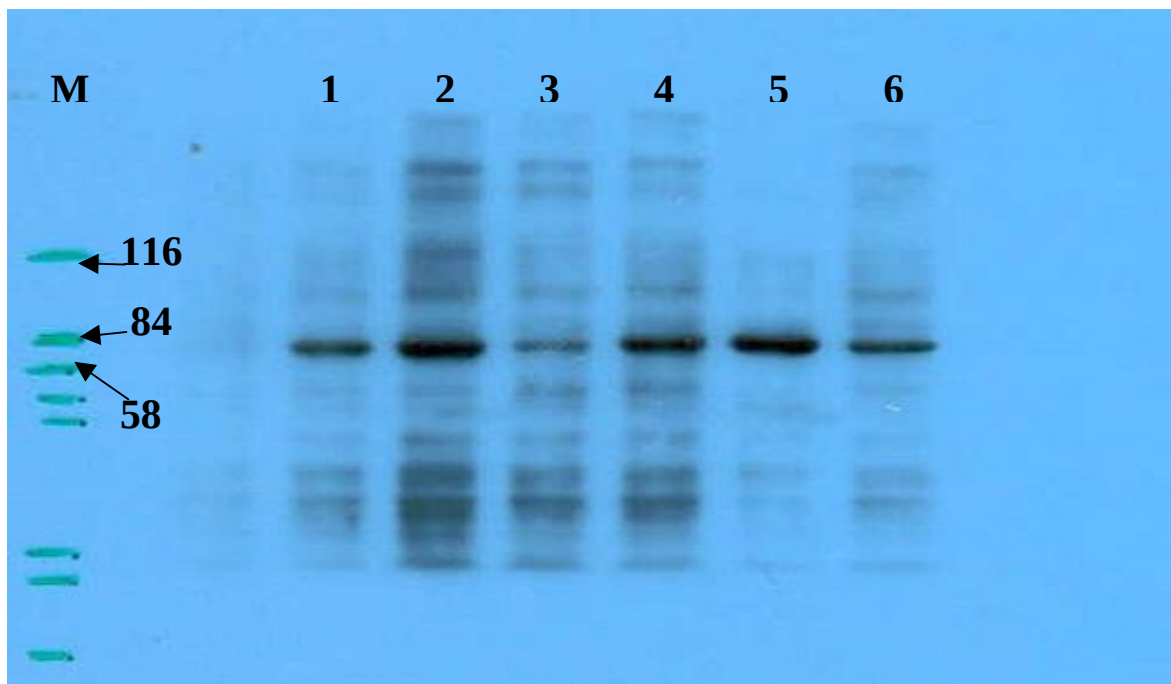


Abb. 16: Überprüfung der Spezifität des zur immunhistologischen Darstellung von P450c17 verwendeten polyklonalen Antiserums (30µg) im Western Blot. Es wurden mikrosomale Fraktionen aus Plazentomen von Kühen unterschiedlicher Trächtigkeitsstadien aufgetragen. In allen untersuchten Proben zeigt sich eine einzige deutliche Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 58 kDa.

1 = 270. Tag

2 = 224. Tag

3 = 233. Tag

4 = 217. Tag

5 = 211. Tag

6 = 221. Tag

4.1.2 Immunhistologische Lokalisierung der P450c17 in den Plazentomen des Rindes und Expressionsmuster im Verlauf der Gravidität

Die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der P450c17 α in Rinderplazentomen ergaben, dass bei allen untersuchten Tieren dieses Enzym ausschließlich im Zytoplasma der einkernigen Trophoblastzellen (UTC) nachzuweisen war (s. Abb. 17 und 18), während die Trophoblastriesenzellen (TGC) sowie deren Vorläufer - soweit anhand der erhöhten Zell- und Kerngröße bzw. der Anwesenheit zweier Zellkerne morphologisch identifizierbar - auch bei deutlicher Überfärbung der Schnitte vollständig negativ reagierten. Im interkotyledonären Trophoblast war keine Expression der P450c17 α festzustellen. Auch im Trophoblast der Chorionplatte abseits der Ansatzstellen der Primärzotten war kein bzw. nur ein sehr schwaches spezifisches Signal vorhanden.

Die Expression der P450c17 wies einen deutlichen Bezug zum Graviditätszeitpunkt sowie zu der Lokalisation innerhalb des Zottenbaums und dem Trächtigkeitsstadium auf (s. Tabelle 14; Abb.19-22). Wie Tabelle 14 zeigt, ergab sich in der Phase von 100. bis 155. Trächtigkeitstag sowie vom 270. Trächtigkeitstag bis zur Geburt eine durchweg deutliche bis intensive Färbung, zwischen dem 182. bis 234. Trächtigkeitstag war die Färbung weniger intensiv und auch negativ. Hinsichtlich der Lokalisation zeigte sich, dass sich negative Befunde vor allem für die Tertiärzotten und in geringerem Umfang für die basalen und apikalen Sekundärzotten ergaben.

Tabelle 14: Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der P450c17-Expression in den uninukleären Trophoblastzellen der Rinderplazentome in Abhängigkeit vom Graviditätsstadium und der Lokalisation innerhalb des Trophoblasten

Lokali- sation	Graviditätstag																	präpartal *			termingerechte Geburt					
	100	109	112	136	142	154	155	182	183	185	187	196	211	217	233	234	270	283	S1	S2	S3	G1	G2	G3	G4	G5
1.1																										
1.2																										
2.1																										
2.2																										
2.3																										
2.4																										
3.1																										
3.2																										
3.3																										
4																										

* Bei diesen Tieren erfolgte die Probenentnahme im Rahmen von Schnitttenbindungen, sobald der präpartale Progesteronabfall erkennbar war, d.h. ca. 24-36 Stunden vor dem Einsetzen der äußerlich erkennbarer Geburtsanzeichen

Lokalisationen: (s. Abschnitt 2.2.3.2)	2.1	Abzweigungen der basalen Sekundärzotten	3.1	Tertiärzotten
	2.2	Abzweigungen der apikalen Sekundärzotten	3.2	Tertiärzotten nahe am Karunkelstiel
	2.3	Basale Sekundärzotten	3.3	Direkt aus der Chorionplatte bzw. aus der Basis von Primärzotten hervorgehende kleine Zotten
1.1 Basaler Anteil der Primärzotten	2.4	Apikale Sekundärzotten	4.	Chorionplatte
1.2 Apikaler Anteil der Primärzotten				
Färbeintensität:	negativ	Schwach	deutlich	intensiv

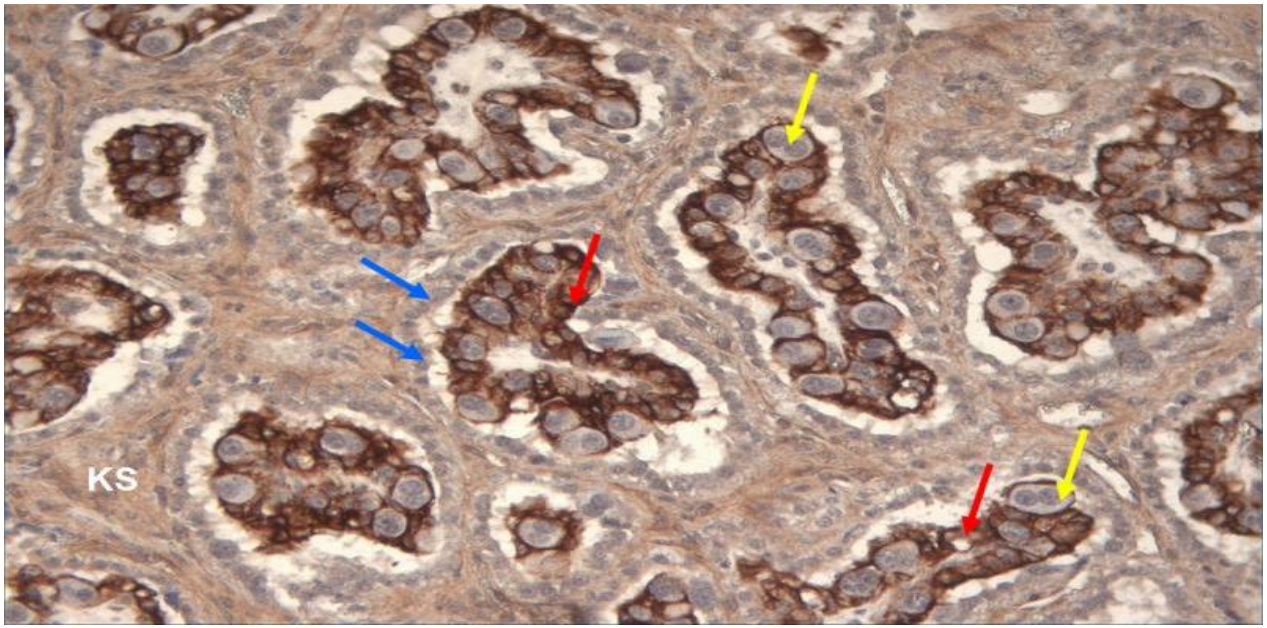


Abb. 17: Immunhistologische Darstellung von P450c17 in einem Plazentom eines 142 Tage graviden Rindes (Vergrößerung:100x). Spezifische Signale finden sich ausschließlich in den einkernigen Trophoblasten (UTC). Gelbe Pfeile: reife Trophoblastriesenzellen; rote Pfeile: UTC; blauer Pfeile: Karunkel epithel; KS = Karunkelstroma

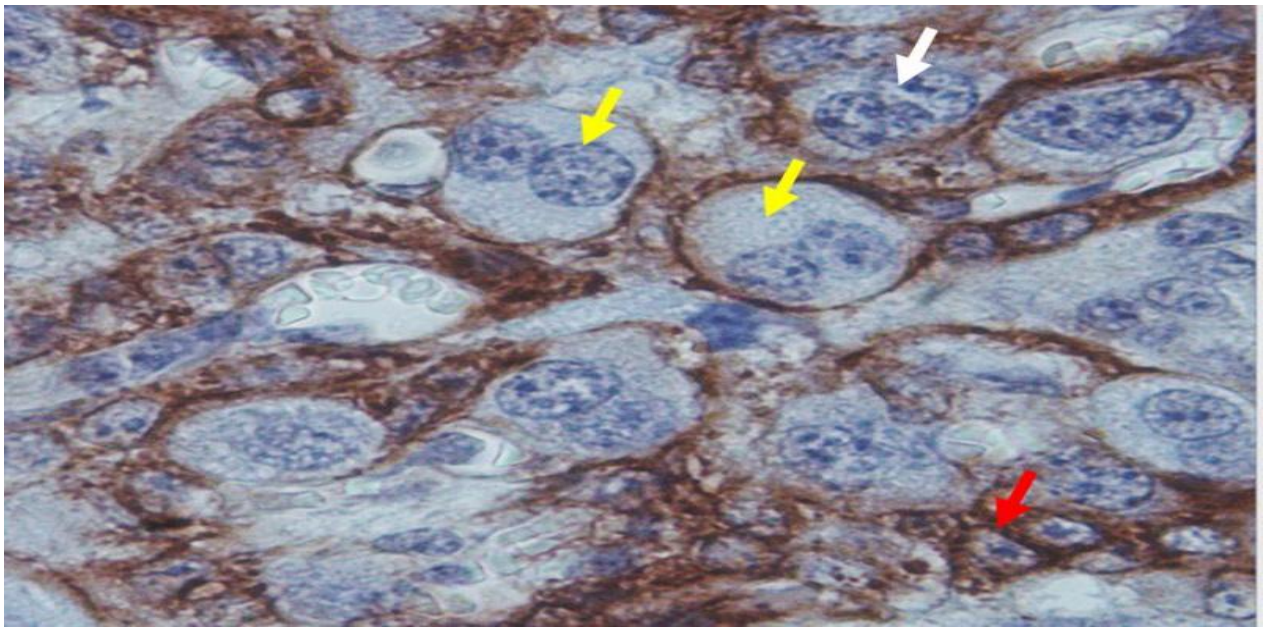


Abb. 18: Immunhistologische Darstellung von P450c17 im Trophoblasten eines 112 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: 400x). Im Gegensatz zu den einkernigen (roter Pfeile) weisen Trophoblastriesenzellen (gelbe Pfeile) sowie deren Vorläufer (weißer Pfeil) keinerlei Signale auf.

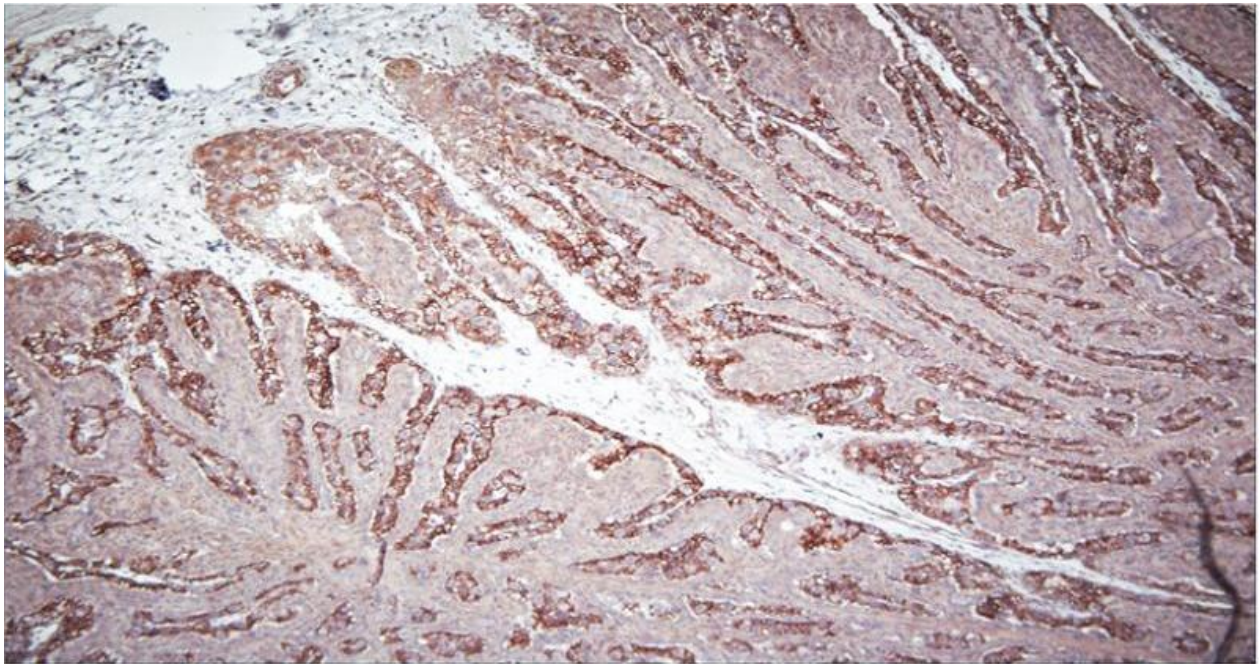


Abb. 19: Immunhistologische Darstellung von P450c17 im Trophoblasten eines 154 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: 50x). Das Signal ist gleichmäßig über den Trophoblasten von Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten verteilt.

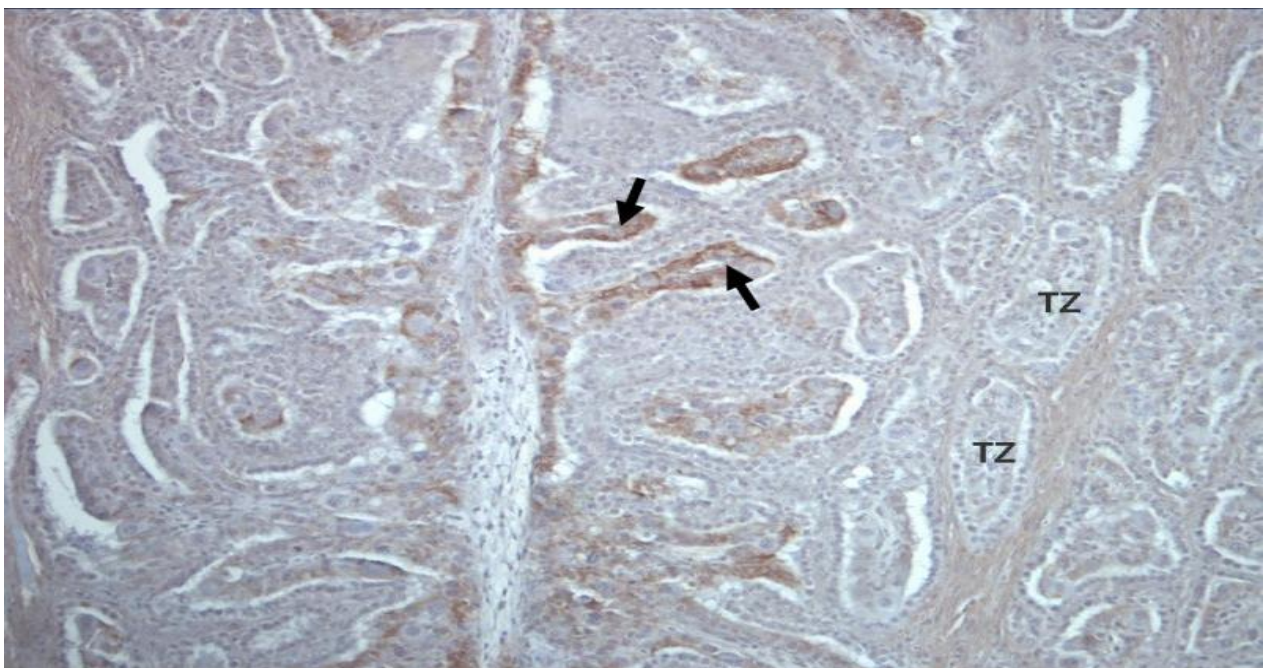


Abb. 20: Immunhistologische Darstellung der P450c17 im Trophoblasten eines 183 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: 100x). Das Signal ist weitgehend auf die links der Bildmitte senkrecht verlaufenden Primärzotte sowie auf Anteile der Sekundärzotten (Pfeile) beschränkt. In den Tertiärzotten (TZ) sind kaum Signale vorhanden.

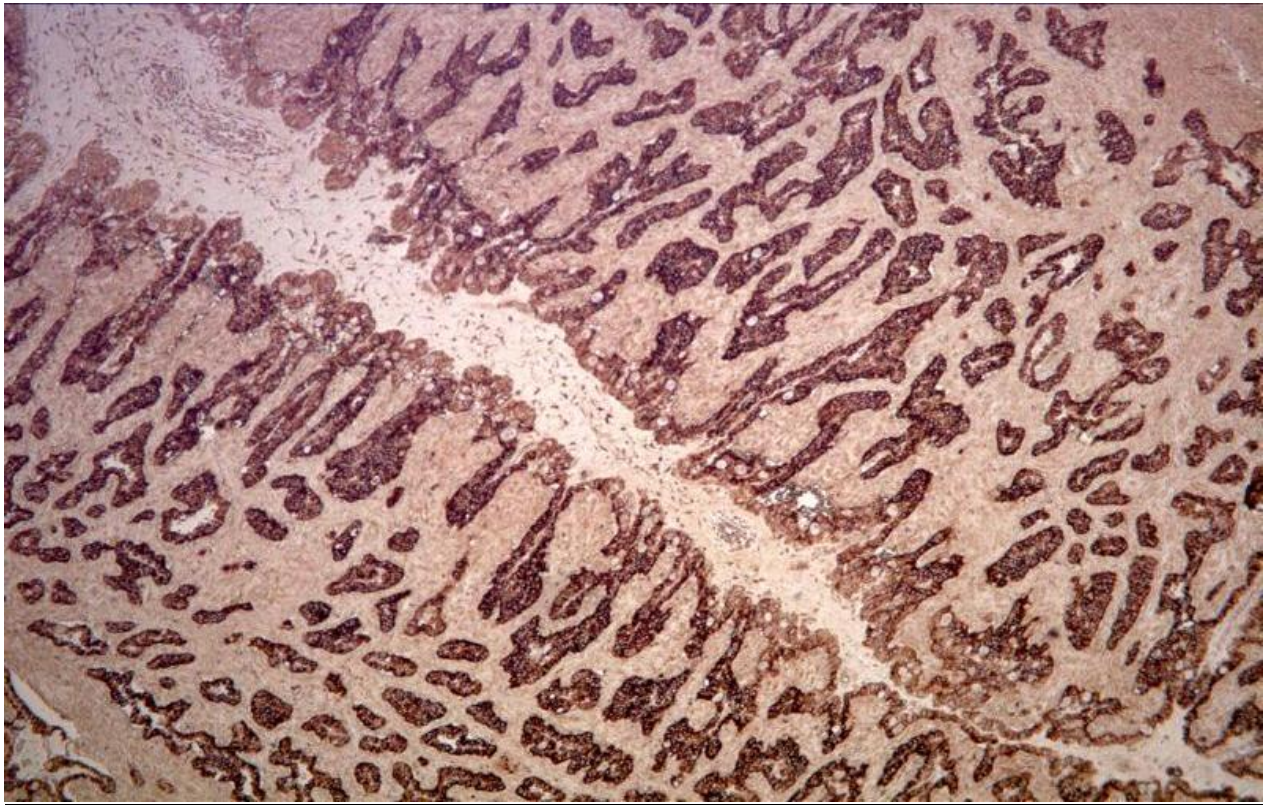


Abb. 21: Immunhistologische Darstellung von P450c17 im Plazentom eines präpartalen Kindes (Vergrößerung: 50x)

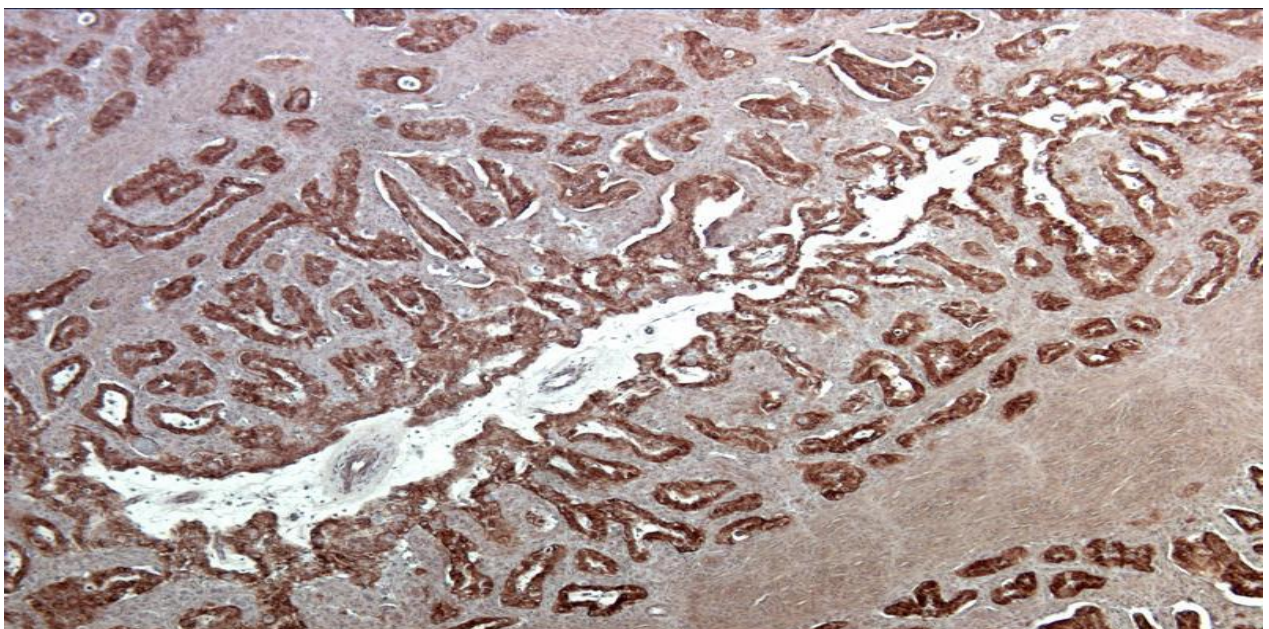


Abb. 22: Immunhistologische Darstellung von P450c17 im Plazentom eines Kindes zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt (Vergrößerung: 50x)

4.2 Die Expression der Aromatase in den Plazentomen des Rindes

4.2.1 Bestätigung der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper im Western Blot

Zur Immunolokalisation der Aromatase standen zwei Primärantikörper zur Verfügung: ein polyklonales Kaninchenantiserum gegen die menschliche Aromatase (Quelle: Dr. N. Harada, Department of Biochemistry, Fujita Health University, School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan) sowie ein muriner monoklonaler Antikörper (Klon H4; Serotec, Düsseldorf; Katalog-Nr. MCA2077), welcher nach Immunisierung gegen ein den Aminosäuren 376-390 der menschlichen Aromatase entsprechendes Peptid erzeugt worden war. Es handelt sich hierbei um einen Abschnitt des Aromatase-Moleküls, welcher bei vielen Spezies - einschließlich Rind - vollständig konserviert ist.

Beide Antikörper erkannten in verschiedenen steroidogenen Organen bei Rind, Schwein und Mensch im Western Blot eine spezifische Bande mit dem zu erwartenden Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Abb. 23). Ein Vergleich der Bandenstärke zeigt unter Berücksichtigung der unterschiedlichen aufgetragenen Proteinmengen, dass - bezogen auf die Gewebemasse - die Aromatase in den Granulosazellen des Rindes viel stärker exprimiert wird als in den Plazentomen. Neben der spezifischen Bande ergaben sich mit dem monoklonalen Antikörper nur deutlich schwächere unspezifische Banden, während mit dem polyklonalen Antikörper neben der spezifischen Bande in Probenmaterial vom Rind eine kräftige unspezifische Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa auftrat.

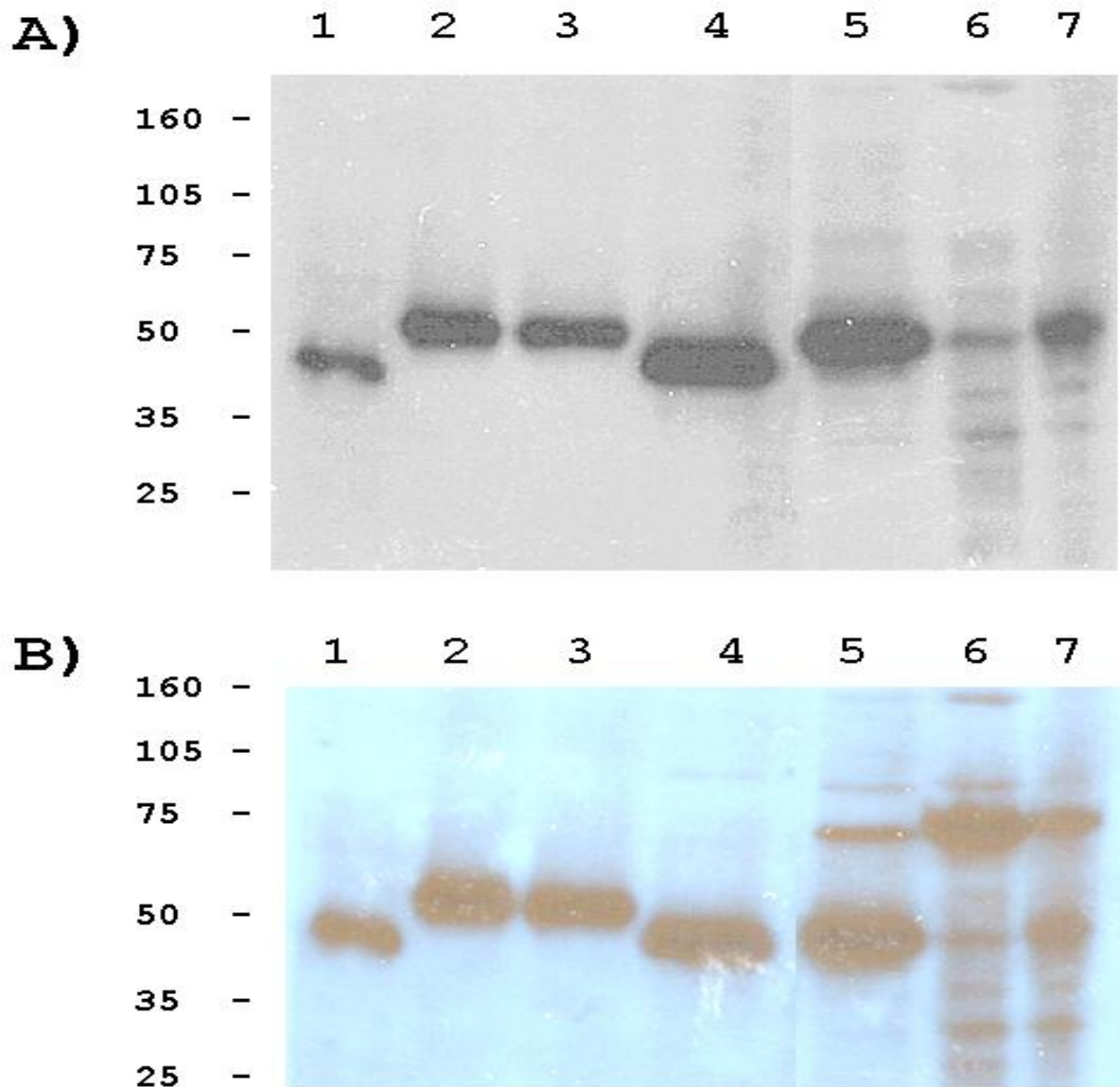


Abb. 23: Überprüfung der Spezifität der in der Immunhistologie zum Aromatasenachweis in der Rinderplazenta eingesetzten Primärantikörper:
A = monoklonaler Maus-anti-Aromatase (Mensch) Antikörper H4
B = polyklonales Kaninchen-anti-Aromatase (Mensch) Antiserum
Zu Vergleichszwecken wurde rekombinante humane Aromatase bzw. mikrosomales Protein aus verschiedenen steroidogenen Organen bzw. Spezies in die Untersuchung einbezogen (Quelle: Prof. A. Conley, Davis).

1 = humane rekombinante Aromatase (0.2 pmol)	5 = bovine Granulosazellen (25 µg)
2 = menschliche Granulosazellen (2 µg)	6 = Rinderplazentom (Tag 182) (75 µg)
3 = Humanplazenta (2 µg)	7 = Rinderplazentom (Geburt) (75 µg)
4 = Eberhoden (10 µg)	

4.2.2 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der Aromatase in Rinderplazentomen unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers gegen die menschliche Aromatase

In Vorversuchen wurde die Verwendbarkeit und Spezifität dieses Primärantikörpers zum Aromatase-nachweis in paraformaldehydfixiertem, paraffineingebetteten Probenmaterial untersucht. In menschlicher Geburtsplazenta ergab sich ein kräftiges, spezifisches Signal im Syncytiotrophoblasten. Auch in Rinderovarien mit dominanten Brunstfollikeln war in deren Granulosazellen ein starkes, hochspezifisches Signal vorhanden. Die Granulosazellen weiterer vorhandener Tertiärfollikel reagierten dagegen vollständig negativ.

In den Rinderplazentomen waren ohne Vorbehandlung der Schnitte in einem Teil der Proben allenfalls schwache, spezifische Signale zu erzielen. Nach Erhitzen der Gewebeschnitte in der Mikrowelle bzw. in einem Dampfkochtopf in 10 mM Zitratpuffer pH 6.0 bzw. in einer kommerziellen Demaskierungs-Lösung (Antigen Unmasking Solution-Vector Laboratories, Burlingame, USA) konnten zum Teil deutlich erkennbare spezifische Signale beobachtet werden. Das beste Signal / Hintergrund-Verhältnis wurde unter Verwendung der Antigen Unmasking Solution mit einem Zusatz von 0.5 % SDS erzielt (s. Abb. 24). Hierbei wurden jedoch erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebeblöcken beobachtet. In einem Teil der Proben waren deutliche spezifische zytoplasmatische Färbungen von Trophoblastriesenzellen und deren Vorläufer zu erkennen, welche mit steigendem Differenzierungsgrad zunahmen. In geringerem Umfang waren an einigen Lokalisationen spezifische zytoplasmatische Reaktionen des Primärantikörpers auch im Karunkel epithel vorhanden (Abb. 24C). In den Negativkontrollen, in denen das spezifische Antiserum durch das Serum eines nichtimmunisierten Kaninchens ersetzt wurde, waren derartige Signale nicht zu beobachten (Abb. 24B). In zahlreichen Proben traten mit dem polyklonalen anti-Aromatase-Serum jedoch erhebliche, diffuse unspezifische Färbungen des gesamten Gewebes sowie zahlreiche nukleäre Signale auf, die teilweise auch in den Negativkontrollen zu beobachten waren und deshalb als unspezifisch betrachtet wurden. In diesen Schnitten war zwar ebenfalls das als spezifisch angesehene Reaktionsmuster erkennbar, eine sichere Klassifizierung der Zellen im Sinne einer quantitativen Auswertung war jedoch nicht möglich. Daher wurde auf eine Quantifizierung des immunhistologischen Signals in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium verzichtet.

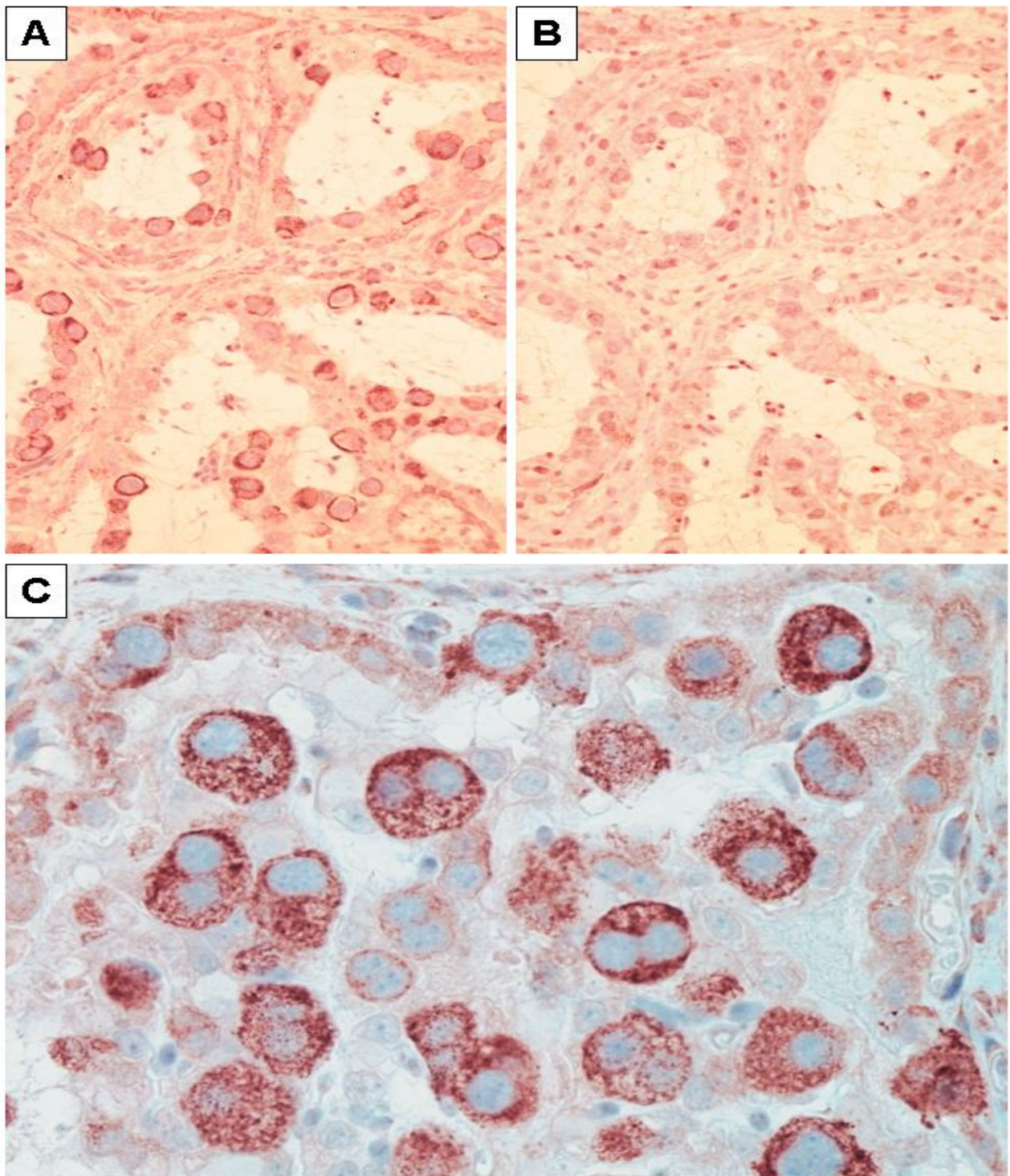


Abb. 24: Expression der Aromatase im Plazentom eines Rindes, bei dem kurz vor Ablauf der physiologischen Graviditätsdauer die Geburt induziert wurde. **A)** Übersicht mit deutlichen zytoplasmatischen Signalen in Trophoblastriesenzellen (TGC). **B)** Die selbe Lokalisation in der Negativkontrolle (Vergrößerung: 200x). **C)** Querschnitt einer Chorionzotte mit positiven Signalen in differenzierenden und reifen TGC. Eine schwache zytoplasmatische Färbung ist auch im Karunkel epithel (oben und rechts) vorhanden (Vergrößerung: 400x).

Unbeschadet des niedrigen Signal / Hintergrund-Verhältnisses in zahlreichen Gewebeproben war aber zu erkennen, dass vor dem präpartalen Progesteronabfall deutliche zytoplasmatische Färbungen von Trophoblastriesenzellen weitgehend auf die basalen Anteile der Primärzotten beschränkt waren. Bei den Tieren der präpartalen Gruppe sowie zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt, also um oder nach dem präpartalen Progesteronabfall, war sowohl eine Ausbreitung der Signale auf die restlichen Anteile des Zottenbaums sowie ein genereller Anstieg der Signalintensität zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt waren starke Signale in den in verminderter Anzahl noch vorhandenen, z.T. degenerierenden Trophoblastriesenzellen erkennbar.

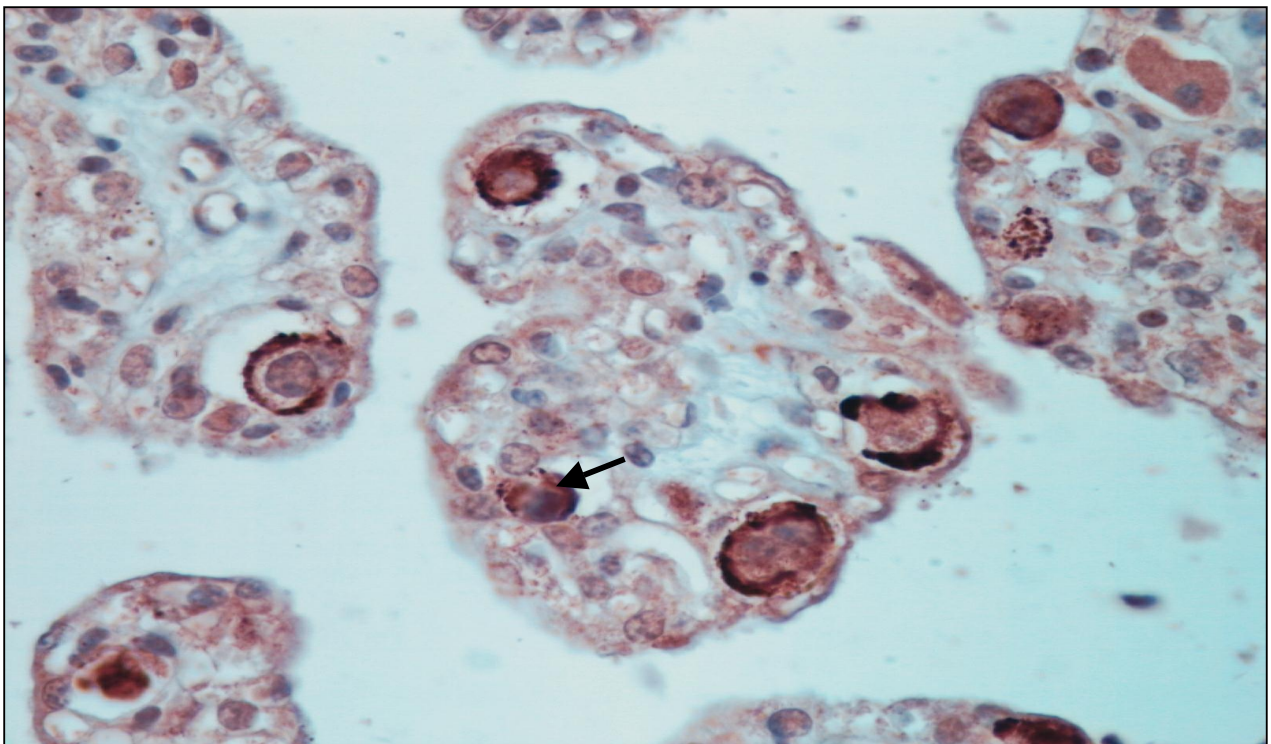


Abb. 25: Expression der Aromatase in der Plazenta eines Rindes nach Abschluss der termingerechten Geburt (Vergrößerung: 400x). Deutliche Immunfärbung in den verbliebenen degenerierenden Trophoblastriesenzellen sowie deren Zerfallsprodukte (Pfeil).

4.2.3 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression der Aromatase in Rinderplazentomen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers H4

Unter Verwendung dieses monoklonalen Antikörpers, der gegen einen bei vielen Spezies hochkonservierten Abschnitt der Aromatase gerichtet ist, ergab sich in Vorversuchen ohne Vorbehandlung der Schnitte zur Epitop-Demaskierung bei einer Verdünnung von 1:50 an paraformaldehydfixierter menschlicher Geburtsplazenta ein dem polyklonalen Primärantikörper identisches kräftiges, spezifisches Signal im Syncytiotrophoblasten. Auch in Schnitten von Rinderovarien wurde mit Verdünnungen von 1:50 bzw. 1:200 ein dem polyklonalen Primärantikörper identisches Reaktionsmuster mit einem intensiven, hochspezifischen zytoplasmatischen Signal ausschließlich in den Granulosazellen dominanter Brunstfollikel erhalten. In den Rinderplazentomen war dagegen keinerlei spezifisches Signal zu erkennen, obwohl praktisch kein unspezifischer Hintergrund vorhanden war. Auch die Austestung verschiedener Antigen-Retrieval-Methoden, die Erhöhung der Antikörperkonzentration sowie Untersuchungen an Gefrierschnitten führten zu keinem positiven Ergebnis.

4.3 Ergebnisse zur Lokalisation 3 β -HSD-spezifischer mRNA in den Rinderplazentomen mittels in situ-Hybridisierung

Da für das Rind derzeit keine geeigneten Antikörper zur Darstellung der 3 β -HSD zur Verfügung stehen, wurde zur Lokalisierung dieses Enzyms auf zellulärer Ebene in der Rinderplazenta ein entsprechendes In situ-Hybridisierungsverfahren etabliert. In dem als Positivkontrolle verwendeten Corpus luteum eines Rindes ergaben sich hiermit spezifische Färbungen im Zytoplasma von Lutealzellen, während die restlichen Zelltypen des Ovars keine vergleichbaren Signale aufwiesen. In den Ovar-Negativkontrollen wurden keine Signale beobachtet (Abb. 32)

Die Untersuchungen zur Expression der 3 β -HSD in Rinderplazentomen wurden bei Tieren am 155., 183., 233., 270. Graviditätstag durchgeführt. In den Rinderplazentomen wurden spezifische, perinukleäre Signale ausschließlich um Trophoblastzellkerne beobachtet, die in ihrer Größe denen von uninukleären Trophoblastzellen entsprachen (UTC). Das Signal war hierbei jedoch nicht gleichmäßig um die Kerne der UTC lokalisiert, sondern betraf einzelne Zellen besonders deutlich. Auffallend häufig waren auch Paare unmittelbar benachbarter Kerne von einem intensiven Signal umgeben, wobei aufgrund der durch die Proteinasebehandlung beeinträchtigten Morphologie nicht zu entscheiden war, ob es sich um zwei einzelne UTC oder um Frühstadien der Trophoblastriesenzellen handelte. Reife Trophoblastriesenzellen reagierten bei allen untersuchten Tieren stets vollständig

negativ. Negativkontrollen, in denen die Sonde durch Hybridisierungspuffer ersetzt wurde, waren praktisch ungefärbt. Wurde die Sonde durch eine entsprechende sense-Dig-RNA ersetzt, waren v.a. in den Trophoblastriesenzellen z.T. deutliche nukleäre Signale sichtbar, während das Zytoplasma aller Zellen praktisch ungefärbt war.

Die positiven Signale waren besonders in den basalen Bereichen der Primärzotten sowie in direkt aus der Chorionplatte bzw. der Basis von Primärzotten entspringenden kleinen Zotten ausgeprägt. Die spezifischen Signale der 3β -HSD waren über den gesamten beobachteten Zeitraum vom ca. 150. Graviditätstag bis zur Geburt vorhanden.

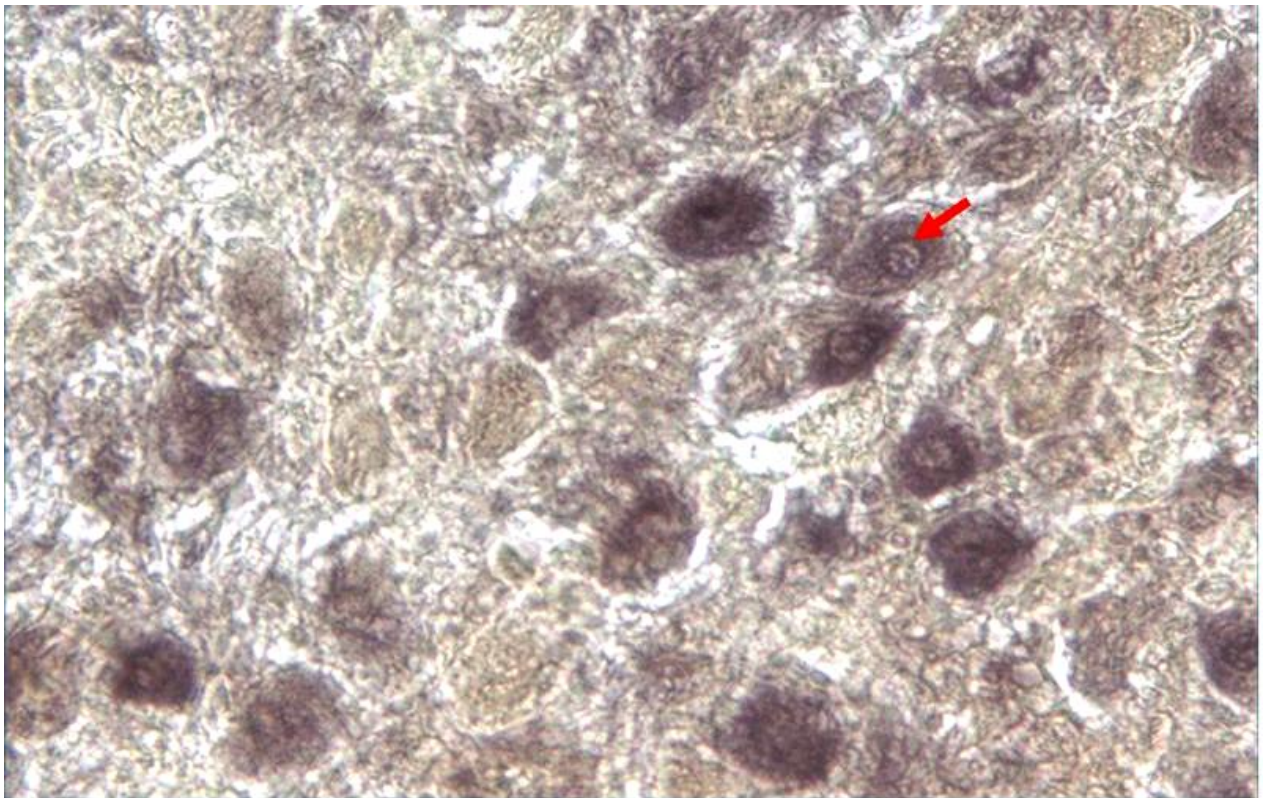


Abb. 26: In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3β -HSD-spezifischer mRNA. Reaktionsmuster in einem als Positivgewebe verwendeten Corpus luteum eines Rindes. Spezifische Reaktionen finden sich ausschließlich in Lutealzellen. Farbreaktion im Cytoplasma. Die Kerne reagieren negativ (roter Pfeile) (Vergrößerung: 400x).

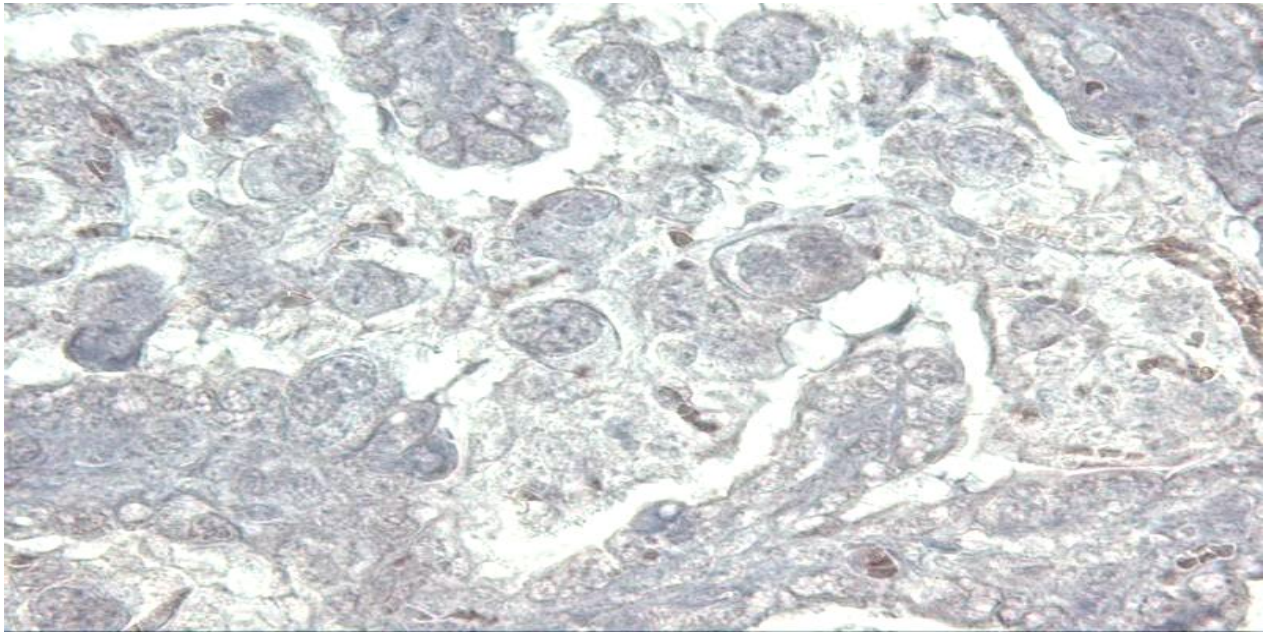


Abb. 27: Negativkontrolle zur In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA (Rinderplazentom, Tag 233). Hier wurde die spezifische antisense-Sonde durch Hybridisierungspuffer ersetzt. Es finden sich keinerlei Signale (Vergrößerung: 400x).

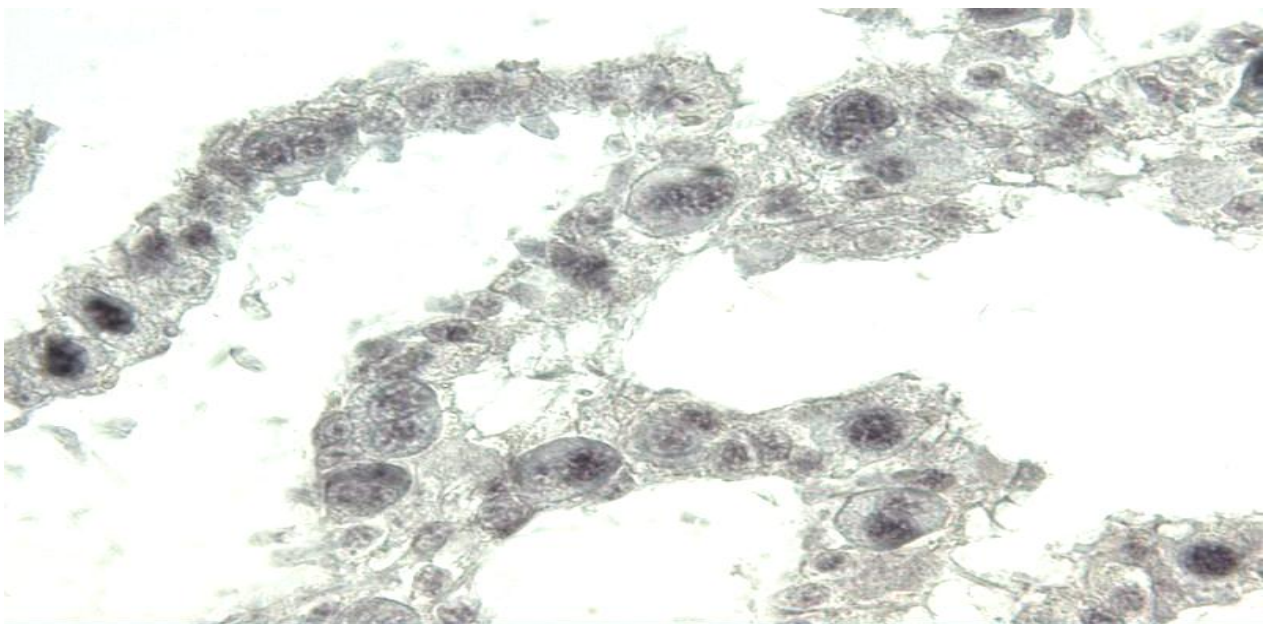


Abb. 28: Negativkontrolle zur In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA (Rinderplazentom, Tag 233). Hier wurde die spezifische antisense-Sonde durch eine entsprechende sense-Sonde ersetzt. Es finden sich Signale im Trophoblasten, die jedoch aufgrund ihrer ausschließlichen Lokalisation im Kern als unspezifisch zu betrachten sind (Vergrößerung: 400x).

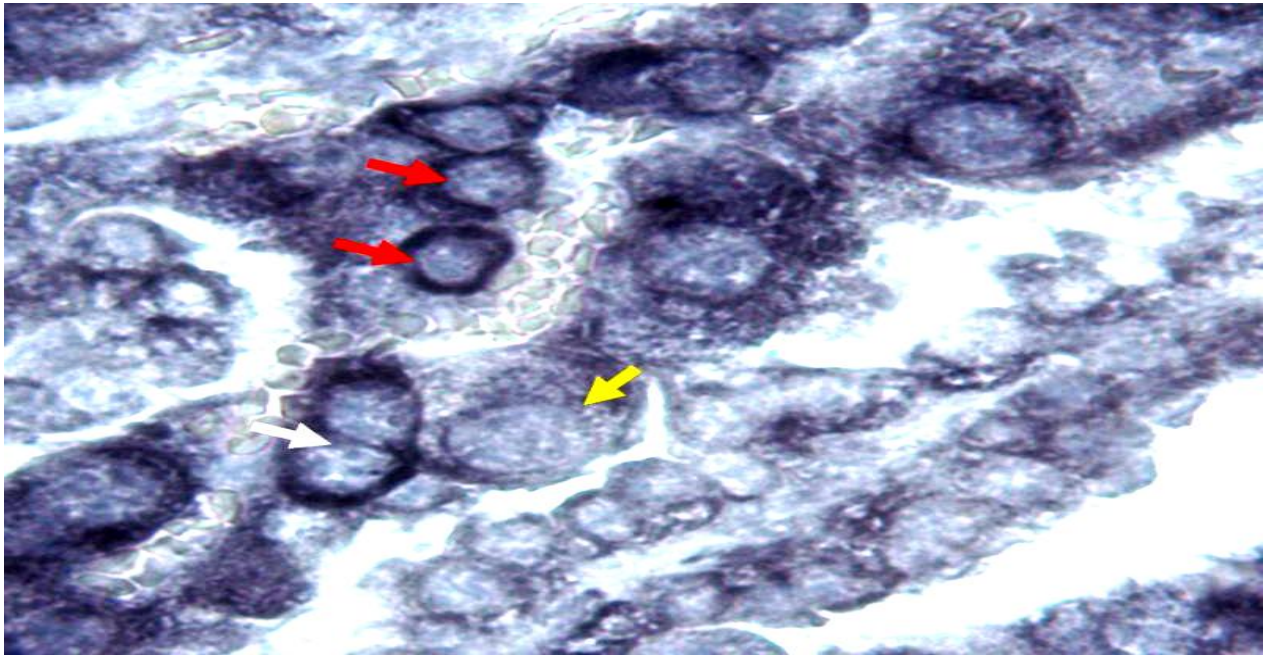


Abb. 29: In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA im Plazentom eines 183 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: 400x). Spezifische zytoplasmatische und perinukleäre Signale um einzelne einkernige Trophoblastzellen (rote Pfeile) bzw. um ein Paar unmittelbar benachbarter Zellkerne (weißer Pfeil). Reife Trophoblastriesenzellen (gelber Pfeil) sind ungefärbt.

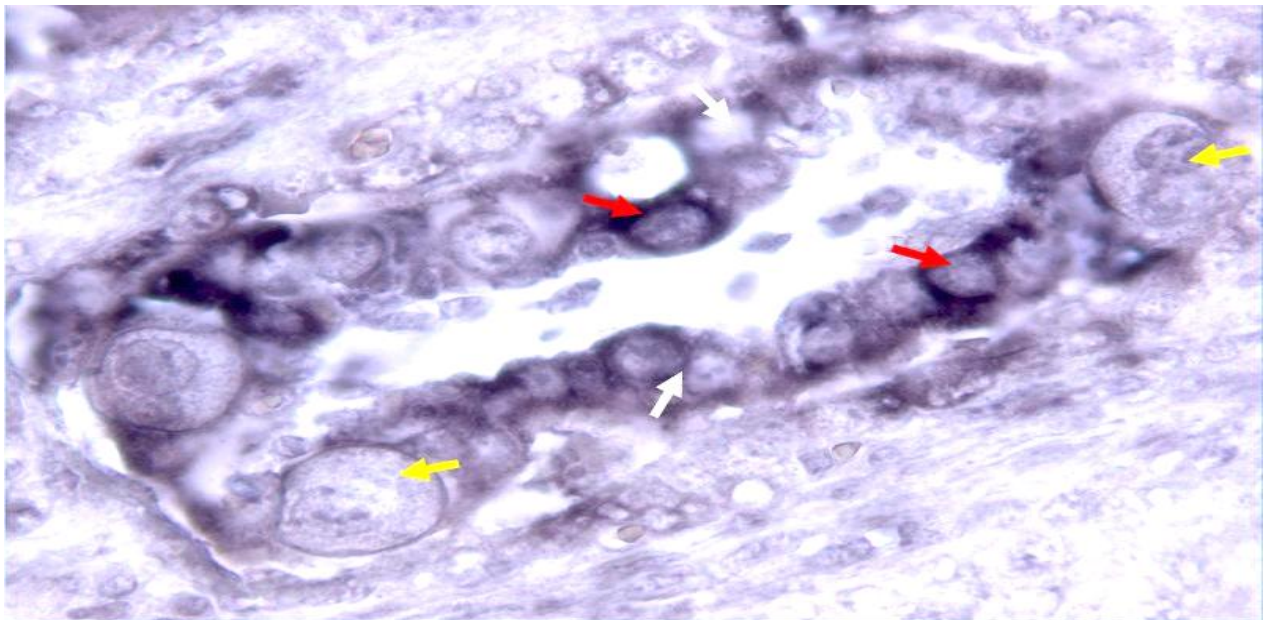


Abb. 30: In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA im Plazentom eines 233 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: 400x). Spezifische zytoplasmatische und perinukleäre Signale in einzelnen einkernigen Trophoblastzellen (rote Pfeile), während andere UTC (weiße Pfeile) und reife Trophoblastriesenzellen (gelbe Pfeile) kein Signal aufweisen.

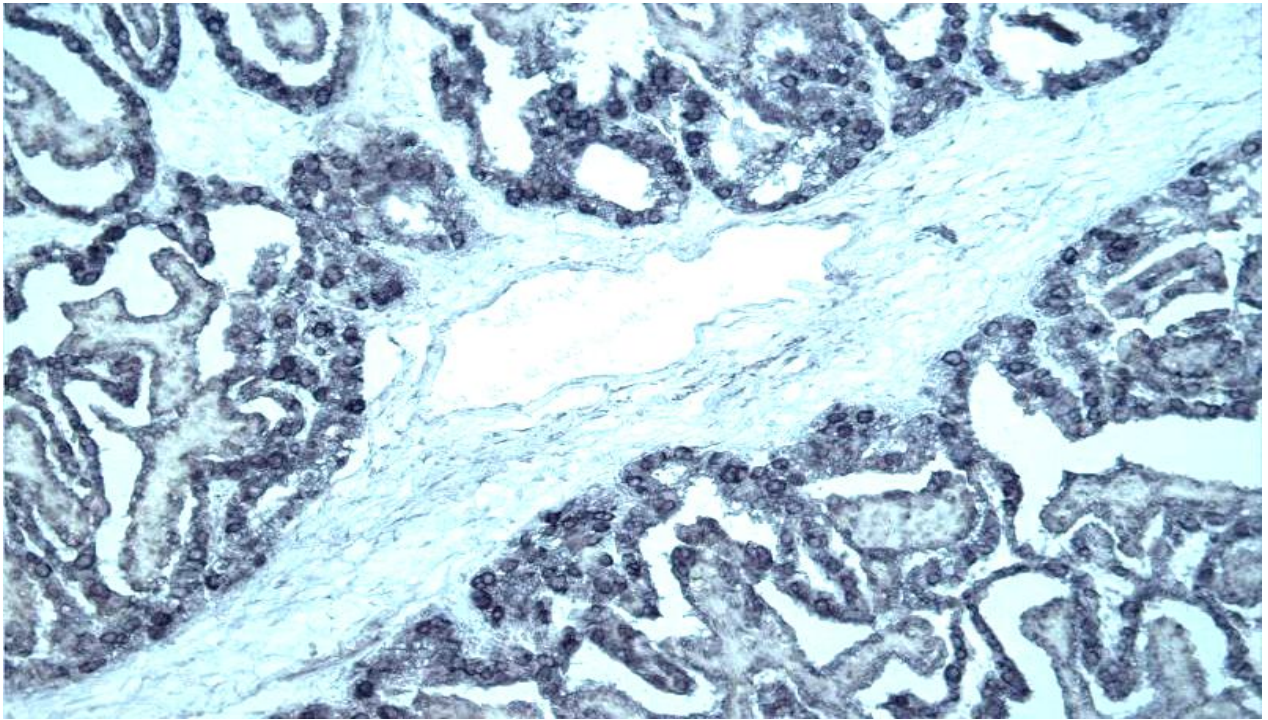


Abb. 31: In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA im Plazentom eines 155 Tage graviden Rindes (Vergrößerung: 100x).

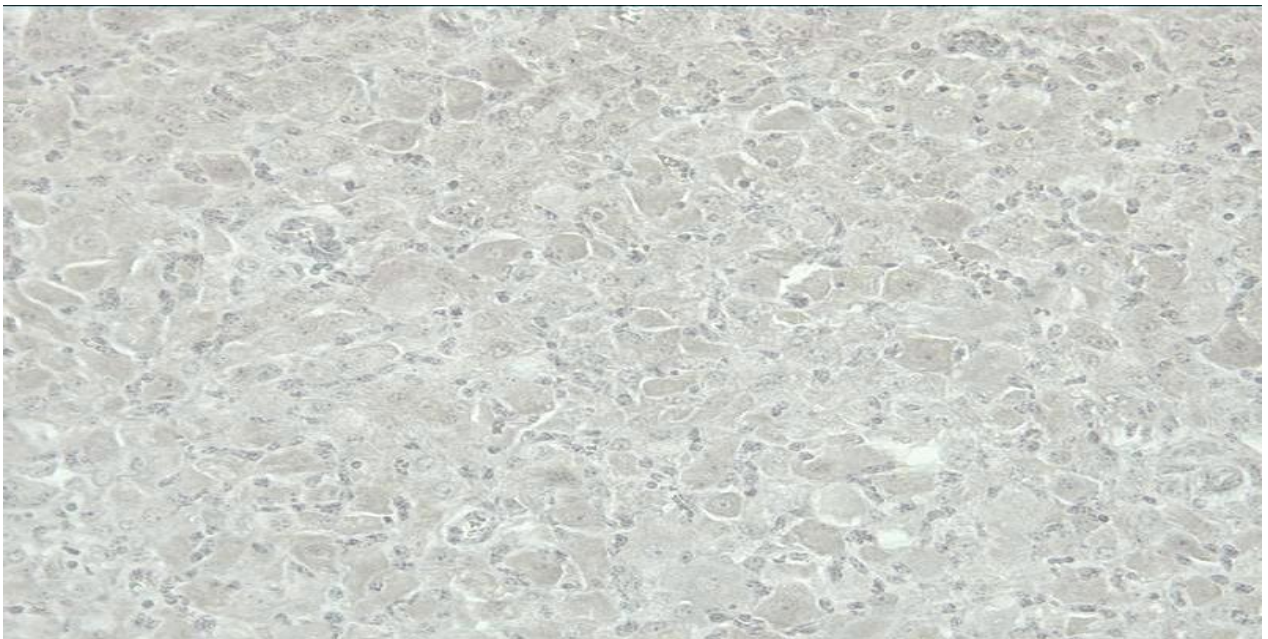


Abb. 32: Negativkontrolle zur In situ-Hybridisierung zur Lokalisierung 3 β -HSD-spezifischer mRNA (Corpus luteum). Hier wurde die spezifische anti-sense-Sonde durch Hybridisierungspuffer ersetzt. Es finden sich keinerlei Signale. (Vergrößerung: 400x)

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Ergebnisse zur Expression der P450c17

Das zur immunhistologischen Darstellung von P450c17 eingesetzte polyklonale Antiserum wurde gegen das rekombinante Molekül des Rindes erzeugt (PETERSON et al. 2001) und erkennt im Western Blot eine einzige deutliche Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 58 kDa. Dies spricht für die Spezifität des etablierten immunhistologischen Verfahrens.

Die Expression von P450c17 im Trophoblasten weist eine deutliche Abhängigkeit vom Graviditätsstadium auf. Nach starker Expression bis zum ca. 155. Graviditätstag verschwindet das Signal mehr oder weniger vollständig aus weiten Bereichen des Zottenbaums. Erst 10 bis 14 Tage vor der präpartalen Luteolyse kommt es zu einer erneuten starken Aufregulation der Expression im gesamten Zottenbaum. Dieser Expressionsverlauf korreliert positiv mit den Östrogenkonzentrationen und negativ mit den Progesteronkonzentrationen in den Plazentomen (TSUMAGARI et al. 1994, SCHULER et al. 2000). Die Steuerung dieser ausgeprägten Veränderungen ist derzeit unklar.

Ein ähnliches P450c17-Expressionsprofil wurde auch in der Nebennieren von Rinderfeten beobachtet (CONLEY et al. 1992). Möglicherweise besteht eine funktionelle Kopplung von fetaler adrenaler und plazentarer P450c17-Expression. Für die Spätgravidität des Schafes wurde postuliert, dass Cortisol aus der fetalen Nebennierenrinde im Trophoblasten die Cyclooxygenase 2 (COX-2) stimuliert und ein hieraus resultierender PGE₂-Anstieg unter der Geburt einen starken Anstieg der P450c17-Expression bewirkt (CHALLIS et al. 1997, FOWDEN et al. 1998, WHITTLE et al. 2001). In einer an Rinderplazentomen parallel zur P450c17-Expression durchgeführten Untersuchung zur Expression der COX-2 (SCHULER et al. 2004) wurde gezeigt, dass im letzten Graviditätsdrittel die Expression von COX-2 und P450c17 praktisch identisch verläuft, was darauf hinweist, dass der beim Schaf postulierte funktionelle Zusammenhang in der Spätgravidität offensichtlich auch beim Rind vorhanden ist. Allerdings konnte im zweiten Graviditätsdrittel (Tag 100-155) im Gegensatz zu P450c17 für die COX-2 im Rindertrophoblasten nur eine basale Expression festgestellt werden. Daher müssen für die in diesem Zeitraum erhöhte plazentare P450c17-Expression andere Regulationsmechanismen verantwortlich sein.

Die Expression der P450c17 wurde ausschließlich in den einkernigen Trophoblastzellen (UTC) beobachtet. Zellen, welche morphologische Charakteristika differenzierender oder reifer Trophoblastriesenzellen (TGC) aufwiesen, waren immunhistologisch stets P450c17-negativ. Falls

das derzeitige Konzept zutrifft, nach dem sich die TGC durch eine Serie von azytokinetischen Mitosen und Endomitosen aus einer homogenen UTC-Population differenzieren (KLISCH et al. 1999b), müsste der Eintritt der UTC in die TGC-Differenzierung mit einem raschen Verlust der P450c17-Expression verbunden sein. Ob dem Verlust der P450c17-Expression eine regulatorische Funktion im Rahmen der TGC-Differenzierung zukommt oder ob er lediglich eine Begleiterscheinung darstellt, ist derzeit unklar. Die Interpretation der P450c17-Expression im Hinblick auf eine Bedeutung in der Trophoblastzelldifferenzierung wird dadurch erschwert, dass P450c17 zwischen dem ca. 155. Graviditätstag bis in den unmittelbaren präpartalen Zeitraum in weiten Teilen des Zottenbaums nicht nachweisbar ist, wobei morphologisch kein Unterschied zwischen P450c17-positiven und -negativen Arealen festzustellen ist. Möglicherweise ist die P450c17-Expression in den "negativen" Bereichen zwar unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Primärantikörperverdünnung, jedoch ausreichend für die Erzielung lokaler biologischer Effekte. Unabhängig davon haben die eigenen Untersuchungen gezeigt, dass die morphologisch unterscheidbaren Trophoblastzellen des Rindes, UTC bzw. TGC, eine unterschiedliche steroidogene Kompetenz besitzen.

In der Chorionplatte der Kotyledonen abseits der Insertionsstellen der Primärzotten war, unabhängig vom untersuchten Graviditätsstadium, keine P450c17-Expression feststellbar. Ebenso war im interkotyledonären Trophoblasten, der bei einigen wenigen Gewebeproben vorhanden war, kein Signal nachweisbar. Dies spricht dafür, dass P450c17 nur dort exprimiert wird, wo der Trophoblast in intensiver Verbindung mit dem mütterlichen Gewebe steht. Da die Anteile des Chorions, welche im späteren Verlauf der Gravidität in die Krypten der Karunkelanlagen des Endometriums eindringen, nicht fetal vorbestimmt sein können, müssen für die Induktion und Unterhaltung der P450c17-Expression im Trophoblasten auch maternale Faktoren erforderlich sein.

5.2 Diskussion der Ergebnisse zur Expression der Aromatase

Obwohl die Aromataseexpression der Rinderplazenta seit langem nachgewiesen ist (HINSHELWOOD et al. 1993, TSUMAGARI et al. 1993, SCHULER et al. 1994, FÜRBASS et al. 1997), war das Expressionsmuster auf zellulärer Ebene bisher unbekannt. Für die immunhistologische Lokalisierung der Aromatase standen zwei Primärantikörper zur Verfügung:

- 1) ein polyklonales Antiserum aus dem Kaninchen gegen die Aromatase des Menschen;
- 2) ein monoklonaler muriner Antikörper, der gegen ein Peptid erzeugt worden war, dessen Sequenz einem bei vielen Spezies - inklusive dem Rind - vollständig konserviertem Bereich aus dem C-terminalen Bereich der Aromatase entsprach. Beide Antikörper erkennen im Western Blot in mikrosomalen Fraktionen aus Plazentomen eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Die teilweise geringfügigen Unterschiede im Molekulargewicht zur Aromatase anderer Spezies erklären sich aus speziesspezifischen Unterschieden in der Molekülgröße (CORBIN et al. 2003). Während bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers praktisch keine weiteren Banden auftreten, färbt das polyklonale Antiserum eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 75kDa. Der Ursprung dieser zusätzlichen Bande ist unklar. HARADA (persönliche Mitteilung) beobachtete derartige unspezifische Banden vermehrt bei der Verwendung von gefrierkonserviertem Gewebe, weniger in Präparationen aus frischem Gewebe.

In Gewebeschnitten von Rinderovarien mit einem oder mehreren großen Follikeln färbten beide Antikörper ausschließlich das Zytoplasma von Granulosazellen des dominanten Follikels, während in Granulosazellen weiterer vorhandener Tertiärfollikel sowie in den übrigen Zelltypen des Ovars keine Signale vorhanden waren. Aus den Vorversuchen ist insgesamt zu schließen, dass beide Primärantikörper auch in paraffineingebettetem Gewebe spezifisch die Aromatase des Rindes erkennen.

Mit dem monoklonalen Antikörper waren im Gegensatz zu den Brunstfollikeln in den Plazentomen keinerlei spezifische Signale zu erkennen. Dies ist in Anbetracht der eindeutigen, spezifischen Signale in bovinen Granulosazellen sowie der deutlichen spezifischen Banden bei der Western Blot-Analyse von mikrosomalen Fraktionen aus der Plazenta schwer zu erklären. Im Gegensatz zum Schwein, bei dem drei verschiedene, von unterschiedlichen Genen kodierte Aromatase-Isoformen bekannt sind (CONLEY et al. 1997), wurde bisher beim Rind nur ein einziges Gen identifiziert. Die Aromatase-spezifische mRNA setzt sich aus 10 Exons zusammen. Durch die Verwendung alternativer Exons 1 kommt es beim Rind zwar zur Bildung organspezifischer Transkripte, der kodierende Bereich dieser mRNA-Varianten ist jedoch identisch (FÜRBASS et al. 1997, CONLEY und HINSHELWOOD, 2001). Dennoch besteht die Möglichkeit der Bildung organspezifischer Varian-

ten des "reifen" Aromatase-Moleküls. Für die Aromatase des Rindes wurde die Bildung einer N-terminal um 15 Aminosäuren verkürzten Variante durch die Verwendung eines alternativen Startkodons bei der Translation gezeigt (CORBIN et al. 2003). Diese Variante trat jedoch nur bei der in vitro-Expression in Insektenzellen auf, bei aus Granulosazellen bzw. Plazenta isolierter Aromatase war sie nicht nachweisbar. Eine weitere Möglichkeit der Bildung organspezifischer Varianten ist die Glykosylierung. Für die Aromatase des Rindes wurde eine Glykosylierung im N-terminalen Bereich - also weit entfernt vom C-terminal gelegenen Epitop des monoklonalen Antikörper H4 - nachgewiesen (CORBIN et al. 2003). Theoretisch wäre es möglich, dass eine unterschiedliche Glykosylierung auch im N-terminalen Bereich eine unterschiedliche dreidimensionale Konformation bzw. Zugänglichkeit des H4-Epitops im C-Terminus unter den Bedingungen im Gewebeschnitt hervorruft, deren Effekt jedoch durch die Denaturierung vor der Gelelektrophorese aufgehoben wird. In der Gelelektrophorese ergaben sich beim Rind jedoch keine Hinweise auf Strukturunterschiede zwischen ovarieller und plazentarer Aromatase, es waren keinerlei Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit zu erkennen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die fehlende spezifische Färbung in den Rinderplazentomen durch den monoklonalen Antikörper H4 ist eine gewebespezifische Interaktion der Aromatase mit anderen Molekülen. Die Aromatase ist ein transmembranöses Protein. Möglicherweise wird durch einen zelltypspezifischen Einbau in die mikrosomalen Membranen oder die zelltypspezifische Interaktion mit anderen Molekülen, wie beispielsweise den Elektronenzulieferern, das Epitop des monoklonalen Antikörpers H4 im Trophoblasten blockiert, während ein polyklonales Antiserum in seiner Bindungsfähigkeit durch derartige Einflüsse erheblich weniger beeinträchtigt würde. Eine solche Ursache würde auch erklären, warum die Aromatase der Rinderplazenta im Western Blot unter denaturierenden Bedingungen von beiden Primärantikörpern gleichermaßen gut erkannt wird.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die unterschiedlichen Färbemuster der beiden verwendeten Primärantikörper in den Rinderplazentomen ist, dass die Expression auf zellulärer Ebene in den Plazentomen erheblich niedriger ist als in den Granulosazellen des dominanten Follikels. Die v.a. in der Spätphase der Gravidität erreichten maternalen Östrogen-Plasmaspiegel übersteigen zwar diejenigen brünstiger Kühe um ein Vielfaches (HOFFMANN et al. 1997), allerdings ist auch die Gesamtmasse der Kotyledonen sehr viel höher als die der Granulosazellen, wobei jedoch wiederum berücksichtigt werden muss, dass in den Kotyledonen nicht alle Zellen Aromatase exprimieren. Eine grobe Einschätzung des quantitativen Verhältnisses der Aromataseexpression zwischen Granulosazellen und Plazenta erlauben die Resultate der Western-Blot-Experimente. Dort wurden mit einer Granulosa-

zell-Präparation trotz der niedrigeren aufgetragenen Proteinmenge viel stärkere Banden erhalten als mit Präparationen aus Kotyledonen. Die unterschiedliche Reaktion der beiden Primärantikörper in den Plazentomen könnte dadurch erklärt werden, dass das immunhistologische Verfahren unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers deutlich weniger sensitiv ist, da nur ein einziges Epitop erkannt wird.

Mit dem polyklonalen Antikörper wurden in einem Teil der Rinderplazenta-Gewebeproben hochspezifische deutliche zytoplasmatische Signale in den Trophoblastriesenzellen und deren Vorläufern erhalten. In einem erheblichen Teil der Gewebeproben waren jedoch trotz der Bemühungen um ein standardisiertes Vorgehen von der Probengewinnung bis zur Paraffineinbettung durch das Vorhandensein eines starken, diffusen unspezifischen Hintergrundes die als spezifisch betrachteten zytoplasmatischen Reaktionen in den Trophoblastriesenzellen kaum zu erkennen. Dennoch ist aufgrund der Gesamtergebnisse der durchgeführten Kontrollexperimente davon auszugehen, dass das in den Trophoblastriesenzellen beobachtete Signal spezifisch der Aromatase zugeordnet werden kann. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in Übereinstimmung mit Untersuchungen zur Enzymaktivität (TSUMAGARI et al. 1994) dieses Signal am Graviditätsende bzw. nach Abschluss der termingerechten Geburt verstärkt war (Abb. 25).

Die durchgeführten Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, dass die Aromatase praktisch ausschließlich in den TGC lokalisiert ist. Obwohl aus methodischen Gründen auf eine quantitative Auswertung hinsichtlich der Abhängigkeit der Expression vom Graviditätszeitpunkt verzichtet wurde, kann festgestellt werden, dass positive Reaktionen v.a. im Bereich der Basis von Primärzotten vorhanden waren, während das Signal in den weiter apikal gelegenen Anteilen des Zottenbaumes immer schwächer wurde bzw. vollständig verschwand. Dieses Expressionsmuster ist komplementär zur Expression des Östrogenrezeptors α im Karunkelepithel (SCHULER et al. 2002), dessen Expression zur Basis der Primärzotten hin teilweise deutlich abnahm. Dies spricht dafür, dass im Karunkelepithel Östrogenrezeptor α durch hohe lokale Östrogenkonzentrationen herunterreguliert wird.

Teilweise waren neben den Signalen in den Trophoblastriesenzellen schwächere zytoplasmatische Signale in den Karunkelepithelzellen vorhanden (Abb. 24), die in den entsprechenden Negativkontrollen nicht auftraten. Es handelt sich somit um eine spezifische Färbung durch das polyklonale Aromatase-Antiserum. Ob diese Färbereaktionen allerdings tatsächlich auf einer Erkennung der Aromatase beruhen, ist derzeit unklar. Bisherige Untersuchungen haben die Östrogensynthese und damit die Aromataseexpression in der Rinderplazenta primär im fetalen Teil der Plazentome lokalisiert

(HOFFMANN 1983). Über das Vorhandensein einer Aromataseexpression in den Karunkeln liegen derzeit keine Informationen vor. Im Endometrium von Primaten wurde jedoch unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen über eine Aromataseexpression berichtet, wobei die Expression im Stroma allerdings deutlich stärker war als in epithelialen Zellen (HUANG et al. 1991, TSENG 1984, TSENG et al. 1982). Insgesamt zeigen diese Untersuchungen jedoch, dass unter bestimmten Umständen auch das Endometrium Aromatase exprimieren kann. Somit ist nicht auszuschließen, dass dem im Karunkelepithel beobachteten Signal tatsächlich eine - wenn auch sehr schwache - Aromataseexpression zugrunde liegt.

Vorliegende Untersuchungen haben gezeigt, dass die P450c17 in den UTC und die Aromatase in den TGC des Trophoblasten lokalisiert ist. Dies bedeutet, dass diese beiden essentiellen Enzyme der Östrogensynthese auf zellulärer Ebene innerhalb des Trophoblasten getrennt sind. Somit ist auch in der Rinderplazenta, ähnlich wie in Ovar und Nebennierenrinde, das Prinzip der räumlichen Trennung von Schlüsselenzymen der Steroidbiosynthese verwirklicht (CONLEY et al. 1997). Besonders ausgeprägt ist diese räumliche Trennung von P450c17 und Aromatase bei der graviditätsassoziierten Östrogenproduktion von Mensch und Pferd, bei denen aufgrund der fehlenden P450c17-Expression in der Plazenta die entsprechenden Umwandlungsschritte durch die P450c17 in der fetalen und maternalen Nebennierenrinde bzw. in den Gonaden bewerkstelligt werden (DICZFALUSY 1964, PASHEN und ALLEN 1979).

Die biologischen Funktionen der plazentaren Östrogenproduktion beim Rind sind auf molekularer Ebene immer noch unklar. Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass sie wichtige Faktoren bei der Steuerung von Wachstum und Differenzierung der Karunkeln sind. Hierauf deuten v.a. die Expression von Östrogenrezeptoren in Karunkelstroma- und Karunkelepithelzellen hin (HOFFMANN und SCHULER 2002). Bei verschiedenen Spezies konnte aber gezeigt werden, dass auch der fetale Teil der Plazenta Östrogen-responsiv ist. So war beispielsweise bei graviden Schafen nach Applikation eines Aromatase-Hemmers die plazentare Progesteronproduktion signifikant vermindert (WEEMS et al. 2001). In den Kotyledonen des Rindes ist ausschließlich der Östrogenrezeptor β (ER β) nachweisbar. Dieser wird innerhalb der Kotyledone am stärksten in den reifen TGC exprimiert (SCHULER et al. 2004). Die Kolo-kalisation von Aromatase und ER β in den TGC deutet auf eine Funktion der plazentaren Östrogene als autokrine Regulatoren der TGC-Differenzierung hin. Eine ähnliche Bedeutung wurde für die plazentaren Östrogene auch in der Humanplazenta bei der Differenzierung des Synzytiotrophoblasten aus dem Cytotrophoblasten postuliert (BUKOVSKY et al. 2003).

5.3 Diskussion der Ergebnisse zur Expression der 3 β -HSD

Zur Lokalisierung der 3 β -HSD auf zellulärer Ebene wurde in Ermangelung eines beim Rind für die Immunhistologie geeigneten Antikörpers ein In situ-Hybridisierungsverfahren etabliert, wobei für die Sondenherstellung PCR-generierte Matrizen verwendet wurden. Für den ersten Schritt der Nested PCR wurden Primer aus hochkonservierten Bereichen der 3 β -HSD entworfen, die zur Amplifikation eines 890 bp langen Fragments führte. Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts ergab eine völlige Übereinstimmung mit der von ZHAO et al. (1989) beschriebenen gonadalen Form. Die Existenz einer eigenen plazentaren Isoform, wie teilweise bei anderen Spezies beschreiben (LOU et al. 1994, GRAHAM et al. 1991, KHANNA et al. 1995a, KHANNA et al. 1995b, LINN und PENNING 1995, ABBASZADE et al. 1997), ist somit beim Rind unwahrscheinlich.

Mit dem entwickelten Verfahren ergaben sich in dem als Positivkontrolle eingesetzten Gelbkörper eines Rindes ausschließlich in den Lutealzellen spezifische Signale mit der für die In situ-Hybridisierung charakteristischen zytoplasmatischen und perinukleären subzellulären Lokalisation. In den Negativkontrollen, in denen die spezifische Sonde durch den Hybridisierungspuffer ersetzt wurde, waren keinerlei Signale vorhanden. In den mittels der entsprechenden sense-dig-RNA etablierten Negativkontrollen fanden sich in den Plazentomen in einem Teil der Zellen schwache bis mäßige, ausschließlich nukleär lokalisierte unspezifische Signale. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das bei der Verwendung der anti-sense-Sonde beobachtete zytoplasmatische/perinukleäre Signal in den Plazentomen 3 β -HSD-spezifisch ist.

In den Plazentomen fanden sich spezifische Reaktionen ausschließlich im Trophoblasten und betrafen überwiegend Zellen, deren Gesamt- bzw. Kerngröße denen der UTC entsprachen. Damit können die UTC primär als Ort der Expression von 3 β -HSD angesehen werden. Eine deutliche Farbreaktion war jedoch auf einzelne Zellen beschränkt, ein größerer Teil der UTC war schwach positiv oder - wie die reifen TGC - negativ. Auffallend häufig waren Paare eng nebeneinander liegender Kerne von einem intensiven Signal umgeben, wobei der Zytoplasmasaum um die betroffenen Kerne schmal war. Da in den Gewebeschnitten die dritte Dimension weitgehend fehlt, liegt der "wahre" Anteil der "Paar-Reaktionen" möglicherweise deutlich höher. Da aufgrund der Proteinasebehandlung die Zellgrenzen nicht eindeutig zu erkennen waren, ist unklar, ob es sich hierbei um aus der Teilung von UTC hervorgehende Tochterzellen oder um relativ kleine diploide Zellen, also frühe Stadien der TGC - Differenzierung handelt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Aufregulation der 3 β -HSD-spezifischen mRNA entweder an ein bestimmtes Stadium des Zellzyklus in

den UTC gebunden ist oder ein frühes Ereignis der TGC - Differenzierung darstellt. Da der Trophoblast in den Rinderplazentomen eine außerordentlich hohe Zelldynamik aufweist (HOFFMANN und SCHULER 2002) und die Zeitspanne zwischen der Bildung der mRNA und des Proteins unbekannt ist, kann im vorliegenden Fall, basierend auf dem Reaktionsmuster der In situ-Hybridisierung, kaum eine exakte Aussage getroffen werden, welcher Zelltyp primär das funktionelle Protein exprimiert. Unbeschadet dieser Unklarheiten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die 3 β -HSD-Expression im Trophoblasten der Rinderplazentome, bezogen auf den Prozess der Differenzierung der TGC aus den UTC, wie die P450c17- und Aromatase-Expression, phasenspezifisch erfolgt.

5.4. Schlussfolgerungen

In diesen Untersuchungen wurde erstmals gezeigt, dass im Rindertrophoblasten steroidogene Schlüsselenzyme auf zellulärer Ebene - ähnlich wie in dominanten Ovarfollikeln oder in der Nebennierenrinde - auf zellulärer Ebene kompartmentalisiert sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung der einkernigen Trophoblastzellen zu Trophoblastriesenzellen mit charakteristischen Veränderungen im Expressionsmuster steroidogener Enzyme einhergeht. Die Kolo-kalisation von Aromatase und Östrogenrezeptor β in den reifen Trophoblastriesenzellen legt den Schluss nahe, dass die plazentaren Östrogene über einen autokrinen oder intrakrinen Mechanismus eine regulatorische Funktion in der Trophoblastriesenzelldifferenzierung beim Rind spielen. Die bezüglich der P450c17 beobachteten ausgeprägten Veränderungen im Expressionsmuster sprechen dafür, dass die plazentare Steroidproduktion bereits vor den unmittelbaren präpartalen Umstellungen bestimmten Regelmechanismen unterliegen muss, die bisher noch völlig unklar sind.

Zur weiteren Definition und Präzisierung möglicher parakriner und auto/intrakriner Wirkungen placentarer Steroide beim Rind sollten mit vorliegender Arbeit ergänzende Informationen zur zellulären Lokalisation der an der Steroidsynthese beteiligten Enzyme erhalten werden. Insbesondere sollte dabei die steroidogene Kompetenz der beiden Trophoblastzellenarten des Rindes, der uninukleären Trophoblastzellen (UTC) sowie der meist zweikernigen Trophoblastriesenzellen (TGC), näher definiert werden. Dies sollte durch Darstellung der Expressionsmuster der Schlüsselenzyme 17 α -Hydroxylase-C17/20-Lyase (P450c17), 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD) und Aromatase erfolgen.

Plazentome wurden von trächtigen Kühen zwischen dem 100. Graviditätstag und dem Zeitpunkt der Geburt gewonnen. Für die Immunhistochemie wurden diese in 10 %-igem neutralem Phosphat gepuffertem Formalin sowie in 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) für 24 Stunden fixiert und in Paraffin eingebettet. Zusätzlich wurden für die PCR kleine Gewebestücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Für den immunhistologischen Nachweis der Aromatase erwies sich eine 20 minütige Hitzvorbehandlung der Gewebeschnitte bei 95 °C als erforderlich, beim Nachweis der P450c17 konnte dieser Schritt entfallen. Als Primärantikörper wurde ein Kaninchenserum gegen rekombinante menschliche Aromatase verwendet. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde durch Western-Blot-Experimente an mikrosomalen Fraktionen aus Kotyledonengewebe bestätigt. Die Darstellung der P450c17 erfolgte unter Verwendung eines vom Kaninchen gewonnenen polyklonalen Antiserums gegen rekombinante P450c17 des Rindes. In den Negativkontrollen wurden die Primärantikörper durch Serum eines nicht immunisierten Kaninchens ersetzt.

Die Darstellung der 3 β -HSD erfolgte mittels in situ Hybridisierung an formalinfixiertem Probenmaterial. Die verwendete Digoxigenin-gekoppelte Sonde wurde durch in vitro Transkription von PCR-generierten Matrizen gewonnen und entsprechen den Basen 619-860 einer publizierten, rinderspezifischen 3 β -HSD-Sequenz [Accession Nummer X17614].

Bezüglich der Expression der Aromatase ergaben sich spezifische Signale in den TGC. Die Signalstärke nahm mit zunehmendem Differenzierungsgrad zu und war besonders deutlich im Bereich der Primärzotten nahe der Chorionplatte. Unter der Geburt war das Signal weiterhin in den TGC erkennbar, die sich zu diesem Zeitpunkt in unterschiedlichen Stadien der Degeneration befanden.

Die Expression von P450c17 wurde ausschließlich in den UTC beobachtet. Vom 110.-155. Trächtigkeitstag wurde P450c17 in allen Bereichen der Plazentome gleichmäßig exprimiert. In der Folgezeit war die P450c17-Expression weitgehend auf die Primärzotten sowie die Abzweigungen der Sekundärzotten beschränkt. Am 270. Graviditätstag war erneut in allen Teilen der Chorionzotten eine nahezu gleichmäßige, starke Expression vorhanden. Im Trophoblasten der Chorionplatte sowie im interkotyledonären Trophoblasten waren keine eindeutigen Signale für P450c17 erkennbar.

Eine deutliche 3 β -HSD-Expression ergab sich in den UTC. Vereinzelt hatte es auch den Anschein, dass kleine, zweikernige Zellen, positiv waren. Aufgrund der methodebedingten Beeinträchtigung der Morphologie war jedoch nicht zu unterscheiden, ob es sich bei letzteren um einzelne, gerade aus einer Zellteilung hervorgegangene UTC oder um unreife TGC handelte. Somit könnte die Aufregulation der 3 β -HSD-Expression mit einem bestimmten Stadium des Zellzyklus in den UTC oder mit dem Beginn der TGC-Differenzierung assoziiert sein.

Die Ergebnisse des immunhistologischen Aromatase-Nachweises zeigen, dass dieses Enzym im Trophoblasten ausschließlich in TGC exprimiert und offensichtlich gegen Ende der Gravidität aufreguliert wird.

Die Expression von P450c17 erfolgte ausschließlich in den UTC. Da sich die TGC aus den UTC differenzieren, muss die Differenzierung der UTC in die TGC mit einer raschen Herunterregulierung der P450c17-Expression verbunden sein. Wie die semiquantitative Bestimmung der P450c17-Expression zeigt, nimmt diese nach hohen Werten um die Graviditätsmitte in der Folgezeit deutlich ab, um zur Geburt hin wieder erheblich anzusteigen.

In order to further define and specify possible paracrine and/or auto-/intracrine effects of steroids secreted by the bovine placenta, the present work was designed to obtain information on the cellular localization of enzymes participating in steroid biosynthesis. Particular attention in respect to their steroidogenic capacity was given to the two distinct cell types forming the bovine trophoblast, the uninucleated trophoblast cells (UTC) and binucleated giant cells (TGC). In order to obtain this information it was attempted to demonstrate expression patterns of the following steroidogenic key enzymes: 17 α -hydroxylase-C17/20-lyase (P450c17), 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (3 β -HSD) and aromatase.

Placentomes were obtained from cows between day 100 of pregnancy and normal term. For immunohistochemistry they were fixed in 10 % neutral buffered formalin and in 4 % paraformaldehyd for 24 hours and then embedded in paraffin. For PCR, small tissue samples were shock-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

For the immunohistochemical detection of aromatase, heat treatment of tissue sections over 20 minutes in an antigen unmasking solution proved to be necessary. This step could be omitted for detection of P450c17. The primary antibody used for the detection of aromatase was from a rabbit and directed against recombinant human aromatase. Specificity of the antiserum was confirmed using microsomal fraction prepared from cotyledons in Westen Blot. The primary polyclonal antiserum applied for the detection of P450c17 was generated against bovine recombinant P450c17. Serum from non-immunized rabbit were used as negative control.

Detection of 3 β -HSD was achieved by in situ hybridisation using formalin fixed paraffin embedded tissue samples. The digoxigenin coupled probes were prepared by in vitro transcription using PCR-generated templates and corresponded to the nucleotides 619-680 of a published bovine 3 β -HSD sequence [Accession Number X17614].

Expression of aromatase was detected in TGC. Staining intensity increased with proceeding differentiation and was most pronounced in the primary villi close to the chorionic plate. At parturition aromatase specific signals were still present in TGC exhibiting different degrees of degeneration.

Expression of P450c17 was clearly and exclusively observed in UTC. Staining was evenly distributed between days 100-155, but was afterwards largely restricted to primary villi and the branching sites of secondary villi until day 270, when a more homogeneous and intense staining reoccurred. The trophoblast cells of the chorionic plate and of the intercotyledonary chorion stained virtually negative.

Since the TGC originate from differentiation of UTC, this process must be associated with a rapid down-regulation of P450c17.3 β -HSD specific mRNA was detected in UTC. In some cases the hybridisation signals were observed around two nuclei in close vicinity. Due to the method-dependent impairment of tissue morphology, it was impossible to decide whether these cells were daughter UTCs evolving from a mitosis or early differentiating TGC. Thus up-regulation of 3 β -HSD expression could be associated with a certain stage of the cell cycle in UTC or with the beginning of the TGC differentiation.

The results concerning aromatase expression obtained by immunohistochemistry indicate that the expression of this enzyme was only observed in TGC where it is apparently up-regulated towards the end of pregnancy.

ABBASZADE, G.I., ARENSBURG, J., PARK, C.J., KASA-VUBU, Z.J., ORLY, J., PAYNE, H.A. (1997)

Isolation of a new mouse 3 β -hydroxysteroiddehydrogenase isoform, 3 β -HSD VI, expressed during early pregnancy.

Endocrinology 138 : 1392-1399

ARAKANE, F., KINGS, R.S., DU, Y., KALLEN, B.C., WALSH, P.L., WATARI, H., STOCCO, M.D., STRAUSS, F.J. (1997)

Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity.

J Biol Chem 51 : 32656-32662

ATKINSON, B. A., KING, G.J., AMOROSO E.C. (1984)

Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium.

Biol Reprod 30 : 763-774

BAZER, F.W. (1992)

Mediators of maternal recognition of pregnancy in ruminants.

Proc Soc Exp Biol Med 199 : 373-384

BAZER, F.W., SIMMEN, R.C., SIMMEN, F.A. (1991)

Comparative aspects of conceptus signals for maternal recognition of pregnancy.

Ann N Y Acad Sci 622 : 202-211

BENIRSCHKE, K., KAUFMANN, P. (1995)

Pathology of human placenta.

3.Ausgabe. Springer-Verlag New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hongkong Barcelona, Budapest, 1-871

BEN-ZIMRA, M., KOLER, M., ORLY, J. (2002)

Transcription of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in the placenta: activating protein-2 assumes the role of steroidogenic factor-1 by binding to an overlapping promoter element.
Mol Endocrinol 16 : 1864-1880

BIRGEL, E.H., ZERBE, H., GRUNERT, E. (1996)

Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen.
Prakt Tierarzt 77 : 627-630

BJÖRKMAN, N.H. (1954)

Morphological and histological studies on the bovine placentome.
Acta Anat (Suppl) 22 : 1-99

BJÖRKMAN, N.H. (1968)

Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome.
J Ultrastruct Res 24 : 249-258

BJÖRKMAN, N.H. (1969)

Light and electron microscopic studies on cellular alteration in the bovine placentome.
Anat Rec 163 : 17-30

BOOS, A., KOHTES, J., STELLJES, A., ZERBE, H., THOLE, H.H. (2000)

Immunohistochemical assessment of progesterone, estrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth with or without retention of fetal membranes.
J Reprod Fertil 120 : 351-360

BRUEGGMEIER, R.W. (1990)

Biochemical and molecular aspects of aromatase.
Enzym Inhibition 4 : 101-111

BUKOVSKY, A., CAUDLE, M.R., CEKANOVA, M., FERNANDO, R.I., WIMALASENA, J., FOSTER, J.S., HENLEY, D.C., ELDER, R.F. (2003)

Placental expression of estrogen receptor β and its hormone binding variant-comparison with estrogen receptor α and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells.

Reprod Biol Endocrinol 15 : 36

CHALLIS, J.R.G., LYE, S.J., GIBB, W. (1997)

Prostaglandins and parturition.

Ann NY Acad Sci 828 : 254–267

COMPAGNONE, N. A., MELLON, H.S. (2000)

Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators.

Front Neuroendocrinol 21 : 1-56

CONLEY, A., CORBIN, J., SMITH, T., HINSHELWOOD, M., LIU, Z., SIMPSON, E. (1997)

Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene.

J Steroid Biochem Mol Biol 61 : 407-413

CONLEY, A., HINSHELWOOD, M. (2001)

Mammalian aromatases.

Reproduction 121 : 685-695

CONLEY, A.J., HEAD, J.R., STIRLING, D.T., MASON, J.I. (1992)

Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation.

Endocrinology 130 : 2641-50

CONLEY, J.A.; BIRD, M. I. (1997)

The role of cytochrome P450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroiddehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ -5 and Δ -4 pathways of steroidogenesis in mammals.

Biol Reprod 56 : 789-799

CORBIN, JO. C., MAPES S.M., LEE YOUNG, M., CONLEY, A.J. (2003)

Structural and functional differences among purified recombinant mammalian aromatases: glycosylation, N-terminal sequence and kinetic analysis of human, bovine and porcine placental and gonadal isoenzymes.

Mol Cell Endocrinol 206 : 147-157

DICZFALUSY, E. (1964)

Endocrine functions of the human fetoplacental unit.

Fed Proc 23 : 45-58

DIVJAK, M., GLARE, E.M., WALTERS, E.H. (2002)

Improvement of non-radioactive in situ hybridization in human airway tissues: use of PCR-generated templates for synthesis of probes and an antibody sandwich technique for detection of hybridization.

J Histochem Cytochem 50 : 541-548

ELEY, R.M., THATCHER, W.W., BAZER, F.W. (1979)

Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development.

J Reprod Fertil 55 : 181-190

FOWDEN, A.L., LI, J., MORHEAD, A.J. (1998)

Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance?

Proc Nutr Soc 57 : 113–122

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

FÜRBASS, R., SAID, M.H., SCHWERIN, M., VANSELOV, J. (2001)

Chromatin structure of the bovine Cyp19 promoter 1.1 - DNaseI hypersensitive sites and DNA hypomethylation correlate with placental expression.

Eur J Biochem 268 : 1222-1227

GINGRAS, S., SIMARD, J. (1999)

Induction of 3 β -hydroxysteroiddehydrogenase/isomerase type 1 expression by interleukin-4 in human normal prostate epithelial cells, immortalized keratinocytes, colon, and cervix cancer cell lines.

Endocrinology 140 : 4573-84

GRAHAM, A., BROWN, L., HEDGE, P.J., GAMMACK, A.J., MARKHAM, A.F. (1991)

Structure of human aldose reductase gene.

J Biol Chem 266 : 6872-6877

GROSS, T.S., WILLIAMS, W.F. (1988a)

In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition.

J Reprod Fertil 83 : 565-73

GROSS, T.S., WILLIAMS, W.F. (1988b)

Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by binucleate cell.

Biol Reprod 38 : 1027-1034

GROSS, T.S., WILLIAMS, W.F., RUSSEK-COHEN, E. (1991)

Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation.

Placenta 12 : 27-35

HANSEN, P.J.J. (1995)

Interactions between the immune system and the ruminant conceptus.

J Reprod Fertil Suppl 49 : 69-82

HARADA, N., YOSHIMURA, N., HONDA, S. (2003)

Unique regulation of expression of human aromatase in the placenta.

J Steroid Biochem Mol Biol 86 : 327-334

HINSHELWOOD, M.M., CORBIN, C.J., TSANG, P.C., SIMPSON, E.R. (1993)

Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450.

Endocrinology 133 : 1971-1977

HINSHELWOOD, M.M., LIU, Z., CONLEY, A., SIMPSON, E.R. (1995)

Demonstration of tissue-specific promoters in nonprimate species that express aromatase P450 in placenta.

Biol Reprod 53 : 1151-1159

HOFFMAN, H.L., WOODING, P.B.F. (1993)

Giant and binucleate trophoblast cells of mammals.

J Exp Zool 266 : 559-577

HOFFMANN, B. (1977)

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind.

Entwicklung von Messverfahren und physiologischen Daten. Fortschritte der Veterinärmedizin 26

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

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, 509-546

HOFFMANN, B., FALTER, K., VIELEMEIER, A., FAILING, K., SCHULER, G. (2001)

Investigations on the activity of bovine placental oestrogen sulfotransferase and -sulfatase from midgestation to parturition.

Exp Clin Endocrinol Diabetes 109 : 294-301

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

HOFFMANN, B., SCHULER, G. (2002)

The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation.

Domest Anim Endocrinol 23 : 309-320

HOFFMANN, B., WAGNER, W.C., GIMÉNEZ, T. (1976)

Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term.

Biol Reprod 15 : 126-133

HOFFMANN, B., WAGNER, W.C., HIXON, J.E., BAHR, J. (1979)

Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow.

Anim Reprod Sci 3 : 253-266

HOFFMANN, B., WAGNER, W.C., RATTENBERGER, E., SCHMIDT, J. (1977)

Endocrine relations during late gestation and parturition in the cow.

Ciba Foundations Symposium 47

The Fetus and Birth 107-125

HRADECKY, P., MOSSMAN, H.W., STOTT, G.G. (1988)

Comparative development of ruminant placentomes.

Theriogenology 29 : 715-729

HUANG, H.J., MURAKAMI, T., YAMABE, T. (1991)

Cellular localization of aromatase in human endometrium.

Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 43 : 1484-1488

HUANG, Y., HU, M., HSU, N., WANG, C.L., HUNG, B. (2001)

Action of hormone responsive sequence in 2.3 kb promoter of CYP11A1.

Mol Cell Endocrinol 75 : 205-210

KARLSON, P., DOENECKE, D., KOOLMAN, J. (1994)

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Wissenschaftler.

14., neubearbeitete Auflage, Falttafel mit allen wichtigen Stoffwechselwegen

Georg Thieme Verlag, Stuttgart . New York

KHANNA, M., QIN, K.N., KLISAK, I., BELKIN, S., SPARKES, R.S., CHENG, K.C. (1995b)

Localisation of multiple human dihydrodiol dehydrogenase (DDH1 and DDH2) and chlordecone reductase (CHDR) genes in chromosome 10 by the polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridisation.

Genomics 25 : 588-590

KHANNA, M., QIN, K.N., WANG, R.W., CHENG, K.C. (1995a)

Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase.

J Biol Chem 270 : 20162-20168

KING, J.G., ATKINSON, A.B., ROBERTSON, A.H. (1979)

Development of the bovine placentome during the second month of gestation.

J Reprod Fertil 55 : 173-180

KING, J.G., ATKINSON, A.B., ROBERTSON, A.H. (1980)

Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation.

J Reprod Fertil 59 : 95-100

KLAUKE, M., HOFFMANN, B. (1992)

Progesterone and estrogen receptors in the myometrium of the cow during the estrus cycle and pregnancy and of the sheep at the time of parturition.

Anim Reprod Sci 29 : 195-203

KLISCH, K., HECHT, W., PFARRER, C., SCHULER, G., HOFFMANN, B., LEISER, R. (1999b)

DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells.

Placenta 20 : 451-458

KLISCH, K., PFARRER, C., SCHULER, G., HOFFMANN, B., LEISER, R. (1999a)

Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells.

Anat Embryol 200 : 229-237

KNICKERBOCKER, J.J., THATCHER, W.W., BAZER, F.W., DROST, M., BARRON, D.H., FINCHER, K.B., ROBERTS, R.M (1986)

Proteins secreted by day-16 to –18 bovine conceptus extend corpus luteum function in cows.

J Reprod Fertil 77 : 381-391

LAVEN, R.A., PETERS, R.A. (2001)

Gross morphometry of the bovine placentome during gestation.

Reprod in Domest Anim 36 : 289-296

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 102 : 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 : 76-78

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

LIEBERMAN, S.; LIN, Y.Y. (2001)

Reflection on sterol sidechain cleavage process catalysed by cytochrome P450_{sc}.

J Steroid Biochem Mol Biol 78 : 1-14

LINN, H.K., PENNING, T.M. (1995)

Cloning, sequencing and functional analysis of the 5'-flanking region of the rat 3 β -hydroxysteroid / dihydrodiol dehydrogenase gene.

Cancer Res 55 : 4105-4113

LOU, H., HAMMOND, L.; SHARMA, V., SPARKES, R.S., LUSIS, A.J., STOLZ, A. (1994)

Genomic organisation and chromosomal localisation of noval human hepatic dihydrodiol dehydrogenase with high affinity bile acid binding.

J Biol Chem 269 : 8416-8422

MATAMOROS, A., CAAMANO, L., LAMB, S.V., REIMERS, T.J. (1994)

Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro.

Biol Reprod 51 : 486-492

MEINHARDT, U., MULLIS, P.E. (2002)

The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact.

Hormon Res 57 : 145-152

MELLON, S.H., COMPAGNONE, N.A., ZHANG, P. (1998)

Orphan receptors, protooncogenes and other nuclear factors regulate P450c17 gene transcription.

Endocr Res 24 : 503-13

MILLER, L.W. (2002)

Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA.

Mol Cell Endocrinol 198 : 7-14

MILLER, W.L., AUCHUS, R.J. (2000)

Role of cytochrome b5 in the 17,20-lyase activity of P450c17.

J Clin Endocrinol Metab 85 : 1346

MOORE, D.C.C., MILLER, L.W. (1991)

The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis.

J Steroid Biochem Mol Biol 40 : 517-525

MOSSMAN, H.W. (1987)

Vertebrate fetal membranes

Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey

**NELSON, D.R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J.J., FEYEREISEN, R.,
WAXMAN, D.J., WATERMAN, M.R., GOTOH, O., COON, M.J., ESTABROOK, R.W.,
GUNSALUS, I.C., NEBERT, D.W. (1996)**

P450 Superfamily: Update on new sequence, gene mapping accession numbers and nomenclature.

Pharmacogenetics 6 : 1-42

PASHEN, R.L., ALLEN, W.R. (1979)

The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare.

J Reprod Fertil 27 : 499-509

PENNING, T.M. (1997)

Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases.

Endocr Rev 18 : 281-305

PEPE, G.J., ALBRECHT, E.D. (1995)

Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy.

Endocr Rev 6 : 608-48

PETERSON, J.K., MORAN, F., CONLEY, A.J., BIRD, I.M. (2001)

Zonal expression of endothelial nitric oxide synthase in sheep and rhesus adrenal cortex.

Endocrinology 142 : 5351-63

**PILON, N., DANEAU, I., BRISSON, C., EITHER J.F., LUSSIER, G.J.,
SILVERSIDES W.D. (1997)**

Porcine and bovine steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression during gestation.
Endocrinology 138 : 1085-1091

RICHTER, J., GÖTZE, R. (1960)

Tiergeburtshilfe, Alterbestimmung 82-83
Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg

RÜSSE, I., GRUNERT, E. (1993)

Die wachsende Frucht: Alterbestimmung, in: Grunert, E.; Arbeiter, K. (Hrsg.)
Richter, J., Götz, R. Tiergeburtshilfe, Paul Parey, Berlin 52-55

**SADOVSKY, Y., CRAWFORD, P.A., WOODSON, K.G., POLISH, J.A., CLEMENTS, M.,
TOURTELLOTT, L.M., SIMBURGER, K., MILBRANDT, J. (1995)**

Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor -1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids.

Proc Natl Acad Sci U S A. 92 : 10939-10943

SCHNORR, B., KRESSIN, M. (2001)

Embryologie der Haustiere.
Stuttgart

SCHOON, H-A. (1989)

Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität
Vet. med. Habil. – Schrift TIHO, Hannover

SCHULER, G. (2000)

Plazentare Steroide beim Rind. Biosynthese und Beziehungen zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome.

Habilitationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität 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 Diabetes 102 : 169-174

SCHULER, G., TEICHMAN, U., TAUBERT, A., FAILING, K., HOFFMANN, B. (2004)

Estrogen receptor β (ER- β) is expressed differently from ER α in bovine placentomes.

Exp Clin Endocrinol Diabetes, im Druck

SCHULER, G., WIRTH, C., KLISCH, K., PFARRER, C., LEISER, R., HOFFMANN, B. (1999)

Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition.

Biol Reprod 61 : 797-801

SCHULER, G., WIRTH, C., TEICHMANN, U., FAILING, K., LEISER, R., THOLE, H., HOFFMANN B. (2002)

Occurrence of estrogen receptor α in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition.

Biol Reprod 66 : 976-982

SCHULSTER, D., BUSTEIN, S., COOKE, B.A. (1976)

Molecular endocrinology of the steroid hormones.

Wiley & Sons, London

SHIMOZAWA, O., SAKAGUCHI, M., OGAWA, H., HARADA, N., MIRAHA, K., OMURA, T. (1993)

Core glycosylation of cytochrome P-450 (arom). Evidence for localisation of N-terminus of microsomal cytochrome P-450 in the lumen.

J Biol Chem 268 : 21399-21402

SIMPSON, E.R. (2000)

Role of aromatase in sex steroid action.

J Mol Endocrinol 25 : 149-156

SIMPSON, E.R., DAVIS, S.R. (2001)

Aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis-some new perspectives

Endocrinology 142 : 4589-4594

SIMPSON, E.R., MAHENDROO, M.S., MEANS, G.D. (1994)

Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen synthesis.

Endocr Rev 15 : 342-355

SIMPSON, E.R., MAHENDROO, M.S., MEANS, G.D., KILGORE, M.W., CORBIN, C.J., MENDELSON, C.R. (1993)

Tissue specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression.

J Steroid Biochem Mol Biol 44 : 321-330

SMITH, V.G., EDGERTON, L.A., HAFS, H.D., CONVEY, E.M. (1973)

Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy parturition and early lactation.

J Anim Sci 36 : 391-396

STOCCO, D.M. (2000)

The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future.

J Endocrinol 164 : 247-253

STRAHL, H. (1912)

Zur Kenntnis der Wiederkäuerplazentome.

Anat Anz 40 : 257-264

THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., GROSS, T.S., HELMER, S.D., PLANTE, C., BAZER, F.W. (1989)

Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1.

J Reprod Fertil Suppl 37 : 91-99

THOMPSON, JR. E.A., SIITERI, P.K. (1974)

The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization.

J Biol Chem 249 : 5373-5378

TSENG, L. (1984)

Estrogen synthesis in human endometrial glands and stromal cells.

J Steroid Biochem 20 : 877-881

TSENG, L., MAZELLA, J., MANN, W.J., CHUMAS, J. (1982)

Estrogen synthesis in normal and malignant human endometrium.

J Clin Endocrinol Metab 55 : 1029-1031

TSUMAGARI, S., KAMATA, J., TAKAGI, K., TANEMURA, K., YOSAI, A., TAKEISHI, M. (1993)

Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition.

J Reprod Fertil 98 : 631-636

TSUMAGARI, S., KAMATA, J., TAKAGI, K., TANEMURA, K., YOSAI, A., TAKEISHI, M. (1994)

3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition.

J Reprod Fertil 102 : 35-39

TUCKEY, C.R., HEADLAM, J.M. (2002)

Placental cytochrome P450scc (CYP11A1): comparison of catalytic properties between conditions of limiting and saturating adrenodoxin reductase.

J Steroid Biochem Mol Biol 81 : 153-158

TURNER, K.J., MACPHERSON, S., MILLAR, M.R., MCNEILLY, A.S., WILLIAMS, K., CRANFIELD, M., GROOME, N.P., SHARPE, R.M., FRASER, H.M., SAUNDERS, P.T. (2002)

Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase.

J Endocrinol 172 : 21-30

WANGO, E.O., WOODING, F.B.P., HEAP, R.B. (1990)

The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study.

J Anat 171 : 241-257

WATHES, D.C., WOODING, F.B.P. (1980)

An electron microscopic study of implantation in the cow.

Am J Anat 159 : 285-306

WEEMS, Y.S., BRIDGES, P.J., LEAMASTER, B.R., SASSER, R.G., CHING, L., WEEMS, C.W. (2001)

Effect of the aromatase inhibitor CGS-16949A on pregnancy and secretion of progesterone, estradiol-17 β , prostaglandins E and F_{2 α} (PGE; PGE_{2 α}) and pregnancy specific protein B (PSPB) in 90-day ovariectomized pregnant ewes.

Prostaglandins Other Lipid Mediat 66 : 77-88

**WHITTLE, W.L., PATEL, F.A., ALFAIDY, N., HOLLOWAY, A.C., FRASER, M.,
GYOMOREY, S., LYE, S.J., GIBB, W., CHALLIS, J.R. (2001)**

Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production.

Biol Reprod 64 : 1019-1032

WILLIAMS, W.F., MARGOLIS, M.J., MANSPEAKER, J., DOUGLASS, L.W., DAVIDSON, J.P. (1987)

Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention.

Theriogenology 28 : 213-223

WIMSATT, W.A. (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

WOOD, C.E. (1999)

Control of parturition in ruminants.

J Reprod Fertil 54 : 115-126

WOODING, F.B. (1992)

Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusion and hormone production.

Placenta 13 : 101-113

WOODING, F.B., FLINT, A.P., HEAP, R.B., MORGAN, G., BUTTLE, H.L., YOUNG, I.R. (1986)

Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats.

J Reprod Fertil 76 : 499-512

WOODING, F.B., HOBBS, T., MORGAN, G., HEAP, R.B., FLINT, A.P. (1993)

Cellular dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study.

J Reprod Fertil 98 : 275-283

WOODING, F.B.P. (1984)

Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep.

Am J Anat 170 : 233-250

WOODING, F.B.P., BECKERS, J.F. (1987)

Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen.

Cell Tissue Res 247 : 667-673

WOODING, F.B.P., WATHES, D.C. (1980)

Binucleate cell migration in the bovine placentome.

J Reprod Fert 59 : 425-430

ZHAO, H.F., SIMARD, J., LABRIE, C., BRETON, N., RHEAUME, E., LUU-THE, V., LABRIE, F. (1989)

Molecular cloning, cDNA structure and predicted amino acid sequence of bovine 3 β -hydroxy-5-ene steroiddehydrogenase/ Δ -5 and Δ -4 isomerase.

FEBS Lett 259 : 153-157

Abb :	Abbildung
ACTH :	Adrenocorticotropes Hormon
Aqua dest :	aqua destillata
AP :	Alkalische Phosphatase
APS :	Ammoniumpersulfat
BCIT:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate, Toluidine Salz
Bp :	Basenpaare
BSA :	Bovines Serum Albumin
cAMP :	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA:	Komplementäre DNA
CHAPS:	3- [(3-Cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]–1 Propansulfonat
COX-II:	Cyclooxygenase II
CYP11A1 :	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
DAB :	Diaminobenzidin
dATP :	2'- Deoxyadenosine 5'- Triphosphate
dCTP :	2'- Deoxycytidine 5'- Triphosphate
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
Dig :	Digoxigenin
dGTP :	2'- Deoxyguanosine 5'- Triphosphate
DNA :	Deoxyribonucleinsäure
dTTP :	2'- Deoxythymidine 5'- Triphosphate
EDTA :	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
et al. :	et alii (und andere)
for:	forward
h. :	hour (Stunde)
HPA:	Hypothalamus- Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
ICC :	Immunocytochemistry
IFNτ :	Interferon Tau
IgG :	Immunglobulin G
Kap. :	Kapital
kDa :	Kilodalton

LH :	Luteinisierendes Hormon
M :	molar, Molarität
mA:	Milliampere
ml:	milliliter
µm:	mikrometer
mRNA:	“messenger” Ribonukleinsäure
NADPH ⁺	Nicotinamid Adenine Dinucleotid Phosphat
NBT :	Natriumchlorid-Tris Puffer
Ng :	nanogram
NTB:	4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid
OR :	Oxidoreduktase
PAGE :	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P450 _{scc} :	P450 Side Chain Cleavage Enzyme
P450 _{c17} :	17α-Hydroxylase-C17,20-lyase
P450 _{arom} :	Aromatase
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PBST-Puffer :	PBS-Tween-Puffer
PFA :	Paraformaldehyd
PGE ₂ :	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α} :	Prostaglandin F _{2α}
PMSF:	Phenylmethanesulfonyl fluoride
Rev :	reverse
RNA :	Ribonucleic Acid
RT-PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
s.:	siehe
s.o.:	siehe oben
SCAD :	short-chain alcohol dehydrogenases
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SF-1:	Steroidogenic factor 1
SSC:	Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer; standard saline citrate
StAR :	Steroide Acute Regulatory Protein
TBE:	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer

TEMED :	N,N,N',N'–Tetramethylethylenamin
TGC :	Trophoblast Giant Cell (Trophoblastriesenzellen)
TNMT :	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton
TRIS :	Tris hydroxymethyl aminomethan
TZ :	Tertiärzotten
UTC:	Uninuclear Trophoblast Cell
V. :	Volt
z.B :	zum Beispiel
z.T. :	zum Teil

Danksagung

- Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann möchte ich mich vielmals bedanken für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit sowie für seine Diskussionsbereitschaft.
- Herrn H.DoZ. Dr. Gerhard Schuler danke ich sehr herzlich für die mir gewährte Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.
- Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser für seine ständige Gesprächsbereitschaft bei Abklärung morphologischer Fragestellungen.
- Bei Herrn Prof. Dr. E. Petzinger und Herrn Prof. Dr. R. Bauerfeind möchte ich mich für die freundliche Betreuung im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ vielmals bedanken. Mein Dank gilt auch allen Stipendiaten des Graduiertenkollegs für ihre hilfreiche Zusammenarbeit und für das freundliche Arbeitsklima.
- Allen Mitarbeitern der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.
- Ganz besonders herzlich danken möchte ich Frau I. Hoffmann für ihr Verständnis und ihr unermüdliches Korrekturlesen während der Anfertigung dieser Arbeit.
- Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung während meines Studiums.
- Diese Arbeit wurde durch Mittel der (DFG) Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-461-6



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 6 1 0