

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Molekularbiologie

Blastozysten-regulierte Genexpression im rezeptiven Endometrium der Ratte während  
der Implantation des Embryos

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Stefanie Hardt  
aus Duisburg  
2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting  
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. R. Grümmer  
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. S. Kasimir-Bauer

Tag der mündlichen Prüfung: 06. September 2010

**Teile der Arbeit wurden vorab auf wissenschaftlichen Tagungen zur Diskussion gestellt:**

Hardt, S., Klein-Hitpaß, L., Winterhager, E., Grümmer, R. (2006): Blastocyst-mediated induction of early response genes in the receptive endometrium. 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 27.09. bis 29.09.2006.

Grümmer, R., Hardt, S., Klein-Hitpaß, L., Winterhager, E. (2007): Blastocyst-mediated induction of early response genes in the receptive endometrium. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 4(1), 41.

Hardt, S., Barzik, S., Klein-Hitpaß, L., Winterhager, E., Grümmer, R. (2007): Blastocyst-mediated gene regulation in the receptive endometrium. 4th International Conference on the Female Reproductive Tract, Frauenchiemsee, 08.06. bis 11.06.2007.

Winterhager, E., Grümmer, R., Hardt, S. (2007): Blastocyst-mediated gene regulation in the receptive endometrium. *Biol Reprod* 77 (meeting abstracts), 190

Grümmer, R., Hardt, S., Barzik, S., Klein-Hitpass, L., Winterhager, E. (2007): Blastocyst-mediated gene regulation in the receptive endometrium. 2nd International Summit on Reproductive Medicine, p 101.

Hardt, S., Klein-Hitpaß, L., Winterhager, E., Grümmer, R. (2009): Blastocyst-mediated regulation of early response genes in the receptive endometrium. 5th International Conference on the Female Reproductive Tract, Frauenchiemsee, 15.05. bis 18.05.2009.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Die Implantation des Embryos . . . . .	6
1.2	Der molekulare feto-maternale Dialog . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1	Tierversuche . . . . .	12
3.1.1	Verwendete Tierspezies und Tierhaltung . . . . .	12
3.1.2	Einseitige Tubenligatur und Entnahme des Endometriums . . . . .	12
3.1.3	Delayed Implantation . . . . .	12
3.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	13
3.2.1	RNA-Isolierung . . . . .	13
3.2.2	Reverse Transkription (RT) . . . . .	13
3.2.3	Semiquantitative RT-PCR (Polymerasekettenreaktion) . . . . .	13
3.2.4	Quantitative Real-Time PCR . . . . .	15
3.3	Statistik . . . . .	16
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>18</b>
4.1	Genexpression im Endometrium der Ratte . . . . .	18
4.1.1	Auswahl der untersuchten Gene und Nachweis der endometrialen Genexpression . . . . .	18
4.1.2	Quantitative Validierung der Blastozysten-induzierten Genexpression im Endometrium an 4 dpc . . . . .	19
4.1.3	Untersuchung der Blastozysten-induzierten Genexpression im Endometrium bei verzögerter Implantation . . . . .	19
4.1.4	Zeitlicher Verlauf der Blastozysten-regulierten Genexpression während der Periimplantationsphase . . . . .	21
4.2	Genexpression in humanem Endometrium . . . . .	26
4.2.1	Nachweis der Genexpression im humanen Endometrium . . . . .	26
4.2.2	Genexpression in Abhängigkeit vom Zyklusstadium . . . . .	26
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>29</b>
5.1	Blastozysten-induzierte Genexpression im Endometrium der Ratte . . . . .	29
5.2	Die Genexpression im zyklischen humanen Endometrium . . . . .	36
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>41</b>

*Inhaltsverzeichnis*

<b>Literatur</b>	<b>42</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>50</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Implantation des Embryos

Die erfolgreiche Implantation des Embryos ist einer der kritischsten Vorgänge während der frühen Schwangerschaft. Hierbei spielen die Wechselwirkungen zwischen dem frühen Embryo, der Blastozyste, und der Uterusschleimhaut eine essentielle Rolle. Fehler in dem feto-maternalen Dialog können Mitursache sein für das Scheitern der Einnistung. Man weiß aus den Erfolgsstatistiken bei in-vitro Fertilisation (IVF), dass die Zahl der befruchteten Eizellen (95,6%) und der Embryotransfers (96,6%) relativ hoch ist, während es jedoch zu einem dramatischen Einbruch bei den Schwangerschaftsraten kommt. Nur bei 28,87% der Embryotransfers kann eine klinische Schwangerschaft und somit eine erfolgreiche Implantation diagnostiziert werden (Deutsches IVF-Register, D.I.R.-Jahrbuch 2007). Mögliche Ursachen für eine erfolglose Implantation beschrieben Margalioth et al. (2006) in einer verminderten endometrialen Rezeptivität (anatomische Veränderungen, immunologische Faktoren, Störungen der Adhäsionsmoleküle), einer fehlerhaften embryonalen Entwicklung (genetische Fehler, suboptimale Kulturbedingungen bei IVF) oder multifaktoriellen Effektoren (Endometriose, Hydrosalpings, suboptimale ovarielle Stimulation). Man geht davon aus, dass auch bei natürlicher Befruchtung von fertilen Frauen die Implantationsrate ähnlich niedrig ist wie bei der IVF und dass 20% der Spontanaborte vor dem klinischen Nachweis der Schwangerschaft und somit während der Periimplantationsphase erfolgen (Wilcox et al., 1988). Die molekularen Vorgänge während dieses Zeitraumes, dem hoch komplexen Vorgang der Implantation, sind bis heute noch wenig entschlüsselt. Die Abfolge der einzelnen Phasen der Implantation des Embryos ist jedoch weitestgehend bekannt.

Nach der Befruchtung wandert die sich teilende Zygote durch den Eileiter in Richtung Gebärmutter, erreicht im Blastozystenstadium das Cavum uteri und nimmt nun direkten Kontakt zum Endometrium auf. Der nun folgende kontinuierliche Vorgang der Implantation kann in drei Phasen aufgeteilt werden (Abbildung 1). Er beginnt mit der Apposition, d.h. der Positionierung des bis dahin frei flotierenden Embryos im Uterus. Kurz darauf adhäriert die Blastozyste und es erfolgt der erste Kontakt des Embryos mit dem Uterusepithel. Erst dann beginnt die Invasion, bei der die Trophoblastzellen das luminale Uterusepithel penetrieren und in das darunterliegende endometriale Stroma invadieren, um Anschluss an das mütterliche Gefäßsystem zu gewinnen (Enders und Schlafke, 1967).

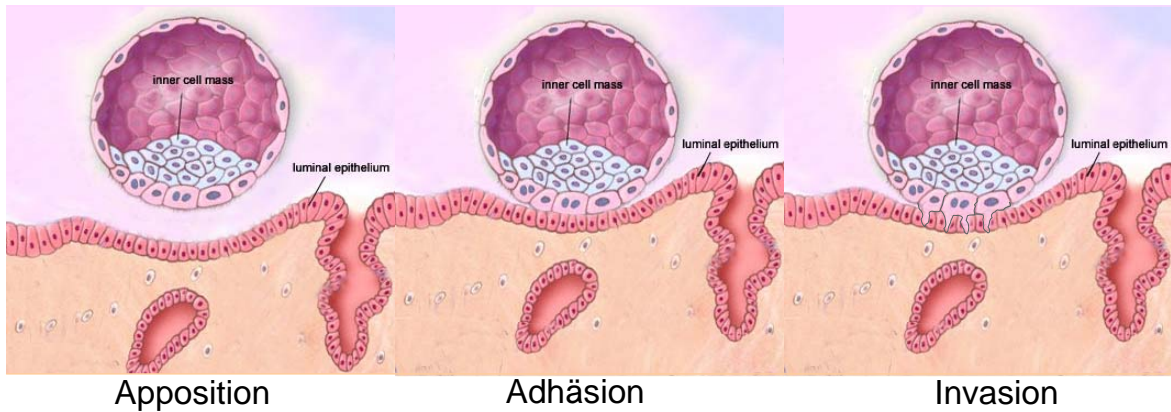


Abbildung 1: **Phasen der Implantation.** In der Apposition positioniert sich die Blastozyste vor dem Uterusepithel. Während der Adhäsion erfolgt die Fixierung der Blastozyste an das Epithel und während der Invasion penetriert der Trophoblast das luminale Uterusepithel. (Bild zur Verfügung gestellt von R. Grümmer)

Diese ersten Schritte des Implantationsvorgangs sind nur während eines kurzen Zeitraumes möglich, in dem die befruchtete Eizelle das Blastozystenstadium erreicht hat und das Endometrium durch den Einfluss der ovariellen Steroidhormone Östrogen und Progesteron zur sogenannten rezeptiven Phase transformiert wurde (Psychoyos, 1973). Nur durch diese Transformation wird das Endometrium befähigt, auf Signale der Blastozyste zu reagieren und eine Implantation zuzulassen. Nachfolgend wird das Genexpressionsmuster des Endometriums durch die Präsenz der Blastozyste modifiziert und reguliert. Eine fehlerhafte Synchronisation zwischen Blastozyste und Endometrium kann die Implantation und damit die Etablierung der Schwangerschaft beeinträchtigen. Ein genaueres Verständnis der molekularen Interaktionen bei der Implantation könnte sowohl für die Behandlung von unerfülltem Kinderwunsch als auch für die Entwicklung neuartiger Kontrazeptiva neue Wege aufzeigen.

## 1.2 Der molekulare feto-maternale Dialog

Während der Implantation steuern sowohl die ovariellen Steroidhormone als auch Signale der Blastozyste die Umwandlung des Endometriums zur rezeptiven Phase. Im menschlichen Endometrium konnten in den letzten Jahren molekulare Veränderungen während des Hormonzyklus vor allem durch Genchip-Analysen aufgezeigt werden (Carson et al. 2002, Kao et al. 2002, Borthwick et al. 2003, Riesewijk et al. 2003, Mirkin et al. 2005). Die Möglichkeit, die durch die Blastozyste selbst gesteuerten endometrialen Veränderungen beim Menschen zu untersuchen, ist jedoch aus ethischen Gründen limitiert. Daher sind Untersuchungen zur Interaktion zwischen Embryo und dem Endometrium bisher in Tiermodellen durchgeführt worden. Der feto-maternale Dialog in der frühen Periimplantationsphase wurde vor allem an Nagern untersucht.

Bei Maus und Ratte erreichen die Blastozysten an Tag 3,5 (Maus) bzw. Tag 4 (Rat-

## 1 Einleitung

te) nach der Befruchtung (dpc = days post coitum, Spermiennachweis = 0 dpc) das Uteruslumen. Die Implantation erfolgt dann ab Tag 4,5 bzw. 5 pc auf der antimesometrialen Seite des Uterus, indem sich durch eine Invagination des uterinen Epithels eine Implantationskammer bildet (Psychoyos, 1973). Durch die Implantation des Embryos kommt es dann zur Dezidualisierung des umgebenden Stromas. Lange Zeit galt eine Erhöhung der uterinen Gefäßpermeabilität (dargestellt durch i.v. Infektion von blauem Farbstoff = blue reaction) an Tag 5 pc im Bereich der Blastozyste als die erste erkennbare Antwort des rezeptiven Endometriums der Ratte auf diesen dezidogenen Stimulus (Psychoyos, 1973). Später konnte man jedoch noch frühere Veränderungen im Endometrium nachweisen. Dabei wirken sowohl die Steroidhormone als auch Signale der Blastozyste auf das Endometrium und führen zu spezifischen molekularen Veränderungen im Endometrium. Die meisten bisher bekannten molekularen Regulationen wurden für die Dezidualisierungsreaktion beschrieben, von denen einige in Abbildung 2 zusammengefasst sind. So führen bei der Ratte bereits vor der blue reaction von Cox2 gebildete Prostaglandine über die Prostaglandin-Rezeptoren zu der erhöhten Gefäßpermeabilität und später zur Dezidualisierung (Kennedy und Zamecnick, 1978, Kennedy et al., 2007). Cox2 ist dabei bereits ab Tag 3 und insbesondere an Tag 4,5 pc im subluminalen Stroma der Implantationskammer exprimiert (Cong et al., 2006). Als weiterer molekularer Marker kommt es bei der Ratte mit Beginn der Dezidualisierung zu einer verstärkten Expression von Connexin 43 (Cx43) und einer Induktion von Connexin26 (Cx26) in den Deziduazellen (Winterhager et al., 1993). Außerdem beschrieben Xiao et al. (2006) Stanniocalcin (STC) 1 und 2 als Dezidualisierungsmarker. Sie zeigten eine Hochregulation von STC-1 und STC-2 in den Deziduazellen des Rattenuterus ab Tag 5 pc, während beide Gene bei Pseudogravidität und verzögerter Implantation (delayed implantation) im nicht-dezidualisierten Endometrium kaum exprimiert werden. Gleiches konnten Zhang et al. (2008) für Dickkopf2 (Dkk2) zeigen, welches ebenfalls ab Tag 5 pc in den Deziduazellen exprimiert wird. Neuere Untersuchungen von Tsai et al. (2008) beschrieben eine essentielle Rolle von Hupr (hepatoma up-regulated protein) für die Dezidualisierung. Während sich bei Wildtyp-Mäusen eine Induktion von Hupr an Tag 4,5 und 5,5 pc und eine anschließende Stromaproliferation zeigte, sind Hupr-knock-out-Mäuse infertil bedingt durch eine defekte Stromaproliferation und somit fehlende Dezidualisierung.

Der erste Interaktionspartner der Blastozyste bei der Implantation ist jedoch das luminale Epithel des Endometriums, das somit einen sogenannten „gate keeper“ für die erfolgreiche Implantationsreaktion darstellt. Daher ist es von großem Interesse, die ganz frühen molekularen Veränderungen zu verstehen, die durch die Blastozyste im rezeptiven Endometrium ausgelöst werden. Bei der Maus hat man inzwischen solch frühe epitheliale an der Implantation beteiligte Moleküle identifizieren können (Abbildung 2, Paria et al., 2002). Das et al. (1994) konnten schon vor der Adhäsion der

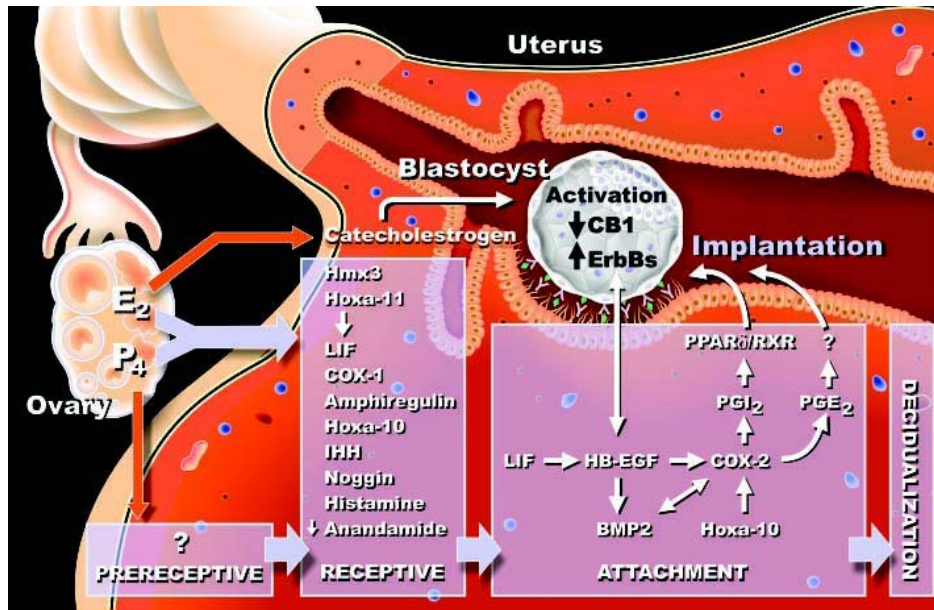


Abbildung 2: Schematische Darstellung von an der Implantation der Maus beteiligten Signalkaskaden. Die Steroidhormone transformieren das Endometrium in die sogenannte rezeptive Phase durch Regulation verschiedener uteriner Faktoren. Zusätzlich sendet das Endometrium Signale zur Blastozyste und umgekehrt um die Implantation zu ermöglichen. (aus Paria et al., 2002)

Blastozyste molekulare Veränderungen im luminalen Epithel der Maus spezifisch im Bereich der Blastozyste feststellen. Dabei konnte HB-EGF (Heparin-binding EGF-like Growth Factor) bereits an Tag 4,5 pc im Bereich der Adhäsion der Blastozysten, nicht jedoch zwischen den Implantationskammern nachgewiesen werden. Es wird diskutiert, dass bei der Maus die hormonelle Induktion von LIF (Leukemia Inhibitory Factor) während der rezeptiven Phase eine entscheidende Rolle in der Vorbereitung des Uterus spielt (Stewart et al., 1992) und die Expression von HB-EGF im luminalen Epithel erst ermöglicht (Paria et al., 2000). Die endometriale Expression von HB-EGF könnte dann im Gegenzug über den EGF-Rezeptor der Blastozyste deren Reifung fördern (Das et al., 1994). Eine ähnliche Induktion beschrieben White et al. (2006) für Spp1 (Osteopontin). Spp1 wird spezifisch an Tag 4,5 und 5 der Schwangerschaft im luminalen endometrialen Epithel von Mäusen exprimiert. Es wird vermutet, dass Osteopontin über seinen Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Ross et al. 1993), der gleichzeitig im rezeptiven Endometrium exprimiert wird (Apparao et al. 2001), die Adhäsion der Blastozyste an das endometriale Epithel begünstigt.

Ein weiteres Molekül, das bei der Implantation durch die Blastozyste im luminalen Uterusepithel bei Mäusen und Ratten spezifisch induziert wird, ist das Gap Junction Protein Cx26. Grümmer et al. (1994) konnten zeigen, dass die Expression von Cx26 während der Progesteron-dominierten rezeptiven Phase im Endometrium supprimiert wird, dann aber zum Zeitpunkt der Implantation lokal im Uterusepithel der Implantati-

## 1 Einleitung

onskammer bereits vor Beginn der Trophoblastinvasion durch die Blastozyste induziert wird. Die Signale, die zu dieser präzise regulierten Induktion führen, sind jedoch noch nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun die frühen Signalkaskaden, die durch die Blastozyste im Epithel des rezeptiven Endometriums induziert werden, näher analysiert und aufgeschlüsselt werden. Hierzu wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe Gene-Array-Analysen durchgeführt, in denen die Genexpression im Endometrium der Ratte an Tag 4 pc, d.h. zum Zeitpunkt an dem die Blastozyste das Uteruslumen erreicht, aber die Invasion des Trophoblast noch nicht begonnen hat, bei Blastozystenkontakt und ohne Blastozystenkontakt verglichen wurde. Durch die Gene-Array-Analysen konnten so eine Reihe von Genen identifiziert werden, die nur in der Anwesenheit von Blastozysten im rezeptiven Endometrium hochreguliert wurden. In der vorliegenden Arbeit werden nun die Gene, die sich in den vorangegangenen Arrayanalysen als signifikant reguliert gezeigt hatten, mittels quantitative Real-Time PCR validiert und der zeitliche Expressionsverlauf während der ersten Phase der Implantation von Tag 3 bis Tag 6 pc dargestellt. Darüber hinaus wird analysiert, inwieweit diese bei der Implantation der Ratte signifikant regulierten Gene auch im humanen Endometrium im Verlauf des Zyklus exprimiert werden und so auch bei der Implantation beim Menschen eine Rolle spielen könnten.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Gene analysiert werden, die durch die Blastozyste im rezeptiven Endometrium noch vor der Trophoblastinvasion spezifisch induziert werden. Dazu wird die Genexpression im Endometrium von schwangeren, einseitig tubenligierten Ratten untersucht. Dies ermöglicht den Vergleich von Endometrien mit Blastozystenkontakt (nicht-ligiertes Uterushorn) versus Endometrien ohne Blastozystenkontakt (ligiertes Uterushorn) unter identischen hormonellen Bedingungen. Die Ergebnisse der vorangegangenen Gene Array-Analysen werden anhand von quantitativer Real-Time PCR an Tag 4 pc validiert und der Expressionsverlauf der untersuchten Gene von Tag 3 bis Tag 6 pc dargestellt. Zusätzlich soll die Genexpression dieser Gene bei verzögerter Implantation (delayed implantation), d.h. bei ruhenden, nicht implantierenden Blastozysten im Endometrium, untersucht und mit der bei normal implantierenden Blastozysten verglichen werden, um zwischen reiner Anwesenheit von Blastozysten und der aktiven Implantationsreaktion zu unterscheiden. Die identifizierten Gene werden anschließend auch im humanen Endometrium der Proliferations- und Sekretionsphase untersucht, um zu eruieren, ob diese auch bei der Embryoimplantation beim Menschen eine Rolle spielen könnten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tierversuche

#### 3.1.1 Verwendete Tierspezies und Tierhaltung

Für die Versuche wurden geschlechtsreife weibliche Sprague-Dawley Ratten aus der Zucht des zentralen Tierlaboratoriums der Universitätsklinik Essen (Leitung: PD Dr. Hilken) verwendet. Die Ratten wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen mit einer Raumtemperatur von  $22 \pm 1$  °C, einer Luftfeuchtigkeit von  $55\% \pm 10\%$  und regulierten Tag-/Nachtzyklen (je 12 Stunden) gehalten. Sie wurden mit Standard-Pellets gefüttert und erhielten Trinkwasser ad libitum. Die Tierversuche wurden mit behördlicher Erlaubnis durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung AZ 9.93-230-67/04, LANUV NRW).

#### 3.1.2 Einseitige Tubenligatur und Entnahme des Endometriums

Nachdem die Ratten mit Xylazin (Bayer, Leverkusen) / Ketamin (Essex Pharma, München) 100/20 mg/kg in 200 $\mu$ l NaCl-Lösung i.p. betäubt wurden, wurde durch einen median geführten dorsalen Hautschnitt und anschließendem lateral der Wirbelsäule geführten ca. 0,5cm langen Schnitt durch die dorsale Muskulatur die Peritonealhöhle geöffnet und die linke Tube freigelegt und durchtrennt. Der Hautschnitt wurde anschließend durch Klammern verschlossen. Frühestens 14 Tage nach diesem Eingriff wurden die tubenligierten Ratten über Nacht mit männlichen Ratten verpaart; der Tag des Spermiennachweises wurde als Tag 0 nach Befruchtung (0 days past coitum - 0 dpc) deklariert. Zur Entnahme der Uteri wurden jeweils 3 Tiere an Tag 3, 5 und 6 pc und 5 Tiere an Tag 4 pc mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Durch einen Bauchschnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet und das tubenligierte sowie das nicht ligierte Uterushorn entnommen. Durch Spülung der Uterushörner mit physiologischer Kochsalzlösung wurden an Tag 4 im nicht ligierten Horn die Blastozysten ausgespült und dadurch die Schwangerschaft bestätigt. Im ligierten Horn hingegen wurden keine Blastozysten gefunden. Die Uterushörner wurden auf einer Trockeneis-gekühlten Glasplatte längs eröffnet und das Endometrium vorsichtig mit einer sterilen Rasierklinge vom Myometrium getrennt. Das isolierte Endometrium wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### 3.1.3 Delayed Implantation

Um die Implantation der Embryonen zu verzögern, wurden nach einem Standardprotokoll (Cochrane und Meyer, 1957) tubenligierte Ratten nach Betäubung (siehe 3.1.2) an 2 dpc ovariectomiert und ab diesem Zeitpunkt mit 4 mg Progesteron (Sigma, Tauf-

kirchen) pro Tag und Ratte substituiert. Das Progesteron wurde in Benzylbenzoat aufgelöst und in 200 $\mu$ l Sesamöl subkutan appliziert. An 4 dpc wurde das Endometrium beider Uterushörner wie in 3.1.2 beschrieben isoliert und bei -80 °C gelagert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA des isolierten Endometriumgewebes wurde mit dem RNAeasy midi kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die RNA-Konzentration der Proben wurde in einer Quarzküvette über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des RNA/DNA Calculator Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Anschließend wurden 2 $\mu$ g RNA-Probe mit Aqua dest. auf ein Volumen von 17 $\mu$ l aufgefüllt, die übrige RNA wurde bei -80 °C zur Lagerung eingefroren.

### 3.2.2 Reverse Transkription (RT)

In der Reversen Transkription erfolgt die Herstellung von doppelsträngiger komplementärer DNA (cDNA) aus der in der Probe vorhandenen RNA mithilfe des Enzyms Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Invitrogen, Karlsruhe). Als Oligonukleotid wurde Oligo-dT16-Oligonukleotid (oligodT; MWG, Ebersberg) verwendet.

Um die Proben vollständig von DNA zu befreien, wurde vor der Reversen Transkription ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurden den 17 $\mu$ l RNA-Probe 1 $\mu$ l DNase I (1 U/ $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe) und 2 $\mu$ l 10xDNase-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) zugeetzt und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die DNase bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Danach wurden 15 $\mu$ l DEPC-Wasser, 10 $\mu$ l 5xFirst-Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe), 2,5 $\mu$ l dNTP-Mix (10mM, Fermentas, St. Leon-Rot), 1 $\mu$ l 0,1M DTT (Invitrogen, Karlsruhe), 1 $\mu$ l oligodT (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) und 0,5 $\mu$ l M MLV RT (200U/ $\mu$ l) zugegeben. Die Umschreibung in cDNA erfolgte für 1 Stunde bei 37°C in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Biometra, Göttingen). Anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 90°C inaktiviert und der RNA/DNA-Doppelstrang denaturiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Probe bei -20°C gelagert.

### 3.2.3 Semiquantitative RT-PCR (Polymerasekettenreaktion)

#### *Semiquantitative RT-PCR an Ratten-Endometrium*

Um die Funktionalität der Primer zu testen, zum Nachweis der Genexpression und zur Herstellung von Standardreihen für die Real-Time PCR wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. 4 $\mu$ l des RT-Ansatzes wurden mit je 25pmol für Ratten-DNA

### 3 Material und Methoden

genspezifischen Oligonukleotid-Primern (Tabelle 1), 1,5  $\mu$ l dNTPs (10mM, Fermentas, St. Leon-Rot), 5  $\mu$ l 10x Puffer (GeneCraft, Lüdinghausen) und 0,5  $\mu$ l BioTherm Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l, GeneCraft, Lüdinghausen) in wässriger Lösung in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Biometra, Göttingen) amplifiziert. Im ersten Schritt der PCR erfolgte die initiale Denaturierung der doppelsträngigen cDNA für 4 Minuten bei 94°C. Im zweiten Schritt der PCR erfolgte die Amplifikation der cDNA: für 15 Sekunden erfolgte bei 94°C die Denaturierung der DNA, für 60 Sekunden das Annealing bei 60°C und für 60 Sekunden die Elongation bei 72°C. Dieser zweite Schritt wurde jeweils 40 mal wiederholt. Anschließend erfolgte die finale Elongation für 10 Minuten bei 72°C. Nach der PCR wurde die Probe auf 8°C heruntergekühlt.

Um die Gen-Amplifikate nach der semiquantitativen RT-PCR nachzuweisen, wurde der komplette PCR-Ansatz mit 5  $\mu$ l 10xPCR-Probenpuffer (25 mM Tris/HCl (pH 7,0), 150 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 25% Glycerin) versetzt und mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid 1:20000 (Serva, Heidelberg) in das 2%ige Agarosegel (PeqLab, Erlangen) im UV-Licht sichtbar gemacht. Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer (890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA), zur Auswertung unter UV-Licht wurde ein Geldokumentationsgerät (Gel Imager, Intas, Göttingen) benutzt.

Um Standardreihen für die quantitative Real-Time PCR (3.2.4) herzustellen, wurden die spezifischen Banden für die jeweiligen Gene mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mithilfe des MiniElute Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Konzentration des Extrakts wurde UV-spektro-photometrisch bestimmt. Für die Standardreihen wurden aus den Extrakten Verdünnungen von 1pg/ $\mu$ l bis zu 0,1fg/ $\mu$ l in 1:10 Schritten hergestellt.

#### *Semiquantitative RT-PCR mit humanem Endometrium*

Zur Überprüfung, ob die durch die Blastozyste im Rattenendometrium regulierten Gene auch in humanem Endometrium exprimiert werden, wurden entsprechend wie in 3.2.3 beschrieben semiquantitative PCRs auch für humanes Endometrium aus der Proliferations- (Zyklustag 10 bis 13) und Sekretionsphase (Zyklustag 23 bis 30) des Menstruationszyklus, für humanes Lebergewebe und für humanes Östrogen-Rezeptor-positives Brustkrebsgewebe durchgeführt. Das humane Endometrium wurde von der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen bei benignen Indikationen gewonnen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Das Brustkrebsgewebe stammt ebenfalls aus der Universitätsfrauenklinik. Das humane Lebergewebe wurde von der Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums Essen nach einer diagnostischen Probenentnahme bei Lebertransplantation zur Verfügung gestellt. Die RNA wurde wie in 3.2.1 beschrieben gewonnen. Nach Umschreibung in cDNA in der Reversen Transkription (3.2.2) wurden auch hier 4  $\mu$ l des RT-Ansatzes mit für humane DNA genspezifischen Oligonukleotidpri-

mern (Tabelle 1) amplifiziert. Zusätzlich wurde bei den endometrialen Proben im selben PCR-Ansatz auch die  $\beta$ -Aktin-Expression als Kontrolle getestet. Dazu wurden zusätzlich je 2pmol actb\_2-Primer (siehe Tabelle 1) hinzugegeben. Die Gen-Amplifikate des PCR-Ansatzes wurden durch Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen und ausgewertet (3.2.3). Nach Ausschneiden der Banden wurden auch hier wie in 3.2.3 Standardreihen für die quantitative Real-Time PCR hergestellt.

#### 3.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Zum quantitativen Nachweis der Genexpression wurden Real-Time PCR-Versuche mit SybrGreen (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Weiterstadt) in 96-well Reaktionsplatten mit Abdeckfolie (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Optical Adhesive Covers; Applied Biosystems, Weiterstadt) mit dem Gerät ABI 7300 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der 7300 System Sequence Detection Software Version 1.3.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt). Jeweils 2 $\mu$ l der RT-Ansätze der jeweiligen Standardreihe (3.2.3) wurde mit allen zu untersuchenden endometrialen Proben auf einer Reaktionsplatte mit jeweils 3,75pmol der in der semiquantitativen PCR erprobten genspezifischen Oligonukleotidprimer (3.2.3; Tabelle 1) und 10 $\mu$ l des Power SYBR Green PCR Master Mix in einem Volumen von 20 $\mu$ l RT-PCR-Ansatz amplifiziert. Zur Quantifizierung der Genexpression wurde ein paralleler Ansatz mit dem house-keeping Gen  $\beta$ -Aktin durchgeführt.

Bei der PCR wurden die Proben zunächst für 2 Minuten auf 50°C erhitzt und die DNA-Polymerase dann für 10 Minuten bei 95°C aktiviert. Danach folgte die Gen-Amplifizierung in 40 Zyklen von jeweils 15 Sekunden DNA-Denaturierung bei 95°C und 30 Sekunden Inkubation bei 60°C. In jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurve ermittelt um die Spezifität der Amplifizierung aufzuzeigen. Dazu wurden die Proben in 0,1°C-Schritten von 60°C auf 90°C erhitzt und in jedem Schritt wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Bei reinem Amplifikat ergab sich ein großer einheitlicher Peak bei entsprechendem Schmelzpunkt.

Im Anschluss an die PCR wurde mithilfe der Standardreihe eine Standardkurve berechnet, anhand derer die Konzentrationen der Proben bestimmt werden konnte. Um Verunreinigungen oder Messfehler auszuschließen wurde jede Probe in drei Reaktionsansätzen gemessen. Nach der Amplifizierung wurde im für alle Proben exponentiellen Teil ein Intensitätswert bestimmt, bei dem die Proben verglichen wurden. Je früher eine Probe diesen Wert erreichte, desto höher war die Ausgangskonzentration. Mithilfe dieses Zeitpunktes konnte in der Standardkurve die Ausgangskonzentration ermittelt werden. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde für jede Probe der Mittelwert der drei cDNA-Konzentrationen in Relation zur  $\beta$ -Aktin-cDNA-Konzentration der entsprechenden Probe berechnet.

### **3.3 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte ab einer Fallzahl  $\geq 3$  mit dem Student's T-Test bei verbundenen bzw. unabhängigen Stichproben in PASW Statistics 18 für Microsoft Windows. Signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert  $< 0.05$  definiert.

### 3 Material und Methoden

Gen	Accession- Nummer	Strang	Sequenz 5' → 3'	Produkt- größe(bp)
Ratten-spezifische Sequenzen:				
actb	NM_031144	sense antisense	AGCGATGTACGTAGCCATCC CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	228
Atf3	NM_012912	sense antisense	CCCTCCTAGGGAAGATGGAG CTGATGAAACTCCCGGAAAA	194
CREM	NM_017334	sense antisense	TACTGCTTTGCCACAAGGTG GACTTTCAAGCACAGCCACA	194
Ctgf	NM_022266	sense antisense	TAGCAAGAGCTGGGTGTGTG TTCACCTGCCACAAGCTGTC	156
Cx26	X51615	sense antisense	TCCTCTTCATCTTCCGCATC CACGTGCATAGCTACCAGGA	206
Egr1	NM_012551	sense antisense	CAGGAGTGATGAACGCAAGA AGCCCGGAGAGGAGTAAGAG	194
Foxo1	XM_001056726	sense antisense	GTGAACACCATGCCTCACAC CACAGTCCAAGCGCTCAATA	211
Igfbp5	NM_012817	sense antisense	CAAGTGTTTGGAGGACAGCA TTCACAATGCACGAAAGAGC	224
Msg1	NM_172055	sense antisense	ATGCCAACCCAGGAGATGAAC GCAGTAGGAGAGCCTGTTGG	166
Nr4a1	NM_024388	sense antisense	TGTTGCTAGAGTCCGCCTTT CAGTGATGAGGACCAGAGCA	231
Nr4a3	NM_031628	sense antisense	TCGCTTCCACATACAAGTGC AAGGGTTCTACAGGGCAGGT	164
Pfn2	NM_030873	sense antisense	GGTGCCGGTGTACAATCTCT AAACCAAACGCCTCATGTTC	168
PtgER1	NM_013100	sense antisense	AGCAGATGTGAGGGCAGAGT GCCTCATCCACTAGGCTCAG	213
Human-spezifische Sequenzen:				
actb	NM_031144	sense antisense	AGCGATGTACGTAGCCATCC CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	228
actb_2	NM_001101	sense antisense	ACCTTCAACACCCCAGCCATGTACG CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGG	698
ATF3	NM_001040619	sense antisense	GTTTGCCATCCAGAACAAGC TCATCTTCTTCAGGGGCTACC	123
CX26	NM_004004	sense antisense	TCGCATTATGATCCTCGTTGTG GGGGAAGTAGTGATCGTAGCAC	117
MSG1	NM_004143	sense antisense	TTCTGCCAAGGCTCTGAAAT TGTTCCATTTGAGGCTACC	184
NR4A1	NM_002135	sense antisense	GGCATGGTGAAGGAAGTTGT CGGAGAGCAGGTCGTAGAAC	244
NR4A3	NM_006981	sense antisense	CCCCTCCAGGTTCCAGTTAT ATTTGGTACACGCAGGAAGG	205
FOXO1	NM_002015	sense antisense	AAGAGCGTGCCCTACTTCAA CTGTTGTTGTCCATGGATGC	209

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genexpression im Endometrium der Ratte

#### 4.1.1 Auswahl der untersuchten Gene und Nachweis der endometrialen Genexpression

Die hier vorliegende Arbeit basiert auf Gene-Array-Analysen unserer Arbeitsgruppe, in denen bei schwangeren, einseitig tubenligierten Ratten die Genexpression im Endometrium des Uterushorns mit Blastozysten im Vergleich zum kontralateralen Uterushorn ohne Blastozysten an 4 dpc verglichen wurde. In neun Einzelvergleichen zeigte sich, dass 22 Gene in dem Uterushorn mit Blastozysten mindestens 2,5fach hochreguliert waren im Vergleich zum ligierten Uterushorn und in mindestens 66% der Fälle eine höhere Expression als an 3 dpc vorwiesen. Von diesen Genen wurden die 11 am stärksten hoch regulierten Gene in der vorliegenden Arbeit analysiert: die Transkriptionsfaktoren Atf3, Msg1, Nr4a1, Nr4a3, Foxo1, Ctgf, Egr1, CREM und Pfn2, der G-Protein-gekoppelte Rezeptor PtgER1 und das Bindeprotein Igfbp5. Im Vergleich wurde die Expression des Gap-Junction Proteins Cx26, dessen Regulation bereits durch frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt war, analysiert. Die Expression dieser Gene wurde nun zunächst mittels semiquantitativer RT-PCR im Endometrium schwangerer Ratten an 4 - 5 dpc überprüft. Für alle untersuchten Gene konnte eine Expression im Rattendometrium nachgewiesen werden (Abbildung 3).

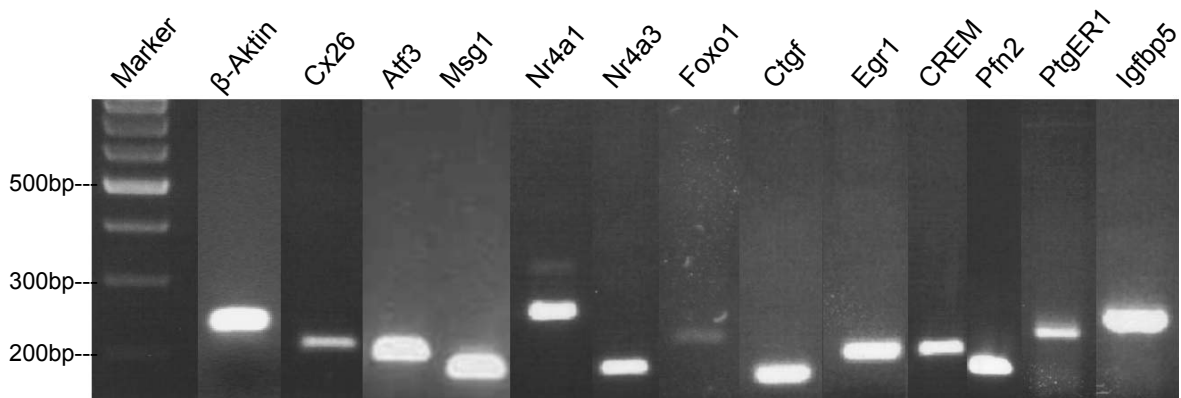


Abbildung 3: Nachweis der Expression der untersuchten Gene im Endometrium schwangerer Ratten (4-5 dpc) durch semiquantitative RT-PCR. Die Transkripte der Gene Cx26, Atf3, Msg1, Nr4a1, Nr4a3, Foxo1, Ctgf, Egr1, CREM, Pfn2, PtgER1 und Igfbp5 konnten im Endometrium der frühen Schwangerschaft nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

#### **4.1.2 Quantitative Validierung der Blastozysten-induzierten Genexpression im Endometrium an 4 dpc**

Untersucht wurden Gene, die in den vorangegangenen Arrayanalysen (siehe 4.1.1) im Endometrium des Uterushorns mit Blastozysten eine signifikante Hochregulation im Vergleich zum Endometrium des Uterushorns ohne Blastozysten zeigten. Um die spezifische Induktion dieser Gene durch die Blastozyste zu überprüfen, wurden Real-Time-PCR-Analysen an endometrialen Proben einseitig tubenligierter Ratten durchgeführt. Nach der Verpaarung wurden an Tag 4 pc, also an dem Tag, an dem die Blastozysten den Uterus erreichen, die Endometrien der beiden Uterushörner gewonnen und separat aufgearbeitet. Zuvor wurden die Uterushörner mit isotonischer Kochsalzlösung gespült, um durch die Anwesenheit von Blastozysten eine Schwangerschaft in den nicht-ligierten Uterushörnern nachzuweisen; in den kontralateralen Uterushörnern wurden keine Blastozysten gefunden. Durch die einseitige Tubenligatur konnte vom selben Organismus, somit unter identischen hormonellen Einflüssen, aus dem nicht-ligierten Uterushorn Endometrium mit Kontakt zu Blastozysten sowie aus dem ligierten Uterushorn Endometrium ohne Kontakt zu Blastozysten gewonnen werden. Die Genexpression der Endometrien der unterschiedlichen Uterushörner wurde miteinander sowie mit der Expression an Tag 3 pc, an dem die Blastozysten den Uterus noch nicht erreicht haben, verglichen (Abbildung 4).

An Tag 4 pc im Vergleich zu Tag 3 pc zeigt sich bei Cx26, Atf3, Msg1, Nr4a3, Nr4a1, CREM, Pfn2, Ctgf, Egr1 und Igfbp5 eine deutlich höhere Genexpression im Endometrium sowohl des ligierten als auch des nicht-ligierten Uterushorns. Diese war signifikant für Cx26 und Nr4a3. Im Vergleich zwischen ligiertem und nicht-ligiertem Uterushorn zeigen Cx26, Atf3, Msg1 und Nr4a3 tendenziell eine erhöhte Genexpression im Endometrium mit Blastozystenkontakt. Somit kann für diese Gene eine gesteigerte Expression durch die Blastozyste an Tag 4 pc verifiziert werden. Im Gegensatz hierzu kann die durch die Gene-Array-Analysen gezeigte Geninduktion durch die Blastozyste für die übrigen untersuchten Gene durch die Real-Time-PCR-Analysen nicht bestätigt werden. Während Nr4a1, Foxo1, CREM, Pfn2 und Ctgf keinen eindeutigen Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Uterushörnern erkennen lassen, zeigt sich für die Gene Egr1, PtgER1 und Igfbp5 tendenziell sogar eine Expressions-suppression bei Anwesenheit von Blastozysten.

#### **4.1.3 Untersuchung der Blastozysten-induzierten Genexpression im Endometrium bei verzögerter Implantation**

Zur Überprüfung, ob die in 4.1.2 hochregulierten Gene allein durch die Anwesenheit der Blastozysten, d.h. ohne Induktion einer Implantationsreaktion, induziert werden, wurde das Model der verzögerten Implantation (delayed implantation) gewählt. Hierzu

## 4 Ergebnisse

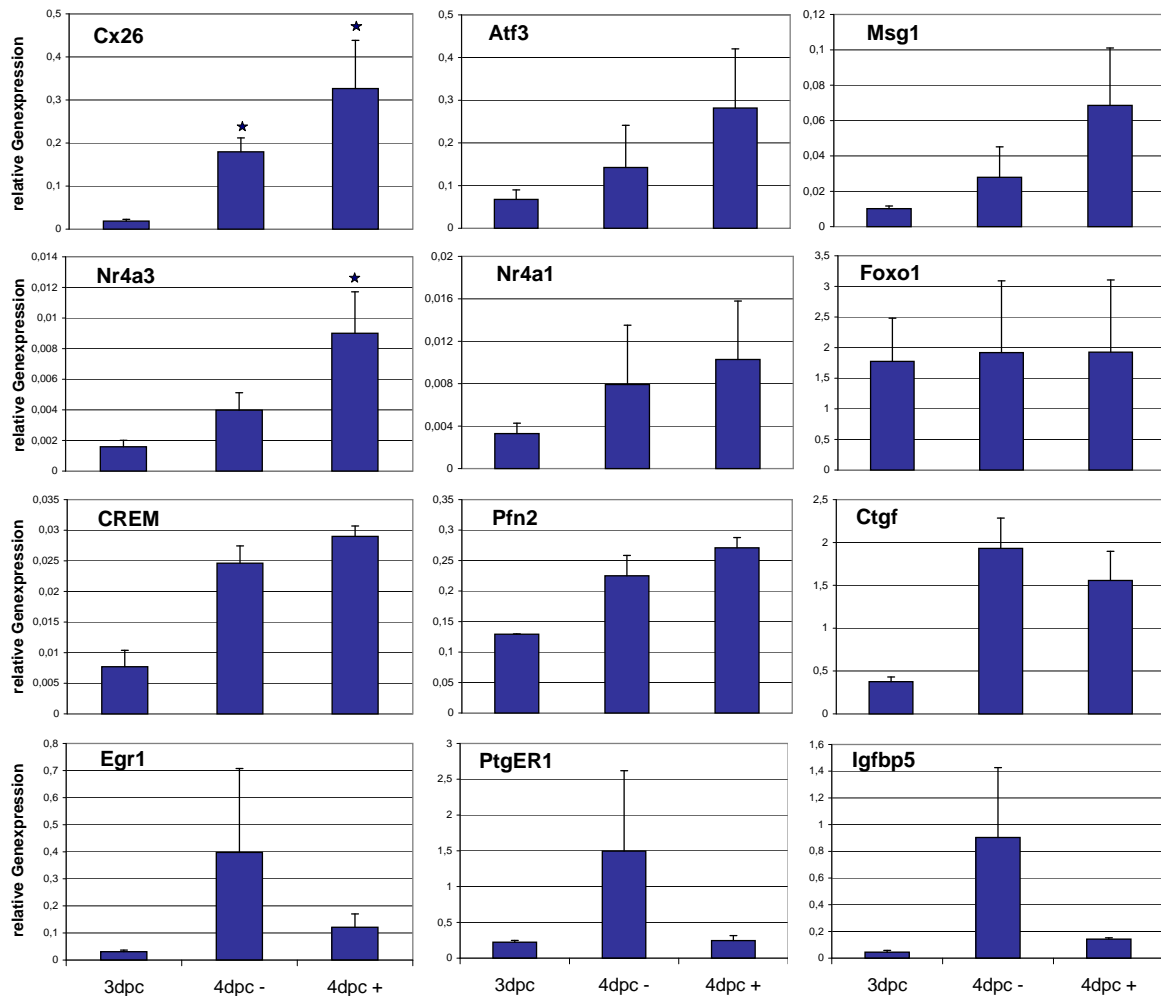


Abbildung 4: qPCR-Ergebnisse der endometrialen Genexpression an 3 dpc und an 4 dpc im Uterushorn mit Blastozysten (+) und im kontralateralen Horn ohne Blastozysten (-). Es zeigt sich in beiden Uterushörnern ein deutlicher, teils signifikanter, Expressionsanstieg an 4 dpc für die Gene Cx26, Atf3, Msg1, Nr4a3, Nr4a1, CREM, Pfn2, Ctgf, Egr1 und Igfbp5. Für die Gene Cx26, Atf3, Msg1 und Nr4a3 kann eine Hochregulation der Genexpression im Endometrium durch die Blastozysten an 4 dpc bestätigt werden. Für Nr4a1, Foxo1, CREM, Pfn2 und Ctgf wird kaum ein Unterschied zwischen beiden Uterushörner deutlich und bei Egr1, Ptger1 und Igfbp5 zeigt sich eine Suppression durch die Anwesenheit von Blastozysten. Dargestellt sind Mittelwert + SEM; \* signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu 3 dpc.

wurden Ratten an Tag 2 pc ovariectomiert und danach nur mit Progesteron substituiert. Durch diese Behandlung verharren die Blastozysten im Cavum uteri ohne zu implantieren.

Auch diese Untersuchungen wurden an einseitig tubenligierten Ratten durchgeführt. Die Anwesenheit von Blastozysten nur im intakten Uterushorn, nicht aber im tubenligierten Uterushorn, wurde durch Ausspülen der beiden Uterushörner mit isotonomischer Kochsalzlösung bestätigt. Die Endometrien der Uterushörner mit Blastozysten und ohne Blastozysten wurden an Tag 4 pc isoliert und die Genexpression der Endometrien der unterschiedlichen Uterushörner – mit und ohne Blastozysten – bei verzögerter Implantation miteinander verglichen (Abbildung 5). Eine deutlich erhöhte, jedoch nicht signifikante Genexpression im Endometrium mit Blastozystenkontakt zeigt sich hierbei nur für *Msg1*, *Nr4a3* und *Foxo1* und eine leicht erhöhte Expression für *Atf3*. Verglichen mit den Werten aus 4.1.2 zeigt sich somit auch bei verzögerter Implantation eine erhöhte Expression von *Atf3*, *Msg1*, und *Nr4a3* in Anwesenheit von Blastozysten. Interessanterweise zeigte sich jedoch für *Foxo1* eine Hochregulation nur in Anwesenheit von ruhenden Blastozysten, nicht hingegen von implantierenden Blastozysten. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde im Weiteren auf die Untersuchung von *CREM* und *Pfn2* verzichtet, da eine Regulation durch die Blastozyste nicht erkennbar war.

### 4.1.4 Zeitlicher Verlauf der Blastozysten-regulierten Genexpression während der Periimplantationsphase

Nachdem eine Blastozysten-vermittelte Transkriptionsregulation für einige der untersuchten Gene nachgewiesen werden konnte, wurde zudem der zeitliche Verlauf der Genexpression im Endometrium des Uterushorns mit Blastozysten im Vergleich zu dem des Uterushorns ohne Blastozysten während der Periimplantationsphase von Tag 3 bis 6 der Schwangerschaft an einseitig tubenligierten Ratten untersucht. Zur Darstellung des quantitativen Unterschieds wurde die mittels quantitativer Real-time-PCR ermittelte Genexpression des Endometriums des tubenligierten Uterushorns (= ohne Blastozysten) gleich 1 gesetzt und die x-fache Expression im kontralateralen Horn (= mit Blastozysten) jeweils im Paarvergleich ab Tag 4, an dem die Blastozysten den Uterus erreichen, berechnet (Abbildung 6a und 7a). Starke interindividuelle Schwankungen der Expressionsstärke können somit dennoch aussagekräftige Vergleiche zulassen. Zur besseren Visualisierung des zeitlichen Verlaufs der Genexpression wurde zudem die relative Genexpression im Endometrium beider Uterushörner als Liniengrafik von Tag 3 bis 6 dargestellt (Abbildung 6b und 7b). Hierbei wurde der Mittelwert der Genexpression aller Individuen jeweils für das ligierte und das nicht-ligierte Horn gebildet. Da die Blastozyste erst an Tag 4 den Uterus erreicht, wurde an Tag 3 nicht zwischen ligiertem und nicht-ligiertem Uterushorn unterschieden und somit für diesen Zeitpunkt kein Fold

## 4 Ergebnisse

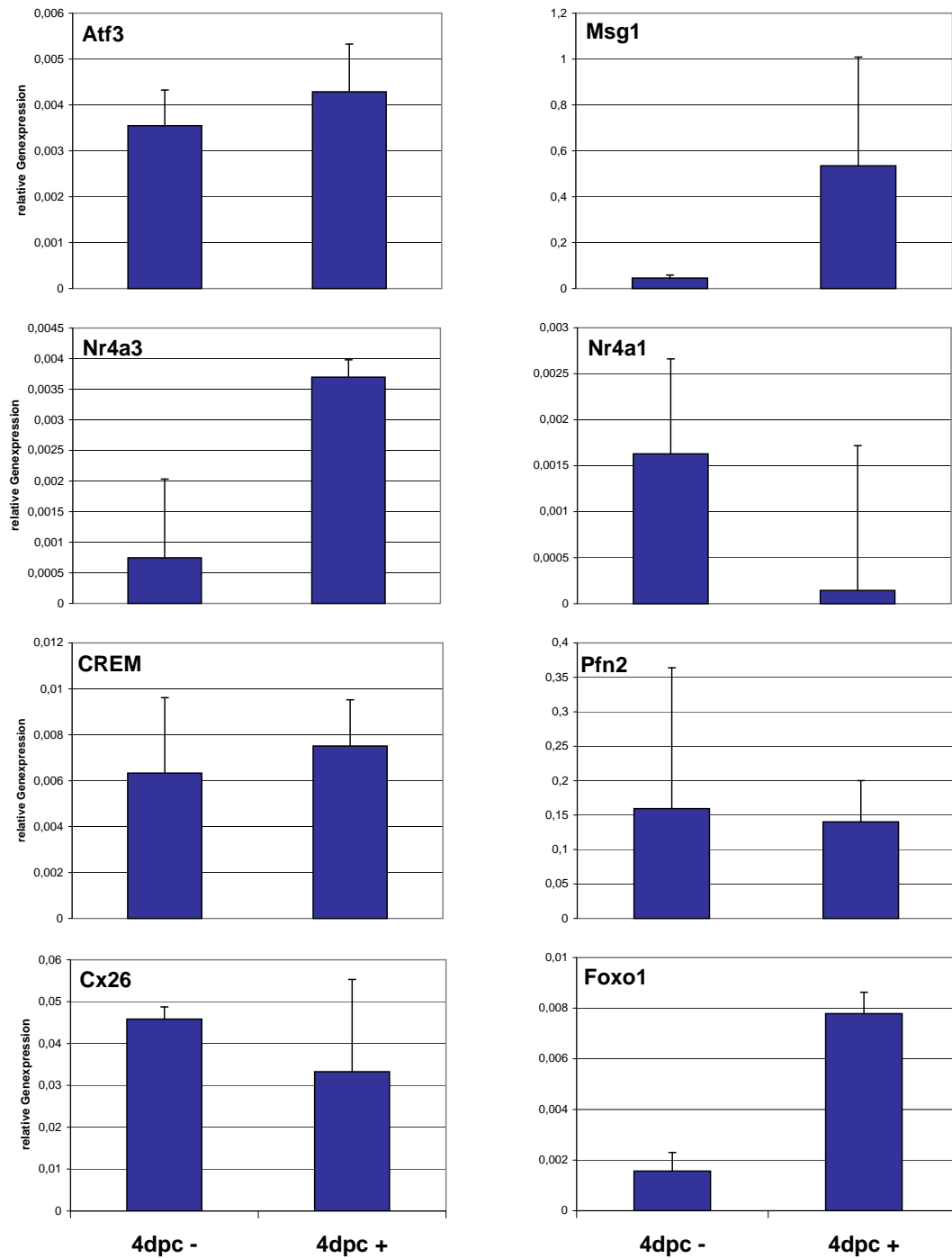


Abbildung 5: Genexpression an 4 dpc bei verzögerter Implantation (delayed implantation). Im Vergleich zwischen den beiden Uterushörnern zeigt sich für *Msg1*, *Nr4a3* und *Foxo1* eine erhöhte Expression bei Anwesenheit von Blastozysten. Dargestellt sind Mittelwert + SEM; + mit Blastozystenkontakt, - ohne Blastozystenkontakt = ligiertes Uterushorn.

Change berechnet.

Gene, die eine Blastozysten-vermittelte Hochregulation der Transkription an 4 dpc zeigen, sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Berechnung der Einzeldifferenzen innerhalb der einzelnen Individuen bestätigte die Ergebnisse aus Abbildung 4 für 4 dpc. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Transkription in Anwesenheit von Blastozysten für Cx26, Atf3, Nr4a3, Nr4a1, Msg1 und Foxo1. Für Foxo1 wird die nur gering ausgeprägte Expressionserhöhung nur durch die Berechnung des Fold Changes im individuellen Paarvergleich deutlich und ist somit in Abbildung 6b und Abbildung 4 nicht erkennbar. Interessanterweise zeigte nur Cx26 eine durchgehend gesteigerte Transkription im Endometrium mit Embryonen von 4 bis 6 dpc. Für alle anderen in Abbildung 6 dargestellten Gene konnte an Tag 5 und 6 pc im Blastozysten-haltigen Uterushorn eine im Vergleich zum Uterushorn ohne Blastozysten deutlich reduzierte endometriale Genexpression beobachtet werden. Somit handelt es sich hier offensichtlich um einen durch die Blastozysten induzierten Transkriptionspeak kurz vor Beginn der Trophoblastinvasion, der mit Beginn der Invasion und Zerstörung des Uterusepithels wieder abnimmt. Interessanterweise zeigt sich für diese Gene mit einem Tag Verzögerung ab 5 dpc eine verstärkte Transkription im Endometrium des kontralateralen Uterushorns, das keinen direkten Kontakt zu Blastozysten hatte.

Die Gene, für die keine Blastozysten-vermittelte Induktion an 4 dpc gezeigt werden kann (Ctgf, Egr1, PtgER1 und Igfbp5) zeigen sowohl an 4 dpc als auch im weiteren Verlauf der Schwangerschaft eine erhöhte Transkription im Endometrium des Uterushorns ohne Blastozysten bei weitgehend konstanter Transkription im Uterushorn mit Blastozysten (Abbildung 7b). Hieraus resultiert eine teils signifikant niedrigere Genexpression im Endometrium mit Blastozystenkontakt im Vergleich zum Endometrium ohne Blastozysten (Abbildung 7a).

## 4 Ergebnisse

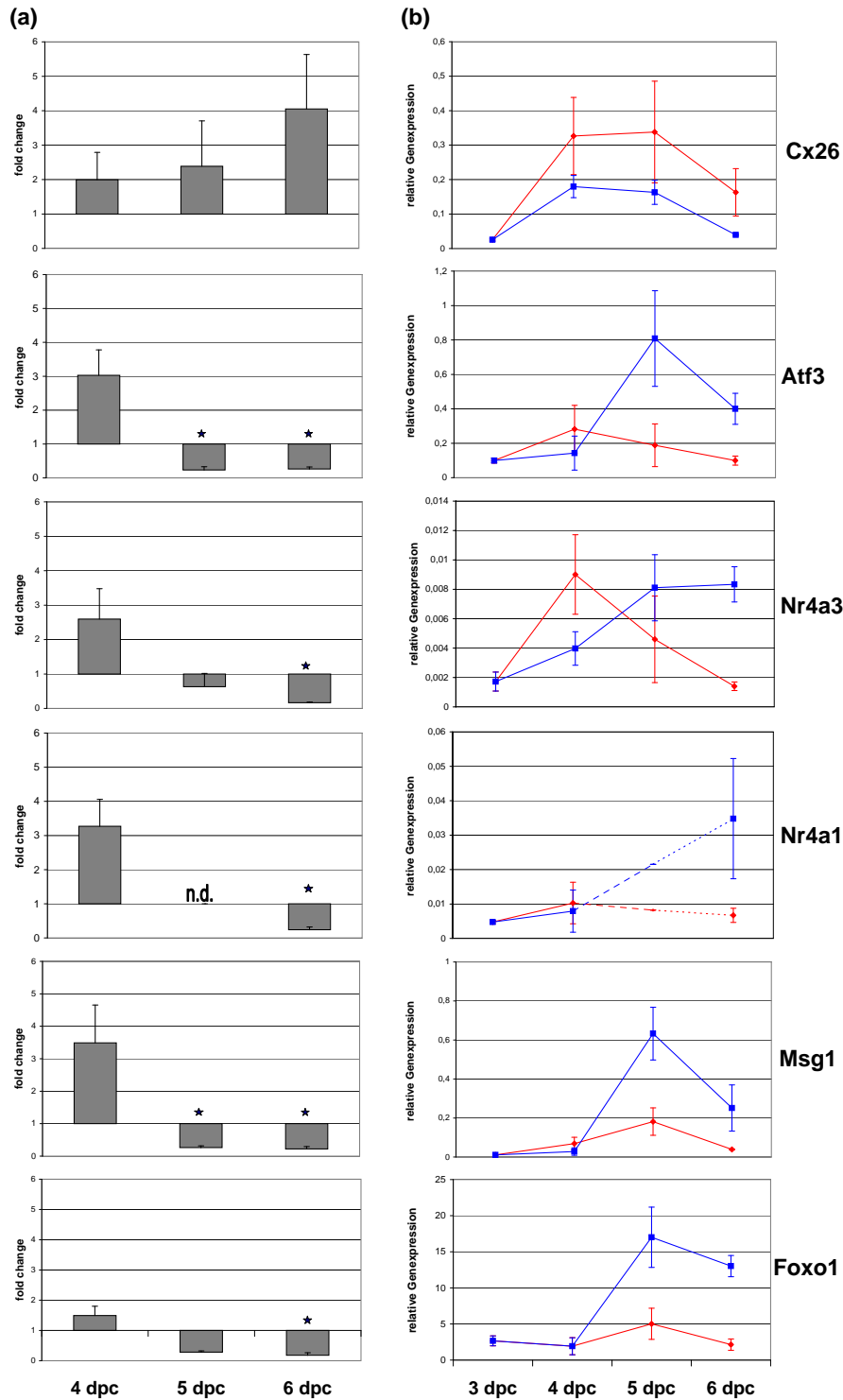


Abbildung 6: Genexpression im Endometrium der Ratte in Abhängigkeit der Anwesenheit von Blastozysten. (a) Genexpressionsvergleich mit / ohne Blastozysten (Fold Change) von 4 dpc bis 6 dpc sowie (b) Expressionsverlauf von 3 dpc bis 6 dpc. Für Cx26 zeigt sich ab 4 dpc eine deutlich gesteigerte Transkription in Anwesenheit von Blastozysten, die mit fortschreitender Implantation von 4 bis 6 dpc ansteigt. Im Gegensatz hierzu zeigt sich für die anderen hier dargestellten Gene nach einer Induktion der Transkription an 4 dpc ein Abfall der Expression im Blastozysten-haltigen Uterushorn und ab Tag 5 pc ein Anstieg im kontralateralen Endometrium ohne Blastozystenkontakt (b), was zu einer im Vergleich signifikant reduzierten Transkription im Blastozysten-haltigen Uterushorn führt (a). Dargestellt sind Mittelwert + SEM; ● mit Blastozystenkontakt, ■ ohne Blastozystenkontakt; \* Signifikanz ( $p < 0,05$ ); n.d. = nicht durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

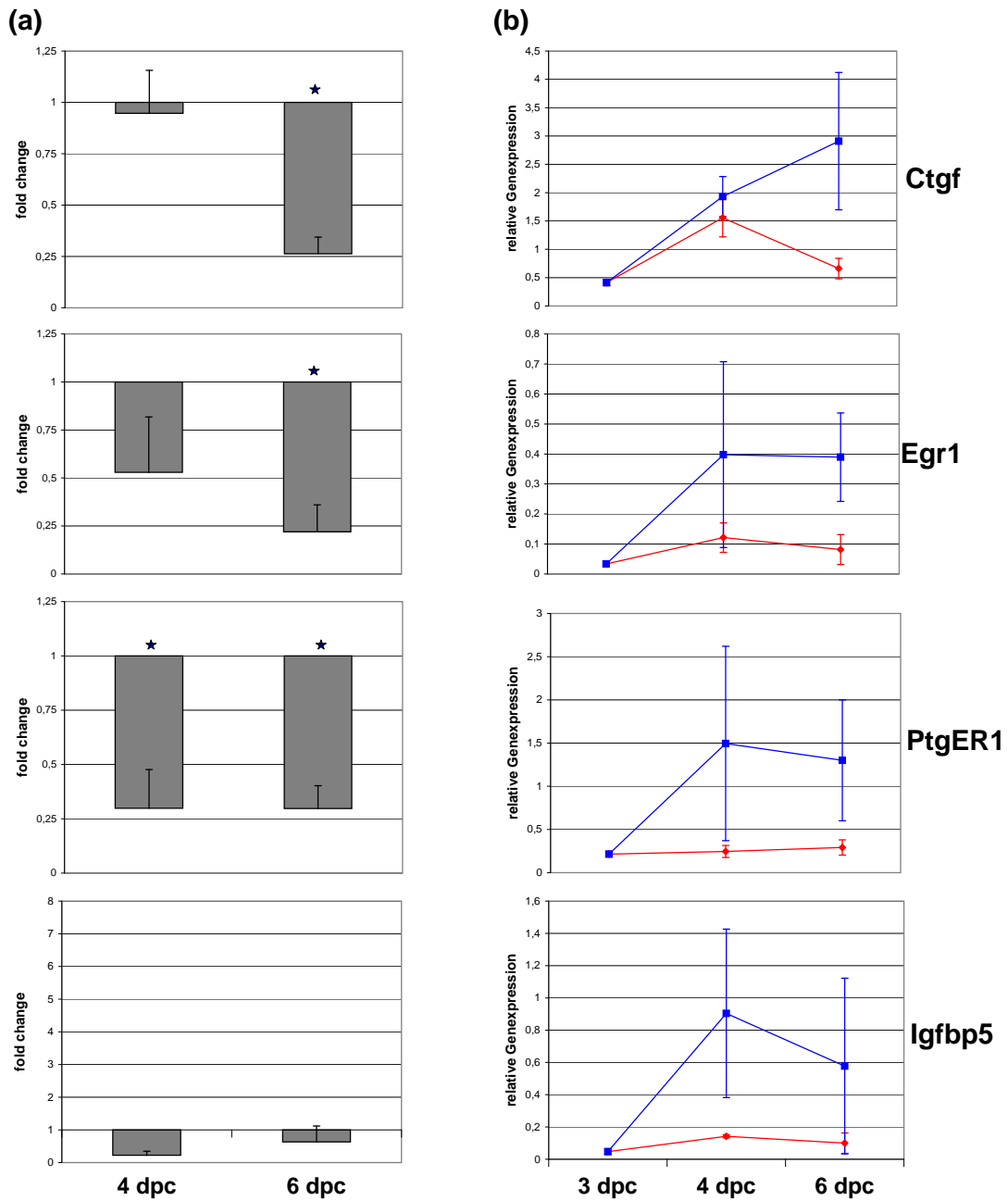


Abbildung 7: Genexpression im Endometrium der Ratte in Abhängigkeit der Anwesenheit von Blastozysten. (a) Genexpressionsvergleich mit / ohne Blastozysten (Fold Change) von 4 dpc bis 6 dpc sowie (b) Expressionsverlauf von 3 dpc bis 6 dpc. Alle Gene zeigen eine relativ konstante Genexpressionsrate im Endometrium mit Blastozystenkontakt, während die Expression im kontralateralen Uterushorn ab 4 dpc ansteigt (b). Somit zeigt sich eine teils signifikante Expressionssuppression durch die Blastozyste (a). Dargestellt sind Mittelwert + SEM; ● mit Blastozystenkontakt, ■ ohne Blastozystenkontakt; \* Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Genexpression in humanem Endometrium

### 4.2.1 Nachweis der Genexpression im humanen Endometrium

Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Atf3, Msg1, Nr4a3, Nr4a1, Cx26 und Foxo1 im Endometrium der Ratte durch die Blastozyste hochreguliert werden. Um zu evaluieren, ob neben dem bereits im humanen Endometrium nachgewiesenen Gen CX26 auch die Gene ATF3, MSG1, NR4A1, NR4A3 und FOXO1 bei der Implantation beim Menschen eine Rolle spielen könnten, wurde deren Expression im humanen Endometrium in der Proliferationsphase und in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus überprüft. Als Positivkontrolle für ATF3, NR4A3, NR4A1 und FOXO1 diente humanes Lebergewebe, für MSG1 Östrogen-Rezeptor-positives Brustkrebsgewebe. Anhand semiquantitativer RT-PCR-Analysen konnte die Expression von ATF3, NR4A3, NR4A1 und FOXO1 im humanen Endometrium nachgewiesen werden, während MSG1 nicht exprimiert wurde (Abbildung 8).

### 4.2.2 Genexpression in Abhängigkeit vom Zyklusstadium

Nachdem die Gene ATF3, NR4A3, NR4A1 und FOXO1 in menschlichem Endometrium sowohl in der Proliferationsphase als auch in der Sekretionsphase nachgewiesen werden konnte, wurde die Genexpression durch Real-Time-PCR-Analysen quantifiziert um beide Zyklusphasen miteinander zu vergleichen (Abbildung 9). Dabei zeigten ATF3, NR4A3 und NR4A1 eine höhere Genexpression in der Sekretionsphase als in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus. Diese war signifikant erhöht für NR4A3. FOXO1 hingegen zeigte keine zyklische Regulation.

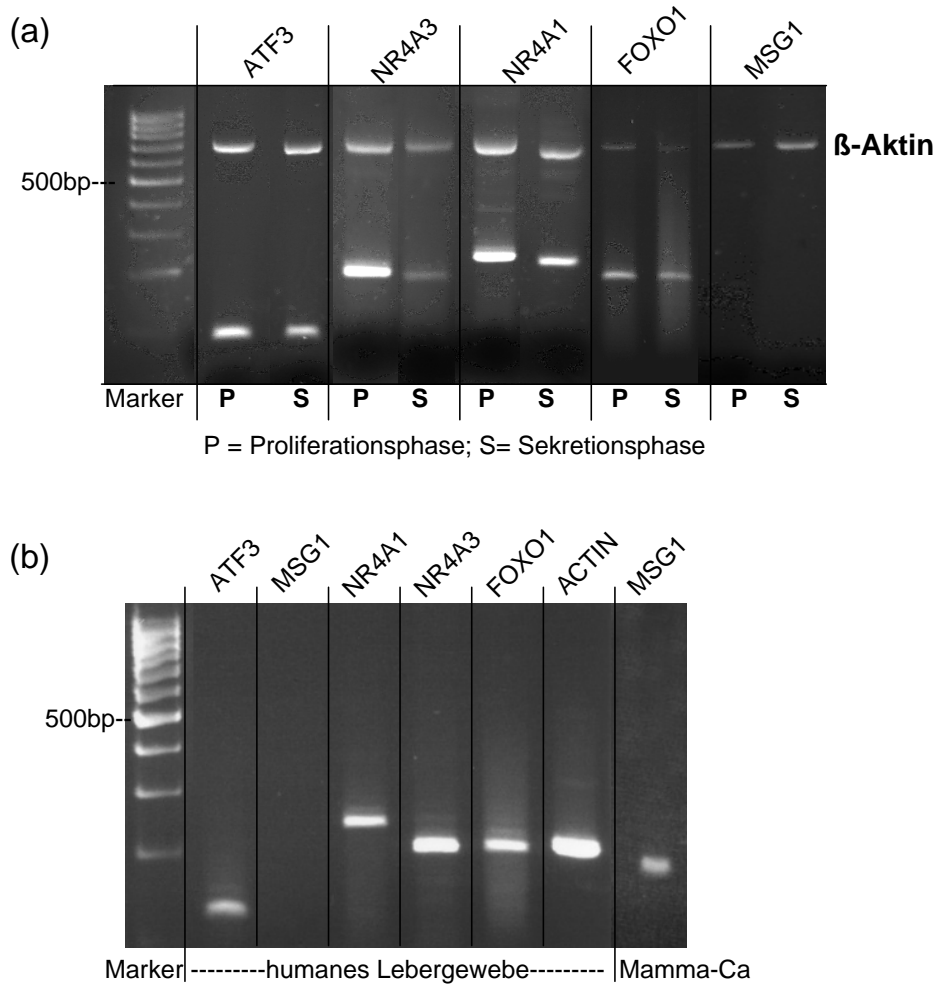


Abbildung 8: (a) Genexpression im humanem Endometrium in der Proliferations- sowie Sekretionsphase parallel zu  $\beta$ -Aktin als Kontrollgen. (b) Genexpression in der Leber und im Mamma-Karzinom als Positivkontrollen. Die Gene NR4A3, NR4A1, ATF3 und FOXO1 lassen sich im humanen Endometrium nachweisen. Eine MSG1-Expression wurde in MammaCa-Gewebe als Positivkontrolle nachgewiesen, aber nicht im humanen Endometrium.

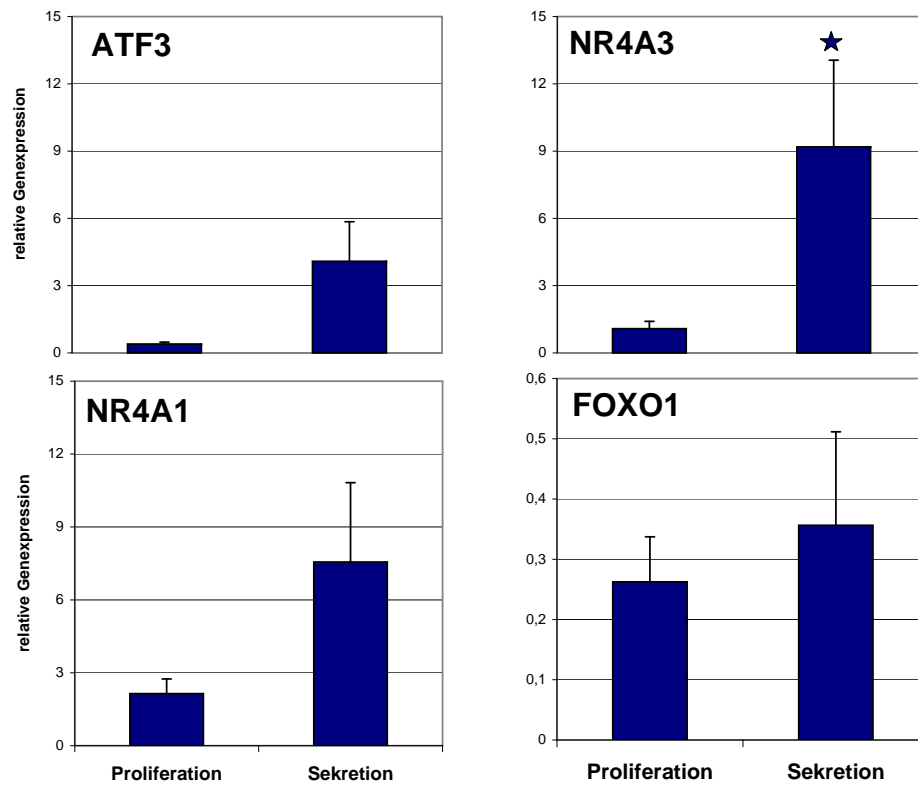


Abbildung 9: Genexpression von ATF3, NR4A3, NR4A1 und FOXO1 im Verlauf des Menstruationszyklus. ATF3, NR4A3 und NR4A1 zeigen eine tendenziell höhere Genexpression in der Sekretionsphase als in der Proliferationsphase. FOXO1 hingegen zeigte keine zyklische Regulation. Dargestellt sind Mittelwert + SEM; \* Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Blastozysten-induzierte Genexpression im Endometrium der Ratte

In der vorliegenden Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die an den zu Beginn der Implantation noch vor der Invasion des Trophoblasten durch die Blastozyste im Endometrium induzierten Signalkaskaden beteiligt sind. Bisher ist das Wissen über die ersten molekularen Interaktionen zwischen der Blastozyste und der Uterusschleimhaut noch sehr begrenzt. Schwierigkeiten bei diesen Untersuchungen bestehen insbesondere darin, die Effekte der durch das Eintreten der Schwangerschaft bedingten veränderten Serumhormonkonzentrationen von den Effekten zu trennen, die durch die Blastozyste im rezeptiven Endometrium hervorgerufen werden. Da solche Untersuchungen am Menschen ethisch nicht vertretbar sind, wurden bisherige Analysen in Tiermodellen, überwiegend in Nagern, durchgeführt. Wir haben unsere Untersuchungen an Ratten durchgeführt, bei denen wir uns deren spezielle Anatomie des Uterus mit zwei Uterushörnern zu nutze machen konnten. Durch einseitige Tubenligaturen war es uns so möglich, aus ein und dem selben Tier, d.h. unter identischen hormonellen Bedingungen, aus dem nicht ligierten Uterushorn Endometrium zu gewinnen, das Kontakt zu Blastozysten hatte, und aus dem kontralateralen Horn Endometrium, das keinen Blastozystenkontakt hatte. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine separierte Untersuchung des Effektes der Blastozysten. Zusätzlich wurde diese Methode bei verzögerter Implantation angewandt, um den Einfluss aktiv sich implantierender Blastozysten mit dem ruhender Blastozysten (delayed implantation) zu vergleichen. Hierbei handelt es sich um eine etablierte Methode, bei der durch Ovariectomie und anschließende Progesteronsubstitution die Blastozysten in einem Ruhezustand verbleiben und nicht implantieren (Cochrane und Meyer, 1957).

So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Transkription der Transkriptionsfaktoren *Atf3*, *Nr4a3*, *Nr4a1*, *Msg1* und *Foxo1* als ganz frühes Signal der Implantationsreaktion bereits an Tag 4 pc, wenn die Blastozysten das Uteruslumen erreichen, aber noch keine Invasion des Trophoblasten stattfindet, durch die Blastozyste im Endometrium der Ratte erhöht wird. Dabei war jedoch die Geninduktion für *Foxo1* deutlich schwächer ausgeprägt als für die übrigen vier Gene. Von diesen Genen werden *Atf3*, *Nr4a3*, *Msg1* und *Foxo1* auch schon durch die Anwesenheit ruhender Blastozysten, d.h. ohne Implantationsreaktion im Endometrium, induziert. Interessanterweise werden diese Transkriptionsfaktoren von der Blastozyste an Tag 4 pc induziert, ab Tag 5 (*Atf3*, *Nr4a3*, *Msg1*, *Foxo1*) bzw. Tag 6 pc (*Nr4a1*) ist ihre Transkription jedoch wieder deutlich reduziert. Sie sind damit frühe Faktoren, die von der Blastozyste an Tag 4 pc wahrscheinlich in unmittelbarer Umgebung im Epithel induziert werden. An Tag 5

und 6 pc, wenn das Epithel zugrunde geht, sinkt die Expression jedoch wieder ab, während die Expression im kontralateralen Uterushorn ansteigt, was durch eine verzögerte Fortleitung des Blastozystensignals in das andere Horn mit noch intaktem Epithel zu erklären sein könnte. Im Gegensatz hierzu steigt die Expression von Cx26, welches hier als Kontrollgen mit untersucht wurde, im Uterushorn mit Blastozysten von 4 bis 6 dpc an. Hier ist aus Voruntersuchungen bekannt, dass die Expression von Cx26 kurz vor der Implantation durch die Blastozyste im Uterusepithel induziert wird, aber bei der Ratte auch mit fortschreitender Schwangerschaft im umgebenden Deziduagewebe exprimiert wird (Grümmer et al., 1994). Bei der delayed implantation war an 4 dpc noch kein Effekt durch Blastozystenkontakt sichtbar. Hier kommt es möglicherweise in Anwesenheit ruhender Blastozysten zu einer verzögerten Induktion erst an Tag 5 pc. Um die vorliegenden Ergebnisse genauer zu analysieren, soll die genaue Lokalisation der Transkriptionsfaktoren im Endometrium während der Implantation in Folgeuntersuchungen mittels Immunhistochemie oder in-situ-Hybridisierung untersucht werden.

Activating Transcription Factor 3 (Atf3) ist ein Stress-induzierter Transkriptionsrepressor, dessen mRNA-Level unter Einfluss von Stresssignalen stark ansteigt (Hai et al., 1999). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Atf3 bei Ischämie, bei Ischämie-Reperfusionen, bei Hautwunden und bei Nerv-Axotomie induziert wird. Dabei steigt das Atf3-mRNA-Level innerhalb von 2 Stunden nach Stressexposition an (Hai et al., 2001). Zudem ist die Expression von Atf3 stets verbunden mit einem Zellschaden. So konnte eine Atf3-Induktion zwar bei Neurotomie eines Spinalnervs nachgewiesen werden, nicht aber bei Injektion eines Entzündungsmediators (Tsujino et al., 2000). Da bei der Implantation endometriale Zellen der Implantationskammer durch Apoptose zugrunde gehen (Parr et al., 1987), kann man Atf3 in diesem Zusammenhang als einen frühen und schnellen Transkriptionsfaktor in der Signalkaskade sehen, der an der Implantationsreaktion beteiligt ist. Da es bei der delayed implantation noch nicht zur Implantationsreaktion kommt, konnte hier auch kaum ein Expressionsanstieg durch die Blastozyste an Tag 4 gesehen werden.

Melanocyte-specific Gene 1 (Msg1, auch Cited1) ist ein Transkriptionsfaktor, der als selektiver Östrogenrezeptor-Coaktivator fungiert und somit eine Rolle bei Zell- und Gen-spezifischer Regulation von Östrogen-abhängiger Transkription spielt (Yahata et al., 2001). Im Endometrium könnte Msg1 die Östrogensensitivität bei Blastozystenkontakt erhöhen und so möglicherweise die Implantation begünstigen.

Die Kernrezeptoren Nr4a1 und Nr4a3 gehören zu der Nur77-Subfamilie der nukleären Steroidhormonrezeptoren. Sie sind unmittelbar frühe Transkriptionsfaktoren, beteiligt an der Regulation von Zellüberleben und Apoptose (Winoto und Littman, 2002). Nr4a1 zeigt dabei sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Funktionen. In Versuchen an humanen Lungenkrebszellen führte eine Überexpression von Nr4a1 zu Resistenz gegen die Behandlung mit Retinsäure und trug zu Proliferation und neoplastischer

Transformation bei (Wu et al., 1997). Auf der anderen Seite führte Nr4a1-Hemmung durch siRNA zu drastischer Reduktion von Zellwachstum und -überleben, korreliert mit erhöhter Apoptose (Li et al., 2006). Interessanterweise konnte Nr4a1 aber auch einen pro-apoptotischen Effekt in Thymozyten vermitteln (Winoto und Littman, 2002). Dass Nr4a1-knockout-Mäuse jedoch keinen Phenotyp haben (Lee et al., 1995), könnte durch Versuche erklärt werden, die eine funktionelle Redundanz mit Nr4a3 in der T-cell-Apoptose zeigen (Cheng et al., 1997). Nr4a3-knockout-Mäuse hingegen sind embryonal letal (8,5 dpc) durch eine Fehlregulation des Mesoderm (DeYoung et al., 2003), was auf der anderen Seite auch nicht überlappende Funktionen von Nr4a3 mit Nr4a1 voraussetzt. Ihre Aufgabe in der Regulation von Apoptose könnte auch im Endometrium bei der Implantation eine wichtige Rolle spielen. Für genauere Aussagen über den Effekt der Kernrezeptoren im Endometrium sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Eine funktionelle Redundanz ist aufgrund der ähnlichen Regulation im Endometrium jedoch zu vermuten.

Foxo1 ist ein Transkriptionsfaktor der Forkhead-box(FOX)-Familie. Als cAMP-induziertes Gen wurde es bereits in humanen Deziduazellen gefunden (Christian et al. 2002). Dort induziert es Igfbp1, ein wichtiges Sekretionsprodukt der Deziduazellen (Kim et al., 2005). Campbell et al. (2006) beschrieben Foxo1 auch im luminalen endometrialen Epithel pseudogravidier Mäuse. Es zeigte hier eine leicht ansteigende Genexpression von Tag 3 zu Tag 5, wie es auch in dieser Arbeit bei schwangeren Ratten in beiden Uterushörnern (ligiert und nicht-ligiert) nachgewiesen werden konnte.

Die hier identifizierten Transkriptionsfaktoren könnten somit an den durch die Blastozysten induzierten frühen Signalkaskaden im Endometrium beteiligt sein, die zu einer erfolgreichen Implantation des Embryos führen.

In der ganz frühen Phase der Implantation spielt die Genexpression im luminalen Epithel des Endometriums, der ersten Kontaktstelle des Embryos, eine entscheidende Rolle. Das Epithel fungiert hier als „gate keeper“ für die erfolgreiche Implantation. Die meisten Untersuchungen zur Genregulation dieser Phase wurden bisher an Mäusen durchgeführt.

Das Expressionsmuster verschiedener Gene im luminalen Uterusepithel von Tag 3 bis 5 untersuchten bereits Campbell et al. (2006), sie verwendeten hierzu jedoch pseudogravide Mäuse, welche mit vasektomierten Männchen verpaart wurden und bei denen somit keine Befruchtung stattfand. In ihrer Arbeit konnten sie eine deutliche Regulation der Gene Cochlin, Amphiregulin, Igfbp3 und Ajuba beobachten. Da bei diesem experimentellen Ansatz jedoch keine Blastozysten im Uterus vorhanden sind, kann diese Regulation nicht durch eine Blastozystenwirkung bedingt sein und wird vermutlich durch den veränderten Hormonstatus bedingt.

Eine spezifische Geninduktion im rezeptiven Endometrium durch die Blastozyste

wurde von unserer Arbeitsgruppe für Connexin26 (Cx26) gezeigt (Winterhager et al., 1993, Grümmer et al., 1994, 1999, 2004). In der vorliegenden Arbeit diente dieses Gen deshalb als Kontrolle für die Untersuchungen. Cx26 gehört zur Gruppe der Gap Junction Proteine, welche den passiven Transport kleiner Moleküle zwischen benachbarten Zellen ermöglichen (Kumar und Gilula, 1996). Während dieses Gen in der Präimplantationsphase durch den Anstieg des Serumprogesterons im Endometrium supprimiert wird, konnte eine Induktion der Transkription an 4 dpc und eine lokale Induktion des Proteins an 5 dpc im Epithel der Implantationskammer in Anwesenheit von Blastozysten gezeigt werden (Grümmer et al., 1999). Während Cx26 in der Progesteron-dominierten rezeptiven Phase durch hohe Konzentrationen von Östrogen unter Beteiligung des Östrogenrezeptors induziert werden kann, erfolgt die Blastozysten-vermittelte Cx26-Induktion an Tag 4 pc jedoch durch eine Östrogenrezeptor-unabhängige Signalkaskade (Grümmer et al., 2004). Bei der delayed implantation konnte eine generalisierte Geninduktion im luminalen Epithel an Tag 5 pc festgestellt werden (Grümmer et al., 2004).

Eine spezifische, durch die Blastozyste vermittelte Induktion von HB-EGF im luminalen Epithel der Implantationskammer konnte von Das et al. (1994, 1997) bei Mäusen nachgewiesen werden. Sie zeigten dabei eine frühe Geninduktion bereits während der Apposition der Blastozyste ab 4,5 dpc auf. Es zeigte sich keine Induktion dieses Gens zwischen den Implantationskammern (interimplantation site), bei Pseudogravidität sowie bei delayed-implantation. In einer weiteren Arbeit (Das et al., 1995) zeigten sie ebenfalls eine Induktion von Amphiregulin im luminalen Epithel der Implantationskammer an Tag 4,5. Diese Induktion war auch durch Progesteron hervorzurufen bzw. durch einen Progesteron-Antagonisten zu hemmen und konnte von Campbell et al. (2006) auch bei Pseudogravidität nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine deutlichere Expression bei schwangeren Mäusen in der Implantationskammer als in der interimplantation site, im kontralateralen ligierten Uterushorn ohne Blastozysten sowie bei Pseudogravidität. Schließlich beschrieben Das et al. (1997) noch eine spezifische Induktion von Betacellulin und Epiregulin bei der Adhäsion im luminalen Epithel der Implantationskammer sowie auch im darunterliegenden Stroma.

White et al. (2006) beobachteten eine spezifische Regulation von Osteopontin (Spp1) im luminalen endometrialen Epithel der Maus zur Zeit der Implantation. Während Osteopontin zu Beginn der Schwangerschaft im luminalen Epithel nicht nachzuweisen ist, zeigt sich eine starke Induktion an Tag 4,5 und 5 pc. An Tag 6 der Schwangerschaft war Osteopontin nicht mehr nachweisbar. Da neben Osteopontin auch sein Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin einen ähnlichen Expressionsverlauf zeigt (Apparao et al. 2001), könnte Osteopontin durch Integrinbindung die Adhäsion des Embryos begünstigen (White et al., 2006).

Reese et al. (2001) untersuchten in Microarray-Analysen das Genexpressionsprofil in

schwangeren Maus-Uteri an Tag 4,5 pc in der Implantationskammer im Vergleich zum Endometriumgewebe zwischen den Implantationskammern (interimplantation sites). 36 Gene waren in der Implantationskammer signifikant hochreguliert im Vergleich zu den Zwischenstücken während 27 Gene signifikant herunterreguliert waren. Unter den hochregulierten Genen fanden sich insbesondere DNA-assozierte Gene, unter den herunterregulierten Genen viele Immunitäts-assozierte Faktoren. Insbesondere für Cx26, Cx43, Amphiregulin und Protease Nexin-1 konnte eine Hochregulation in den Implantationskammern gezeigt werden. Cx26 und Cx43 wurden zuvor von Grümmer et al. (1994) während der Implantation im Endometrium beschrieben (siehe oben), Amphiregulin fanden Das et al. (1995) im luminalen Epithel der Implantationskammer während Protease Nexin-1 (Kim et al., 2001) im endometrialen Stroma während der Periimplantationsphase hochreguliert wird. Reese et al. (2001) arbeiteten bei ihren Versuchen jedoch mit gesamtem Uterusgewebe, welches auch Blastozysten sowie Myometrium enthielt, sodass hierbei keine genaue Zuordnung der Gene zu den verschiedenen Kompartimenten bestimmt werden konnte.

Einen ähnlichen, aber genaueren experimentellen Ansatz wählten Chen et al. (2006). Sie untersuchten das epitheliale Expressionsprofil der Implantationskammer im Vergleich zum Epithel zwischen den Implantationskammern. Dafür isolierten sie vorher jeweils das lumbale Epithel. Anhand von Microarray-Analysen konnten sie bei der Maus eine Reihe von Genen nachweisen, die in der Implantationskammer spezifisch hoch- oder herunterreguliert waren, darunter auch Cyr61 (CCN1). Chen et al. zeigten an in-situ Hybridisierungen, dass eine Cyr61-Expression ab Tag 4,5 im Epithel der Implantationskammer nachweisbar ist, nicht jedoch im Epithel zwischen den Implantationskammern, bei Pseudogravidität oder delayed-implantation.

Somit waren HB-EGF, Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin, Osteopontin, Cyr61 und Cx26 die bisher beschriebenen Faktoren, die spezifisch durch die Blastozyste während der Implantation im luminalen Epithel des Endometriums induziert werden. Inwiefern die durch die Blastozyste an Tag 4 pc bei der Ratte im Endometrium induzierten Transkriptionsfaktoren Atf3, Nr4a3, Nr4a1, Msg1 und Foxo1 an diesen Induktionen beteiligt sind und wo genau sie lokalisiert sind, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Faktoren konnte die Induktion der Gene CREM, Pfn2, Ctgf, Egr1, PtgER1 und Igfbp5, die sich in den Gene Array-Analysen gezeigt hatte, durch die quantitative RT-PCR nicht bestätigt werden. Während sich für CREM, Pfn2 und Ctgf kein Unterschied im Endometrium an Tag 4 pc mit versus ohne Blastozysten zeigte, war die Expression von Egr1, PtgER1 und Igfbp5 im Blastozystenfreien Endometrium sogar höher als in dem mit Blastozystenkontakt. Auch im weiteren Verlauf der Schwangerschaft zeigte sich bis 6 dpc eine signifikant geringere Expression

der Gene *Ctgf*, *Egr1*, *PtgER1* und *Igfbp5* im Endometrium mit Blastozystenkontakt. Möglicherweise liegt hier eine hormonell gesteuerte Hochregulation vor, die im schwangeren Uterushorn durch die Blastozyste gehemmt wird. Die Gene *Ctgf*, *PtgER1* und *Igfbp5* wurden dabei bereits in der Literatur im Zusammenhang mit der Implantationsreaktion bei Nagern beschrieben.

Connective Tissue Growth Factor (*Ctgf*, auch *CCN2*) gehört zur Familie der CCN-Proteine. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass es während der Periimplantationsphase an Tag 1,5 bis 3,5 pc stark im Uterusepithel der Maus exprimiert wird, diese Expression fällt jedoch an Tag 4,5 der Schwangerschaft stark ab, statt dessen zeigt sich ein verstärktes Signal in der Dezidua (Surveyor et al., 1998). Eine hormonelle, Blastozysten-unabhängige Regulation im Uterusepithel wurde zudem von Rageh et al. (2001) beschrieben. In den hier beschriebenen Ergebnissen zeigt sich jedoch eine deutlich reduzierte Genexpression an Tag 6 pc im Blastozysten-haltigen im Vergleich zum kontralateralen Uterushorn. Hier sind weiterführende Analysen mittels Immunhistochemie oder in-situ-Hybridisierung notwendig, um zu untersuchen, ob es in der Ratte, im Gegensatz zur Maus, nicht zu einer Induktion von *Ctgf* in der Dezidua kommt.

Prostaglandin E Rezeptor 1 (*PtgER1*) ist einer der vier bekannten G-Proteingekoppelten Rezeptoren für Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Prostaglandine sind notwendig für Implantation und Dezidualisierung, wobei bei der Ratte vor allem Prostaglandin E und F in der Implantationskammer zu finden sind (Kennedy, 1977). Für die Prostaglandin E Rezeptoren 1 bis 4 sind unterschiedliche Expressionsmuster während der Implantation gefunden worden. Während *PtgER2* überwiegend im luminalen Epithel pseudogravidier Ratten gefunden wurde, wird *PtgER3* im glandulären Epithel des Endometriums und *PtgER4* im subepithelialen endometrialen Stroma exprimiert (Papay und Kennedy, 2000). *PtgER1*-mRNA hingegen konnte bei pseudogravidien Ratten an Tag 4 bis 6 pc nicht nachweisen werden (Papay und Kennedy, 2000), soll aber im weiteren Verlauf der Schwangerschaft die Trophoblastmigration fördern (Nicola et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Expression von *PtgER1* im Endometrium während der Periimplantationsphase, wobei die Blastozyste eher hemmenden Einfluss auf die Genexpression hat. Dies widerspricht den Ergebnissen von Papay und Kennedy (2000), da diese in der Pseudogravidität, die dem kontralateralen Uterushorn ohne Blastozysten nahe kommt, keine *PtgER1*-mRNA nachweisen konnten. Andere Abweichungen bei der Pseudogravidität könnten jedoch ursächlich sein.

Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5 (*Igfbp5*) reguliert die Verfügbarkeit von Insulin-like Growth Factor (IGF) an den IGF-Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass *Igfbp5* durch Östrogen im Ratten-Endometrium via einer IGF-I Hochregulation supprimiert wird (Huynh, 1998, Murphy et al., 1987). Im humanen Endometrium lässt sich *Igfbp5* besonders in der Proliferationsphase finden, wobei es in der Sekretionsphase

durch Igfbp1-4 und 6 abgelöst wird (Zhou et al., 1994). Vorliegende Ergebnisse zeigen bei der Ratte während der Periimplantationsphase eine erniedrigte Igfbp5-Expression bei Blastozystenkontakt.

Early Growth Response 1 (Egr1) ist ein kernständiger Zink-abhängiger Transkriptionsfaktor, welcher durch Serum und Wachstumsfaktoren induziert wird (Cao et al., 1990) und so eine Rolle in Zellproliferation und -differenzierung spielt (Jain et al., 1996). Er ist ein Hypoxie- und Stress-induzierter Faktor, welcher in der Folge als Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene reguliert (Khachigian, 2007). Im humanen endometrialen Stroma konnten während des Menstruationszyklus nur geringe Konzentrationen von Egr1 nachgewiesen werden, wobei es dennoch eine Rolle in der Progesteron-regulierten Expression von tissue factor (TF) im endometrialen Stroma spielen soll (Krikun et al., 2000). Vorliegende Arbeit zeigt bei der Ratte eine erhöhte Genexpression im Endometrium ab Tag 4 pc, welche jedoch bei Anwesenheit der Blastozyste supprimiert wird.

CREM (cAMP Response-Element Modulator Protein) ist ein cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor der ATF-Subfamilie, welcher durch Phosphorylierung durch die cAMP-aktivierte Proteinkinase AMPK in seiner Transkriptions-induzierenden Wirkung verstärkt wird (Thomson et al., 2008). Gellersen et al. (1997) untersuchten das Expressionsmuster von CREM in humanen endometrialen Stromazellen. Im Vergleich zu undifferenzierten Stromazellen zeigten die Zellen nach cAMP-getriggelter Dezidualisierung jedoch keinen Expressionsunterschied. Auch im Vergleich zwischen schwangerem und nicht-schwangerem humanem Myometriumgewebe konnten Bailey et al. (2000) keinen Expressionsunterschied feststellen. Die vorliegende Arbeit ergänzt die bereits beschriebenen Expressionsmuster von CREM noch durch die Expressionsanalyse im Endometrium der Ratte. Auch hierbei konnte kein Expressionsunterschied zwischen schwangerem (mit Blastozystenkontakt) und nicht-schwangerem (ohne Blastozystenkontakt) Endometrium nachgewiesen werden. Die Expressionsrate von CREM ist somit während der Schwangerschaft im Uterusgewebe in allen Untersuchungen stabil und keiner Regulation, weder durch Hormone noch durch die Blastozyste oder den Embryo, ausgesetzt.

Profilin2 (Pfn2) ist ein Aktin-bindendes Protein, welches somit die Zytoskelettdynamik mitreguliert (Carlsson et al., 1977). In Nervenzellen hemmt Profilin2 die Endozytose (Gareus et al., 2006) und reguliert die Ausschüttung von Neurotransmittern. Durch eine erhöhte Glutamat-Ausschüttung kommt es zur Hyperstimulation der Basalganglien und zur synaptischen Hyperexzitabilität (Boyl et al., 2007). Im Endometrium wurde Profilin2 bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit zeigt sich hier eine leicht ansteigende Genexpression während der Implantationsphase von Tag 3 auf Tag 4 pc, jedoch keine Regulation durch die Blastozyste.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit eine Blastozysten-vermittelte Expressions-

steigerung der Transkriptionsfaktoren Atf3, Nr4a3, Nr4a1, Msg1 und geringfügig auch Foxo1 im Endometrium gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde die gesteigerte Expression von Ctgf, Egr1, PtgER1 und Igfbp5 durch die Blastozyste inhibiert. Alle Versuche wurden auch mit dem bereits bekannten Gen Cx26 durchgeführt, was bei durchweg übereinstimmenden Ergebnissen mit der Literatur die Aussagekraft der hier gefundenen Ergebnisse bestärkt. Somit könnten die Transkriptionsfaktoren Atf3, Nr4a3, Nr4a1, Msg1 und Foxo1 als frühe endometriale Reaktion an den durch die Blastozyste induzierten Signalkaskaden bei der Implantation beteiligt sein.

Weiterführende Untersuchungen zum Expressionsschema und zur Lokalisation, sowie Beobachtungen bei Ausfall dieser Gene sind jedoch zur genaueren Analyse der Funktion dieser Faktoren für die Implantationsreaktion noch notwendig.

### 5.2 Die Genexpression im zyklischen humanen Endometrium

Wie in 5.1 beschrieben konnte hier gezeigt werden, dass die Transkription der Gene Atf3, Msg1, Nr4a3, Nr4a1 und Foxo1 im Endometrium der Ratte durch die Blastozyste erhöht wird. Um die Relevanz dieser Ergebnisse für den Menschen zu untersuchen, wurde hier die Genexpression auch in humanem Endometrium untersucht.

Dabei konnte in semiquantitativen PCR-Analysen eine Genexpression für ATF3, NR4A3, NR4A1 und FOXO1 im Endometrium sowohl in der Proliferationsphase als auch in der Sekretionsphase des humanen Menstruationszyklus nachgewiesen werden, wogegen MSG1 nicht exprimiert wird. Die in der Literatur beschriebene MSG1-Expression in Östrogen-Rezeptor positivem Brustkrebsgewebe (McBryan et al., 2007) konnte als Positivkontrolle bestätigt werden. Somit ist eine Relevanz von MSG1 während des humanen Menstruationszyklus nicht zu erwarten. Eine Geninduktion durch die Blastozyste wie bei der Ratte kann anhand der vorliegenden Versuche jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für ATF3, NR4A3, NR4A1 und FOXO1 wurde in quantitativen Real-Time-PCR-Analysen der Expressionsverlauf während des Menstruationszyklus untersucht. Dabei zeigten ATF3, NR4A3 und NR4A1 eine tendenziell höhere Genexpression in der Sekretionsphase im Vergleich zur Proliferationsphase. Diese war signifikant für NR4A3. Da jedoch in beiden Menstruationsphasen unterschiedliche Individuen untersucht wurden, konnte hier kein direkter Paarvergleich vorgenommen werden. Diese drei Gene wurden bisher in der Literatur in humanem Endometrium nicht beschrieben, sodass diese Arbeit erstmals eine Bedeutung für den Menstruationszyklus und möglicherweise die Implantation des Embryos beim Menschen vermuten lässt. Untersuchungen der intraindividuellen Expressionsverläufe sollten jedoch die Relevanz für den Menschen genauer analysieren.

FOXO1 zeigte in dieser Arbeit keinen Expressionsunterschied zwischen Proliferations-

und Sekretionsphase. Mirkin et al. (2005) zeigten zuvor in Mikroarray-Analysen an humanem Endometrium, dass FOXO1 während der rezeptiven Phase (mittlere Sekretionsphase, Zyklustag 21) signifikant hochreguliert wird im Vergleich zur prä-rezeptiven Phase (frühe Sekretionsphase, Zyklustag 16). In der hier vorliegenden Arbeit wurde lediglich die mittlere bis späte Sekretionsphase (Zyklustag 23–30) untersucht, so dass die vorliegenden Ergebnisse unabhängig von den Ergebnissen von Mirkin et al. (2005) gesehen werden müssen.

Bereits bekannt ist die Expression von CX26 in humanem Endometrium. Jahn et al. (1995) untersuchten die hormonabhängige Expressionsregulation von CX26 während des Menstruationszyklus. Es wird dabei in der östrogendominanten späten Proliferationsphase im Epithel stark exprimiert, während die Expression in der progesterondominanten Sekretionsphase wieder verschwindet. In der frühen Proliferationsphase kann CX26 gar nicht nachgewiesen werden. Die hormonelle Regulation stimmt somit beim Menschen mit der Regulation bei der Ratte überein, sodass auch eine Regulation von CX26 durch die Blastozyste wie bei der Ratte beim Menschen möglich ist. Da auch die Transkriptionsfaktoren ATF3, NR4A1, NR4A3 und FOXO1 im humanen Endometrium – insbesondere in der rezeptiven Sekretionsphase – exprimiert werden, ist auch hier eine Blastozysten-regulierte Induktion denkbar.

Die Untersuchungen am Endometrium der Ratte dienten in dieser Arbeit als Tiermodell für die Vorgänge während der frühen Implantationsphase, da Untersuchungen am menschlichen Endometrium selber methodisch sehr begrenzt sind. Bisher konnten durch Untersuchungen bei Infertilität lediglich Vermutungen aufgestellt werden, welche Gene beim Menschen bei der Implantation eine Schlüsselrolle spielen könnten. Für LIF und IL-11 wurde bereits eine Assoziation zur Infertilität vermutet. Bei Patientinnen mit Infertilität bei Endometriose konnte eine signifikant niedrigere Genexpression für LIF und IL-11 im glandulären Epithel festgestellt werden (Dimitriadis et al., 2006), vergleichbar mit einer fehlerhaften Implantation, die bei Mäusen bei Fehlen von LIF nachgewiesen werden konnte (Stewart et al., 1992).

Weiter konnte der hormonelle Einfluss auf das Endometrium während des Menstruationszyklus molekularbiologisch betrachtet werden. Fünf unterschiedliche Microarray-Studien untersuchten dazu das Genexpressionsprofil menschlichen Endometriums während der rezeptiven Phase (Carson et al., 2002, Kao et al., 2002, Borthwick et al., 2003, Riesewijk et al., 2003, Mirkin et al., 2005). Carson et al. (2002) untersuchten dabei die Genexpression in der frühen (prä-rezeptiven) und der mittleren (rezeptiven) Sekretionsphase und zeigten dabei 323 signifikant induzierte Gene und 370 supprimierte Gene auf. Kao et al. (2002) hingegen verglichen die mittlere (rezeptive) Sekretionsphase mit der späten Proliferationsphase und fanden 156 hochregulierte und 377 herunterregulierte Gene in der rezeptiven Phase. Borthwick et al. (2003) wählten den selben

Untersuchungsansatz wie Kao et al., betrachteten jedoch pro Phase nur die 200 am stärksten exprimierten Gene und suchten darunter im Verlauf regulierte Gene. Riesewijk et al. (2003) sowie Mirkin et al. (2005) verglichen wiederum die Genexpressionsrate zwischen früher (prärezeptiver) und mittlerer (rezeptiver) Sekretionsphase. Riesewijk et al. beschrieben 153 hochregulierte und 58 herunterregulierte Gene in der rezeptiven Phase, von denen sie die zwei hochregulierten Gene GPx-3 und SLC1A1 zusätzlich mittels in-situ Hybridisierung im luminalen bzw. glandulären Epithel lokalisieren konnten. Für Claudin 4 zeigten sie im genaueren Verlauf des Menstruationszyklus mittels Real-Time PCR einen signifikanten Expressionspeak während der rezeptiven Phase auf, während GPx-3 und SLC1A1 bis zur späten Sekretionsphase weiter ansteigen. Mirken et al. hingegen fanden 49 hoch- und 58 herunterregulierte Gene. Die hochregulierten Gene ANXA4, SSP1 und FOXO1 sowie die herunterregulierten Gene PIP5K1B und MSX1 verifizierten sie zusätzlich mittels Real-Time PCR. Beim Vergleich aller fünf Microarray-Studien fällt eine relativ geringe Übereinstimmung der Ergebnisse trotz sehr ähnlicher Versuchsmethoden auf. Unter den in der rezeptiven Phase hochregulierten Genen konnten nur die Gene CD55, MAOA, GADD45A, IL15 und MAP3K5 in vier der fünf Studien nachgewiesen werden und nur ein einziges Gen, Osteopontin (SPP1), wurde in allen fünf Studien beschrieben. Osteopontin konnte bereits zuvor von Apparao et al. (2001) sowie von von Wolff et al. (2001) in humanen endometrialen Epithelzellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine signifikante Induktion von Osteopontin in der mittleren und späten Sekretionsphase des Menstruationszyklus (Apparao et al., 2001) und somit während des zeitlichen Implantationsfensters (von Wolff et al., 2001). Zusätzlich konnten von Wolff et al. (2001) eine erhöhte Osteopontin-Expression im Uterussekret sowie zeitgleich eine Induktion des Osteopontin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im humanen luminalen Epithel nachweisen. Somit könnte die Bindung von sekretiertem Osteopontin an seinen Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Implantation des Embryos spielen, wie es auch für die Maus in 5.1 beschrieben wurde (White et al., 2006).

Kürzlich ergänzten Tapia et al. (2008) die fünf Microarray-Studien durch endometriale Transkriptionsprofile von Frauen mit wiederholtem Implantationsmisserfolg im Vergleich zu Frauen mit mindestens einer erfolgreichen Schwangerschaft. Dabei fanden sie 16 Gene, die in der Studiengruppe eine abweichende Expression zeigten. C4BP, PAEP und MAOA waren hier signifikant weniger exprimiert. Alle drei Gene waren bereits bei Kao et al. (2002), Borthwick et al. (2003) und Riesewijk et al. (2003), MAOA auch bei Mirkin et al. (2005) beschrieben als in der rezeptiven Phase hochreguliert. Eine entscheidende Rolle dieser Gene bei der Implantation liegt somit nahe.

Alle beschriebenen Studien betrachteten jedoch nicht den direkten Einfluss der Blastozyste auf das humane Endometrium. Da beim Menschen die Interaktion der Blastozyste mit dem Endometrium nicht in-vivo untersucht werden kann, arbeiteten Simon

et al. (1997) mit einem in-vitro Modell. Sie kultivierten humane endometriale Epithelzellen mit aktiven sowie inaktiven Blastozysten. Dabei induzierten aktive Blastozysten  $\beta_3$ -Integrin in den endometrialen Epithelzellen, vermittelt durch embryonales IL-1.  $\beta_3$ -Integrin ist somit ein frühes Gen, welches in-vitro durch die Blastozyste im Epithel des Endometriums hochreguliert wird. Bei der Maus konnte auch in-vivo ein Expressionsanstieg von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im rezeptiven Endometrium nachgewiesen werden (Apparao et al. 2001), sodass auch hier Übereinstimmungen während der Implantation in beiden Spezies deutlich werden.

Die Relevanz des Nagermodells lässt sich durch die hier dargestellten Parallelen zum Menschen am Beispiel von FOXO1, CX26, LIF, Osteopontin und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin für die Untersuchung der Vorgänge während der Implantation bekräftigen und ermöglicht so weitere Einsichten in die komplexen Signalkaskaden, die eine erfolgreiche Implantation bedingen. Weiter bestärken ließen sich die hier gewonnenen Erkenntnisse zu den Transkriptionsfaktoren ATF3, NR4A1, NR4A3, FOXO1 und MSG1 durch eine Überprüfung der Ergebnisse in einem humanen in-vitro-Modell wie dem von Simon et al. (1997) um einen möglichen Einfluss der Blastozyste auf die Transkription dieser Gene auch beim Menschen überprüfen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Blastozysten-regulierte Genexpression im rezeptiven Endometrium der Ratte während der Periimplantationsphase.

Die Implantation ist abhängig von einer genauen Synchronisation und einer funktionierenden Kommunikation zwischen der Zygote und dem Endometrium. Dabei gilt das luminale Epithel als „gate keeper“ für die erfolgreiche Implantation des Embryos. Sowohl der Einfluss der ovariellen Steroidhormone als auch der Signale der Blastozyste beeinflussen die Genexpression des Epithels und des darunterliegenden endometrialen Stromas.

Bisher sind wenige Gene bekannt, die bereits vor der Trophoblastinvasion durch die Blastozyste im Uterusepithel induziert werden. Um dies näher zu untersuchen wurden in dieser Arbeit Tubenligaturexperimente an Ratten durchgeführt, wobei eine Tuba uterina durchtrennt wurde und somit nur noch das kontralaterale Uterushorn für Blastozysten erreichbar war. Somit konnte spezifisch der Einfluss der Blastozysten auf das Uterusepithel bei gleichem Hormoneinfluss untersucht werden. Mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion konnte an Tag 4 nach Befruchtung, d.h. zu einem Zeitpunkt an dem die Blastozysten das Uteruslumen erreicht haben, die Trophoblastinvasion aber nicht begonnen hat, für die Gene *Cx26*, *Atf3*, *Msg1*, *Nr4a1*, *Nr4a3* und *Foxo1* eine Steigerung der Genexpression durch die Blastozyste im Endometrium nachgewiesen werden, während für *Egr1*, *PtgER1* und *Igfbp5* eine Suppression durch die Blastozyste und für *Crem*, *Pfn2* und *Ctgf* kein Einfluss der Blastozyste gezeigt werden konnte.

Somit sind *Cx26*, *Atf3*, *Msg1*, *Nr4a1*, *Nr4a3* und *Foxo1* frühe Faktoren, deren Expression durch die Blastozyste im Endometrium der Ratte gesteigert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von *CX26*, *ATF3*, *NR4A1*, *NR4A3* und *FOXO1* auch in humanem Endometrium nachgewiesen werden. Möglicherweise könnte die Expression dieser Gene auch beim Menschen durch die Blastozyste beeinflusst werden und somit eine Relevanz für die Implantation des humanen Embryos haben.

## 7 Summary

In the current study, blastocyst-regulated gene expression is analysed in the receptive endometrium of the rat during early implantation. Embryo implantation depends on a precise synchronisation and functional communication between the embryo and the endometrium. Thereby the luminal epithelium works as a “gate keeper“ for successful implantation. Ovarian steroid hormones as well as signals by the blastocyst influence the gene expression in the epithelium as well as in the underlying stroma during the implantation process.

Up to now only few genes are known to be induced by the blastocyst early on day 4 of pregnancy in the uterine epithelium. To extend our knowledge in regard to blastocyst-mediated gene regulation during the very first steps of embryo implantation, unilateral tubal ligation has been performed in rats, leading to pregnancy only in one uterine horn. The endometrium of the uterine horn containing blastocysts and of the contralateral uterine horn without blastocysts has been analysed on day 4 after conception, allowing to distinguish hormonal effects from blastocyst-mediated effects.

On day 4 after conception a specific upregulation in the presence of blastocysts could be shown for the transcription of the genes *Cx26*, *Atf3*, *Msg1*, *Nr4a1*, *Nr4a3* and *Foxo1* while transcription of *Egr1*, *PtgER1* and *Igfbp5* was suppressed and transcription of *Crem*, *Pfn2* and *Ctgf* was not influenced.

Consequently, *Cx26*, *Atf3*, *Msg1*, *Nr4a1*, *Nr4a3* and *Foxo1* are early genes upregulated by the blastocyst in the receptive endometrium of the rat. In addition, it could be shown that *CX26*, *ATF3*, *NR4A1*, *NR4A3* and *FOXO1* are also expressed in human endometrium during the menstrual cycle. Thus expression of these genes could also be upregulated by the embryo in the human endometrium during early implantation process and could play a role for successful implantation of the human embryo.

## Literatur

1. Apparao, K.B.C., Murray, M.J., Fritz, M.A., Meyer, W.R., Chambers, A.F., Truong, P.R. und Lessey, B.A. (2001): Osteopontin and its receptor  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4991–5000.
2. Bailey, J., Sparey, C., Phillips, R.J., Gilmore, K., Robson, S.C., Dunlop, W. und Europe-Finner, G.N. (2000): Expression of the cyclic AMP-dependent transcription factors, CREB, CREM and ATF2, in the human myometrium during pregnancy and labor. *Mol Hum Reprod* 6, 648–660.
3. Borthwick, J.M., Charnock-Jones, D.S., Tom, B.D., Hull, M.L., Teirney, R., Phillips, S.C. und Smith, S.K. (2003): Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 9, 19–33.
4. Boyl, P.P., Di Nardo, A., Mulle, C., Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Mele, A., Kneussel, M., Costantini, V., Perlas, E., Massimi, M., Vara, H., Giustetto, M. und Witke, W. (2007): Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior. *EMBO J* 26, 2991–3002.
5. Campbell, E.A., O’Hara, L., Catalano, R.D., Sharkey, A.M., Freeman, T.C. und Johnson, M.H. (2006): Temporal expression profiling of the uterine luminal epithelium of the pseudo-pregnant mouse suggests receptivity to the fertilized egg is associated with complex transcriptional changes. *Hum Reprod* 21, 2495–2513.
6. Cao, X.M., Koski, R.A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C.F., Gaffney, R., Hay, R.V. und Sukhatme, V.P. (1990): Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol* 10, 1931–1939.
7. Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F. und Lindberg, U. (1977): Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 115, 465–483.
8. Carson, D.D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M.C., Vernon, M., Yuan, L., Fritz, M.A. und Lessey, B. (2002): Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 8, 871–879.

9. **Chen, Y., Ni, H., Ma, X.-H., Hu, S.-J., Luan, L.-M., Ren, G., Zhao, Y.-C., Li, S.-J., Diao, H.-L., Xu, X., Zhao, Z.-A. und Yang, Z.-M. (2006):** Global analysis of differential luminal epithelial gene expression at mouse implantation sites. *J Mol Endocrinol* 37, 147–161.
10. **Cheng, L.E., Chan, R.K., Cado, D. und Winoto, A. (1997):** Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 16, 1865–1875.
11. **Christian, M., Zhang, X., Schneider-Merck, T., Unterman, T.G., Gellersen, B., White, J.O. und Brosens, J.J. (2002):** Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* 277, 20825–20832.
12. **Cochrane, R.L. und Meyer, R.K. (1957):** Delayed nidation in the rat induced by progesterone. *Proc Soc Exp Biol and Med* 96, 155–159.
13. **Cong, J., Diao, H.-L., Zhao, Y.-C., Ni, H., Yan, Y.-Q. und Yang, Z.-M. (2006):** Differential expression and regulation of cyclooxygenases, prostaglandin E synthases and prostacyclin synthase in rat uterus during the peri-implantation period. *Reproduction* 131, 139–151.
14. **Das, S.K., Chakraborty, I., Paria, B.C., Wang, X.N., Plowman, G. und Dey, S.K. (1995):** Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol* 9, 691–705.
15. **Das, S.K., Das, N., Wang, J., Lim, H., Schryver, B., Plowman, G.D. und Dey, S.K. (1997):** Expression of betacellulin and epiregulin genes in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the "window" of implantation. *Dev Biol* 190, 178–190.
16. **Das, S.K., Wang, X.N., Paria, B.C., Damm, D., Abraham, J.A., Klagsbrun, M., Andrews, G.K. und Dey, S.K. (1994):** Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120, 1071–1083.
17. **Deutsches IVF-Register:** D.I.R.-Jahrbuch 2007. Online-Publikation, URL: [http://www.meb.uni-bonn.de/frauen/DIR\\_downloads/dirjahrbuch2007.pdf](http://www.meb.uni-bonn.de/frauen/DIR_downloads/dirjahrbuch2007.pdf).

18. **DeYoung, R.A., Baker, J.C., Cado, D. und Winoto, A. (2003):** The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *J Biol Chem* 278, 47104–47109.
19. **Dimitriadis, E., Stoikos, C., Stafford-Bell, M., Clark, I., Paiva, P., Kovacs, G. und Salamonsen, L.A. (2006):** Interleukin-11, IL-11 receptoralpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* 69, 53–64.
20. **Enders, A.C. und Schlafke, S. (1967):** A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat* 120, 185–226.
21. **Gareus, R., Di Nardo, A., Rybin, V. und Witke, W. (2006):** Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin1. *J Biol Chem* 281, 2803–2811.
22. **Gellersen, B., Kempf, R. und Telgmann, R. (1997):** Human endometrial stromal cells express novel isoforms of the transcriptional modulator CREM and up-regulate ICER in the course of decidualization. *Mol Endocrinol* 11, 97–113.
23. **Grümmer, R., Chwalisz, K., Mulholland, J., Traub, O. und Winterhager, E. (1994):** Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones. *Biol Reprod* 51, 1109–1116.
24. **Grümmer, R., Hewitt, S.W., Traub, O., Korach, K.S. und Winterhager, E. (2004):** Different regulatory pathways of endometrial connexin expression: preimplantation hormonal-mediated pathway versus embryo implantation-initiated pathway. *Biol Reprod* 71, 273–281.
25. **Grümmer, R., Traub, O. und Winterhager, E. (1999):** Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium. *Endocrinology* 140, 2509–2516.
26. **Hai, T. und Hartman, M.G. (2001):** The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1–11.
27. **Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E. und Sivaprasad, U. (1999):** ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 7, 321–335.

28. **Huynh, H. (1998):** Suppression of uterine insulin-like growth factor binding protein 5 by estrogen is mediated in part by insulin-like growth factor I. *Int J Oncol* 12, 427–432.
29. **Jahn, E., Classen-Linke, I., Kusche, M., Beier, H.M., Traub, O., Grümmmer, R. und Winterhager, E. (1995):** Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 10, 2666–2670.
30. **Jain, N., Mahendran, R., Philp, R., Guy, G.R., Tan, Y.H. und Cao, X. (1996):** Casein kinase II associates with Egr-1 and acts as a negative modulator of its DNA binding and transcription activities in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 271, 13530–13536.
31. **Kao, L.C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J.P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R.N., Lessey, B.A. und Giudice, L.C. (2002):** Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143 Nr. 6, 2119–2138.
32. **Kennedy, T.G. (1977):** Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol Reprod* 16, 286–291.
33. **Kennedy, T.G., Gillio-Meina, C. und Phang, S.H. (2007):** Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction* 134, 635–643.
34. **Kennedy, T.G. und Zamecnick, J. (1978):** The concentration of 6-ketoprostaglandin F<sub>1</sub>α is markedly elevated at the site of blastocyst implantation in the rat. *Prostaglandins* 16, 599–605.
35. **Khachigian, L.M. (2006):** Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* 98, 186–191.
36. **Kim, J.J., Buzzio, O.L., Li, S. und Lu, Z. (2005):** Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol Reprod* 73, 833–839.
37. **Kim, N.K., Choi, M.J., Chung, H.M., Sohn, T.J., Hwang, S.G., Oh, D., Lee, H.H., Lee, Y.H. und Ko, J.J. (2001):** Increase expression and localization of a serine protease inhibitor, Protease Nexin-1 (PN-1), in the ovary and uterus during implantation in rat. *Thromb Res* 103, 135–142.

38. **Krikun, G., Schatz, F., Mackman, N., Guller, S., Demopoulos, R. und Lockwood, C.J. (2000):** Regulation of tissue factor gene expression in human endometrium by transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Endocrinol* 14, 393–400.
39. **Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1996):** The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381–388.
40. **Lee, S.L., Wesselschmidt, R.L., Linette, G.P., Kanagawa, O., Russel, J.H. und Milbrandt, J. (1995):** Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* 269, 532–535.
41. **Li, Q.-X., Ke, N., Sundaram, R. und Wong-Staal, F. (2006):** NR4A1, 2, 3 – an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol Histopathol* 21, 533–540.
42. **Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M. und Eldar-Geva, T. (2006):** Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 21, 3036–3043.
43. **McBryan, J., Howlin, J., Kenny, P. A., Shioda, T. und Martin, F. (2007):** ER[alpha]-CITED1 co-regulated genes expressed during pubertal mammary gland development: implications for breast cancer prognosis. *Onco-gene* 26, 6406–6419.
44. **Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J.I., Williams, S., Bocca, S. und Oehninger, S. (2005):** In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 20, 2104–2117.
45. **Murphy, LJ, Murphy, LC und Friesen, HG (1987):** Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1, 445–450.
46. **Nicola, C., Timoshenko, A.V., Dixon, S.J., Lala, P.K. und Chakraborty, C. (2005):** EP1 receptor-mediated migration of the first trimester human extravillous trophoblast: the role of intracellular calcium and calpain. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4736–4746.
47. **Papay, K.D. und Kennedy, T.G. (2000):** Characterization of temporal and cell-specific changes in transcripts for prostaglandin E2 receptors in pseudopregnant rat endometrium. *Biol Reprod* 62, 1515–1525.

48. **Paria, B.C., Lim, H., Das, S.K., Reese, J. und Dey, S.K. (2000):** Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin Cell Dev Biol* 11, 67–76.
49. **Paria, B.C., Reese, J., Das, S.K. und Dey, S.K. (2002):** Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 296, 2185–2188.
50. **Parr, E.L., Tung, H.N. und Parr, M.B. (1987):** Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 36, 211–225.
51. **Psychoyos, A. (1973):** Handbook of physiology. Endocrinology. Female Reproductive System. sect. 7, vol. II. Bethesda, MD: Am Physiol Soc.
52. **Rageh, M.A.E., Moussad, E.E.-D.A., Wilson, A.K. und Brigstock, D.R (2001):** Steroidal regulation of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) synthesis in the mouse uterus. *Mol Pathol* 54, 338–346.
53. **Reese, J., Das, S.K., Paria, B.C., Lim, H., Song, H., Matsumoto, H., Knudtson, K.L., DuBois, R.N. und Dey, S.K. (2001):** Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 276, 44137–44145.
54. **Riesewijk, A., Martin, J., Os, R. van, Horcajadas, J.A., Polman, J., Pellicer, A., Mosselman, S. und Simon, C. (2003):** Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 9, 253–264.
55. **Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Farach-Carson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., Teitelbaum, S.L. und Cheresch, D.A. (1993):** Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 268, 9901–9907.
56. **Simon, C., Gimeno, M. J., Mercader, A., O'Connor, J. E., RemohI, J., Polan, M.L. und Pellicer, An. (1997):** Embryonic regulation of integrins beta3, alpha4, and alpha1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2607–2616.
57. **Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F. und Abbondanzo, S.J. (1992):** Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76–79.

58. **Surveyor, G.A., Wilson, A.K. und Brigstock, D.R. (1998):** Localization of connective tissue growth factor during the period of embryo implantation in the mouse. *Biol Reprod* 59, 1207–1213.
59. **Tapia, A., Gangi, L.M., Zegers-Hochschild, F., Balmaceda, J., Pommer, R., Trejo, L., Pacheco, I.M., Salvatierra, A.M., Henriquez, S., Quezada, M., Vargas, M., Rios, M., Munroe, D.J., Croxatto, H.B. und Velasquez, L. (2008):** Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy. *Hum Reprod* 23, 340–351.
60. **Thomson, D. M., Herway, S. T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J. D., Barrow, J. R. und Winder, W. W. (2008):** AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* 104, 429–438.
61. **Tsai, C.-Y., Chou, C.-K., Yang, C.-W., Lai, Y.-C., Liang, C.-C., Chen, C.-M. und Tsai, T.-F. (2008):** Hurler deficiency in mice leads to female infertility caused by an implantation defect. *J Biol Chem* 283, 26302–26306.
62. **Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Ai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Yonenobu, K., Ochi, T. und Noguchi, K. (2000):** Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: a novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15, 170–182.
63. **White, F.J., Burghardt, R.C., Hu, J., Joyce, M.M., Spencer, T.E. und Johnson, G.A. (2006):** Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction* 132, 919–929.
64. **Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'Connor, J.F., Baird, D.D., Schlatterer, J.P., Canfield, R.E., Armstrong, E.G. und Nisula, B.C. (1988):** Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 28, 189–194.
65. **Winoto, A. und Littman, D.R. (2002):** Nuclear hormone receptors in T-lymphocytes. *Cell* 109 Suppl, S57–66.
66. **Winterhager, E., Grümmer, R., Jahn, E., Willecke, K. und Traub, O. (1993):** Spatial and temporal expression of connexin26 and connexin43 in rat endometrium during trophoblast invasion. *Dev Biol* 157, 399–409.

67. **Wolff, M. von, Strowitzki, T., Becker, V., Zepf, C., Tabibzadeh, S. und Thaler, C.J. (2001):** Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the implantation window". *Fertil Steril* 76, 775–781.
68. **Wu, Q., Li, Y., Liu, R., Agadir, A., Lee, M.O., Liu, Y. und Zhang, X. (1997):** Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 an COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J* 16, 1656–1669.
69. **Xiao, L.-J., Yuan, J.-X., Song, X.-X., Li, Y.-C., Hu, Z.-Y. und Liu, Y.-X. (2006):** Expression and regulation of stanniocalcin 1 and 2 in rat uterus during embryo implantation and decidualization. *Reproduction* 131, 1137–1149.
70. **Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K.R., Sun, H., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K.J., Brown, M. und Shioda, T. (2001):** Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. *Genes Dev* 15, 2598–2612.
71. **Zhang, Y., Peng, S., Kuang, H., Chen, Q., Liu, S., Zhang, L. und Duan, E. (2009):** Expression and regulation of Dickkopf2 during periimplantation in mice. *J Reprod Dev* 55, 17–22.
72. **Zhou, J., Dsupin, B.A., Giudice, L.C. und Bondy, C.A. (1994):** Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1723–1734.

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu g$	Mikrogramm
$\mu l$	Mikroliter
actb	$\beta$ -Aktin
ANXA4	Annexin A4
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Atf3	Activating Transcription Factor 3
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C4BP	Complement Component 4 Binding Protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cox2	Cyclooxygenase 2
CREM	cAMP Response-Element Modulator Protein
Ctgf	Connective tissue growth factor
Cx26	Connexin26
Cx43	Connexin43
Cyr61	Cysteine-rich Protein 61
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dkk2	Dickkopf2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'Triphosphat
dpc	days past coitum = Tage nach der Befruchtung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
Egr1	Early Growth Response 1
fg	Femtogramm
Foxo1	Forkhead Box O1
GADD45A	Growth Arrest and DNA-damage-inducible Alpha
GPx-3	Glutathione Peroxidase 3
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like Growth Factor
Hurp	Hepatoma Up-regulated Protein
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
IGF	Insulin-like Growth Factor
Igfbp	Insuline-like Growth Factor Binding Protein

IL	Interleukin
IVF	in-vitro Fertilisation
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
M	Molar, Mol/Liter
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MAOA	Monoaminooxidase A
MAP3K5	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase 5
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
Msg1	Melanocyte-specific Gene 1
MSX1	Msh Homeobox 1
nm	Nanometer
Nr4a1/3	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1/3
PAEP	Progesterone-associated Endometrial Protein
pc	post coitum = nach der Befruchtung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfn2	Profilin 2
pg	Pikogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PIP5K1B	Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinase, Type 1, Beta
pmol	Pikomol
PtgER	Prostaglandin E Rezeptor
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SEM	Standard Error of the Mean
siRNA	Small Interfering RNA
SLC1A1	Solute Carrier Family 1 Member 1
Spp1	Osteopontin
SSP1	Short Spindle 1
STC	Stanniocalcin
U	Unit

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit fachlich und privat unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer und auch Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Überlassung des interessanten Doktorarbeitsthemas sowie für die stetige fachliche Beratung während meiner Arbeit. Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer danke ich für die intensive Betreuung und Unterstützung, unter der mir die Durchführung dieser Arbeit sehr viel Freude bereitet hat. Des weiteren bedanke ich mich für das Ermöglichen der zweimaligen Teilnahme an der International Conference on the Female Reproductive Tract am Frauenchiemsee sowie der Teilnahme an der 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Grümmer und Winterhager für das fröhliche und kollegiale Arbeitsklima und für die uneingeschränkte fachliche sowie seelische Unterstützung. Besonders bedanke ich mich für die stets vorhandene fachliche Hilfe von Betina van Fürden, Isabella Gashaw, Alexandra Gellhaus, Tina Gravendiek, Jessica Wagener und Nadine Wolf sowie den fachlichen und privaten Austausch mit meinen Mitdoktoranden Linda Söhngen, sowie Stephan Barzik, Markus Bienek und Ann-Kathrin Bittner.

Gabriele Sehn, Kathrin Kazuschke, Melanie Gemein und Ewa Kusch danke ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Bei meinen guten Freunden möchte ich mich bedanken für die seelische und moralische Unterstützung sowie die motivierenden Gespräche während der Durchführung meiner Doktorarbeit. Bei den Teilnehmern der CdE-Seminare bedanke ich mich für die fruchtbaren kritischen interdisziplinären Diskussionen und insbesondere bei Christoph Müssel für viele hilfreiche Tipps zur Verwendung von  $\LaTeX$  für die Doktorarbeit.

Der größte Dank gilt hier meiner ganzen Familie sowie meinem Freund Christoph Müller, die mich stets in meinen Entscheidungen unterstützt haben, mir motivierend und auch mit Geduld zur Seite standen und mir Tag und Nacht die nötige seelische und moralische Unterstützung gaben.

Die vorliegende Arbeit wurde durch das IFORES-Doktorandenstipendium gefördert.