

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

**Expression von Angiopoietin-1 und  
Angiopoietin-2 im ektopen Endometrium auf der  
Chorioallantoismembran**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität zu Lübeck  
- aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von  
**Merle Drenkhahn**  
aus Bad Oldesloe

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Eduard Malik

2. Berichterstatter: Prof. em. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Kühnel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.03.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungen und Einheiten.....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Endometriose.....	8
1.2 Angiopoietine .....	10
1.3 CAM-Modell .....	15
1.4 Fragestellung .....	16
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Materialien .....	17
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien.....	17
2.1.2 Enzyme und Proteine .....	17
2.1.3 Geräte und sonstige Materialien.....	17
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	18
2.1.5 Primer/Oligonukleotide .....	19
2.1.6 DNA-Längenstandard .....	19
2.2 Extraktion der Gesamt-RNA .....	20
2.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen .....	20
2.4 Reverse Transkription.....	20
2.5 Qualitative PCR .....	21

2.6	Quantitative PCR .....	22
2.6.1	Herstellung der Kompetitoren .....	22
2.6.2	Kompetitive PCR .....	24
2.6.3	Konzentrationsbestimmung der mRNA .....	25
2.7	Gelelektrophorese.....	25
2.8	Verdau mit Restriktionsenzymen .....	25
2.9	Immunhistochemie (IHC) .....	25
2.10	Patientinnen.....	27
2.11	Präparation des Gewebes .....	27
2.12	Diagnosestellung .....	28
2.13	Kultivierung des Gewebes (CAM-Modell) .....	28
2.14	Statistische Auswertung.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Etablierung eines quantitativen Nachweises für Ang1 und Ang2.....	31
3.1.1	Optimierung der PCR für Ang1 und Ang2 .....	31
3.1.2	Herstellung der internen Standards als Kompetitoren .....	34
3.2	mRNA-Expression von Ang1 und Ang2.....	35
3.3	Proteinexpression von Ang1 und Ang2.....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>66</b>

7.1	Danksagungen.....	66
7.2	Lebenslauf .....	67
7.3	Veröffentlichungen/Vorträge .....	68

## Abkürzungen und Einheiten

% (v/v)	Volumenanteil
% (w/w)	Gewichtsanteil
Abb.	Abbildung
amol	Attomol ( $10^{-18}$ Mol)
Ang	Angiopoietin
bp	Basenpaare
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
CAM	Chorioallantoismembran
cDNA	komplementäre DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
fg	Femtogramm ( $10^{-15}$ Gramm)
fmol	Femtomol ( $10^{-15}$ Mol)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GnRH	Gonadoliberin
h	Stunden
HCG	menschliches Choriongonadotropin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
min	Minuten
$\mu$ l	Mikroliter ( $10^{-6}$ Liter)
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ Liter)
$\mu$ m	Mikrometer ( $10^{-6}$ Meter)
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ Gramm)
nmol	Nanomol ( $10^{-9}$ Mol)

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	aus Plättchen stammender Wachstumsfaktor
pmol	Pikomol ( $10^{-12}$ Mol)
Rantes	„Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit für Enzym-Aktivität
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Endometriose

Als Endometriose bezeichnet man das Auftreten von Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle, das eutopem Endometrium morphologisch und funktionell ähnlich ist. Dies führt bei den betroffenen Patientinnen zu Beschwerden wie Dysmenorrhoe, Dyspareunie, chronischen Unterbauchschmerzen und Sterilität. Die Endometriose stellt eine der häufigsten gutartigen gynäkologischen Erkrankungen dar. Die Angaben über ihre Prävalenz schwanken zwischen 1% und 18% bei Frauen, die auf laparoskopischem Wege sterilisiert wurden (Hasson 1976; Moen 1987; Kirshon und Poindexter 1988). Bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch steigt die Prävalenz auf 20-71% (Martin et al. 1989; Cornillie et al. 1990; Klein und Olive 1993). Die Lokalisation der Endometriose beschränkt sich meist auf Herde im kleinen Becken, seltener kommt es zu extraabdominalem Auftreten. Etwa 70% der endometriotischen Läsionen weisen Hormonrezeptoren für Östradiol und Progesteron auf und sind daher ähnlich dem eutopem Endometrium physiologischen zyklischen Änderungen unterworfen (Schweppe 1989). Im Mittelpunkt der Behandlung stehen einerseits endokrine Therapieprinzipien, mit denen die ovarielle Östrogensynthese supprimiert werden soll z. B. durch GnRH-Agonisten, Gestagene oder Danazol. Andererseits werden ablativ Verfahren wie z. B. die pelviskopische Sanierung angewandt (Schweppe 1995). Die Rezidivraten sind allerdings hoch: 20-40% innerhalb von fünf Jahren nach konservativer Therapie (Schweppe 1995). Weitere Untersuchungen für die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten sind deshalb nötig.

Die Pathogenese der Endometriose ist nicht vollständig geklärt. Verschiedene Theorien werden zur Erklärung ihrer Entstehung herangezogen. Die Metaplasie-Theorie erklärt die Entwicklung von Endometrioseherden mit der metaplastischen Veränderung von pluripotentem Coelomepithel (Meyer 1919) bzw. Epithel der Müller-Gänge (Novak 1931). Die Entstehung von extra-abdominellen Herden wird durch eine diskontinuierliche Aussaat der Endometriose über Lymph- und Blutgefäße erklärt (Javert 1949). Am meisten



anerkannt ist jedoch die Transplantationstheorie, die auf Sampsons Hypothese der retrograden Menstruation gründet (Sampson 1927). Danach gelangen Endometriumfragmente während der Menstruation retrograd durch die Tuben in die Peritonealhöhle. Die Implantation dieser Fragmente soll zur Ausbildung einer Endometriose führen. Zum Zeitpunkt der Menstruation sind bei 90% aller Frauen mit durchgängigen Tuben vitale Endometriumfragmente in der Peritonealhöhle nachweisbar (Halme et al. 1984). Davon leiden allerdings nicht alle an Endometriose. Welche Faktoren eine Rolle dabei spielen, ob bei einer Frau nur Endometriumfragmente in der Peritonealhöhle nachweisbar sind oder ob es auch zur Entwicklung von Endometrioseherden kommt, ist zur Zeit Gegenstand der Forschung.

Nisolle und Donnez postulierten ein Modell zur Histogenese der Endometriose, das auf der Transplantationstheorie basiert (Nisolle und Donnez 1997): Im Zuge der retrograden Menstruation gelangt überlebensfähiges Zellmaterial in die Peritonealhöhle. Die Endometriumfragmente haften am Peritoneum mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen wie Laminin, Fibronectin, Cadherinen und Integrinen (van der Linden et al. 1994; van der Linden et al. 1995; Beliard et al. 1997; Hii und Rogers 1998). Nach der Adhäsion erfolgt die lokale Degradation der Extrazellulärmatrix durch Proteinase wie die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (Kokorine et al. 1997; Sillem et al. 1998; Koks et al. 2000). Außerdem scheinen immunologische Aspekte eine Rolle zu spielen (Steele et al. 1984; Kiesel et al. 1999). Oosterlynck et al. stellten fest, dass die natürlichen Killer-(NK-)Zellen von Frauen mit Endometriose eine herabgesetzte Zytotoxizität gegenüber Endometriumzellen aufweisen (Oosterlynck et al. 1991). Alle Gewebe, deren Durchmesser das Diffusionslimit von Sauerstoff (100–200 µm) überschreitet, müssen, um zu überleben, vaskularisiert werden (Carmeliet und Jain 2000). Von herausragender Bedeutung scheint deshalb - ähnlich wie beim Wachstum eines Tumors - auch bei der Pathogenese der Endometriose die Ausbildung einer suffizienten Gefäßversorgung durch Angiogenese zu sein (Nisolle et al. 1993; Nisolle und Donnez 1997). Einer der wichtigsten und am meisten untersuchten Angiogenesefaktoren in diesem Zusammenhang ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) (Donnez et al. 1998; Smith 1998; McLaren 2000; Kressin et al. 2001c). Bei Frauen mit Endometriose wurde im Endometrium der späten Sekretionsphase ein höherer VEGF-Gehalt gefunden

als bei gesunden Frauen, was die Implantation und Vaskularisierung der Endometriumfragmente begünstigen könnte (Donnez et al. 1998). VEGF wird in Endometrioseherden exprimiert (McLaren et al. 1996b). Frühe Manifestationsformen der Endometriose (rote Läsionen) weisen eine stärkere Vaskularisierung und eine höhere VEGF-Expression auf als spätere, weniger aktive Herde (Donnez et al. 1998). Für die Bedeutung der Angiogenese bei der Endometriose spricht auch, dass die Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen eine stärkere angiogenetische Aktivität besitzt als die von Frauen ohne Endometriose (Oosterlynck et al. 1993). Neben höheren VEGF-Konzentrationen (McLaren et al. 1996a) enthält sie auch andere Wachstumsfaktoren in erhöhten Konzentrationen. Dazu gehören Interleukin-5 (IL-5), IL-6 (Koyama et al. 1993; Mahnke et al. 2000), Rantes (Akronym für „Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted“) (Khorram et al. 1993), IL-8 (Ryan et al. 1995), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Rana et al. 1996) und der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Oosterlynck et al. 1994).

## 1.2 Angiopoietine

Mit den Angiopoietinen wurde eine weitere Familie von Angiogenesefaktoren entdeckt. Als Vertreter dieser Gruppe sind bisher Angiopoietin-1 (Ang1) (Davis et al. 1996), Angiopoietin-2 (Ang2) (Maisonpierre et al. 1997), Angiopoietin-3 (Ang3), Angiopoietin-4 (Ang4) (Valenzuela et al. 1999) und Angiopoietin-like 5 (Angptl5) (Zeng et al. 2003) bekannt. Ang3 wird in der Maus durch Abschnitte kodiert, die zu Ang4 des Menschen homolog sind.

Ang1 und Ang2 sind Glykoproteine mit einer Länge von 498 bzw. 496 Aminosäuren (Davis et al. 1996; Maisonpierre et al. 1997). Ihre Sequenzen weisen 60% homologe Abschnitte auf. Beide Proteine bestehen aus einer Domäne mit einer „coiled-coil“ Struktur am Aminoterminus, die verantwortlich ist für die Bildung von Oligomeren, und einer Fibrinogen-ähnlichen Domäne am Karboxylende, die für die Phosphorylierung des Rezeptors eine Rolle spielt (Procopio et al. 1999). Beide Angiopoietine sind Liganden des Tyrosinkinase-Rezeptors Tie2, der fast ausschließlich auf Endothelzellen und Zellen der frühen Hämatopoese (Dumont et al. 1992; Iwama et al. 1993; Maisonpierre et

al. 1993; Sato et al. 1993) zu finden ist. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrer Reaktion mit dem Rezeptor und in ihrer Funktion.

Ang1 verursacht eine Autophosphorylierung und Aktivierung des Tie2-Rezeptors. In der frühen Embryonalentwicklung findet man Ang1 vorwiegend im Myokard, das dem Endokard direkt anliegt. Später ist es in der Nähe von Endothelzellen überall dort lokalisiert, wo sich neue Gefäße entwickeln (Davis et al. 1996). Ang1-mRNA wird vorwiegend in Perizyten und glatten Muskelzellen, nicht aber in Endothelzellen gebildet (Davis et al. 1996; Suri et al. 1996; Kim et al. 2000a). Bei Mäusen führt das Fehlen des Gens für Ang1 zur Letalität am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung. Diese Mausembryonen weisen Defekte bei der Bildung des Herzens und der Gefäße auf (Suri et al. 1996), die den Veränderungen ähneln, die Mäuse ohne das Gen für den Rezeptor Tie2 aufweisen (Sato et al. 1995). Diese Defekte tauchen später in der Embryonalentwicklung auf als Defekte in der Angiogenese bei VEGF-defizienten Mäusen (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996). Ang1 ist also zu einem späteren Zeitpunkt als VEGF von Bedeutung für die Angiogenese (Suri et al. 1996). Außer den weniger komplex entwickelten Herzen und Gefäßen fällt bei den Ang1-defizienten Mausembryonen auf, dass die Endothelzellen kaum mit der umgebenden Matrix assoziiert sind und dass periendotheliale Zellen fehlen. Ang1 scheint also an der Regulation von Interaktionen zwischen Endothel und Matrix und somit an der Reifung der Gefäße beteiligt zu sein (Suri et al. 1996). Transgene Mäuse mit einer Überexpression von Ang1 besitzen eine gesteigerte Vaskularisation mit mehr Gefäßen, die zusätzlich größer und stärker verzweigt sind als in Wildtypmäusen (Suri et al. 1998). *In vitro* hat Ang1 außerdem einige spezifische Wirkungen auf Endothelzellen. Es wirkt chemotaktisch auf sie, führt aber nicht zu ihrer Proliferation (Witzenbichler et al. 1998). Ang1 kann *in vitro* die Bildung von Kapillarsprossen in Fibringel induzieren (Koblizek et al. 1998; Kim et al. 2000c). In anderen Untersuchungen wurde dieser Effekt von Ang1 auf Endothelzellkulturen jedoch nicht festgestellt (Davis et al. 1996). Darüber hinaus hemmt Ang1 die Apoptose von Endothelzellen (Kwak et al. 1999; Papapetropoulos et al. 1999).

Die Regulation der Bildung von Ang1 ist noch nicht vollständig geklärt. Die Untersuchungsergebnisse widersprechen sich zum Teil. Im Versuch mit

Endothelzellkulturen hat weder Hypoxie, noch VEGF eine Veränderung der Ang1-mRNA-Expression verursacht (Oh et al. 1999). In Glioblastomzellen von Ratten sinkt sie jedoch unter dem Einfluss von Hypoxie (Enholm et al. 1997). In einem Schlaganfallmodell mit Ratten wurde ein später Anstieg der Ang1-mRNA festgestellt mit einem Maximum zwei Wochen nach der Ischämiephase des Gehirns (Lin et al. 2000). In humanen Fibroblasten sinkt die Ang1-mRNA nach Stimulation mit fetalem Kälberserum und verschiedenen Wachstumsfaktoren (aus Plättchen stammender Wachstumsfaktor (PDGF), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) (Enholm et al. 1997; Ristimaki et al. 1998). Hazzard et al. untersuchten die periovulatorische mRNA-Expression von Ang1 in Granulosazellen von Rhesusaffen. Dabei zeigte sich 12 h nach Gabe von menschlichem Choriongonadotropin (HCG) eine gonadotropinabhängige Verminderung und 36 h nach HCG-Gabe kurz vor der Ovulation ein steroidabhängiger Anstieg der mRNA (Hazzard et al. 2000).

Ang2 ist zwar auch ein Ligand von Tie2, aber an Endothelzellen führt es nicht wie Ang1 zu dessen Autophosphorylierung, sondern blockiert die Ang1-Aktivität (Maisonpierre et al. 1997). Somit stellt es einen endogenen kompetitiven Antagonisten von Ang1 dar. Das Vorkommen zweier Faktoren mit einem direkt antagonistischen Verhalten gegenüber einer Rezeptor-Tyrosinkinase ist vorher nur bei *Drosophila* beobachtet worden (Schweitzer et al. 1995). Im Mausembryo ist Ang2 im Gegensatz zu Ang1, das im Herz und an Orten der Gefäßbildung eher diffus verteilt ist (Davis et al. 1996), vorwiegend punktuell lokalisiert. Es ist nicht an allen Gefäßen zu finden und fehlt im Herz. Hieraus wurde geschlossen, dass Ang2 nur an bestimmten Orten und in bestimmten Stadien der Gefäßbildung für die Regulation des Ang1-Signals sorgt (Maisonpierre et al. 1997). Ang2 wird vermutlich von Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen produziert (Maisonpierre et al. 1997; Mandriota und Pepper 1998). Im adulten Organismus ist die Ang1-Expression weit verbreitet, wohingegen Ang2 nur an Orten mit physiologischer Neoangiogenese, wie z.B. Ovarien, Plazenta und Uterus (Maisonpierre et al. 1997) oder im Zuge der Tumorangio-genese (Holash et al. 1999a; Holash et al. 1999b) exprimiert wird. Die Überexpression von Ang2 in transgenen Mausembryonen führt zur Letalität an Tag 9,5-10,5 der Entwicklung. Die Embryonen sind kleiner als bei vergleichbaren Wildtypmäusen und weisen ein abnormes Gefäßsystem auf, das z.B. durch Gefäßabbrüche

gekennzeichnet ist. Die Defekte ähneln denen in transgenen Mausembryonen ohne Ang1 oder Tie2, sind aber schwerwiegender (Maisonpierre et al. 1997).

Es sind verschiedene Faktoren bekannt, die an der Regulation von Ang2 beteiligt sind. Hypoxie und verschiedene Zytokine wie VEGF, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) oder TNF- $\alpha$  verursachen einen Anstieg der Ang2-mRNA in verschiedenen Endothelzellkulturen (Mandriota und Pepper 1998; Oh et al. 1999; Krikun et al. 2000; Kim et al. 2000b). Ang1 und TGF- $\beta$  führen zum Absinken von Ang2-mRNA (Mandriota und Pepper 1998). In einem Schlaganfallmodell mit Ratten wurde *in vivo* eine biphasische Induktion von Ang2-mRNA mit einem frühen Maximum 24 h und einem späten Maximum zwei Wochen nach Ischämie beobachtet (Lin et al. 2000). In Granulosazellen von Rhesusaffen wurde periovulatorisch 12 h nach HCG-Stimulation eine steroidabhängige Expression von Ang2-mRNA festgestellt (Hazzard et al. 2000).

Aus den verschiedenen Expressionsorten und der zeitlichen Abfolge der Expression der Angiopoietine im Vergleich zum VEGF wurde auf die Funktion der Angiopoietine und ihr Zusammenspiel mit VEGF bei der Angiogenese geschlossen (Davis et al. 1996; Suri et al. 1996; Maisonpierre et al. 1997; Davis und Yancopoulos 1999). Als Beispiel für ein adultes Gewebe mit starken Umbauvorgängen im Gefäßsystem wurde das Rattenovar untersucht (Maisonpierre et al. 1997). Der Umbau des Follikels zum Corpus luteum nach dem Eisprung ist mit intensiver Vaskularisierung durch das Einsprossen von Gefäßen verbunden. In dieser Phase ist viel VEGF-mRNA im sich entwickelnden Corpus luteum zu finden, auch an Stellen, an denen noch keine Gefäße vorhanden sind. Ang1-mRNA wird in der Nähe bereits eingesprosseter Gefäße entdeckt bzw. scheint diesen zu folgen. Dieses Expressionsmuster passt zur Hypothese, dass Ang1 eine spätere Rolle als VEGF in der Angiogenese hat und für eine Stabilisierung und Reifung der Gefäße sorgt (Suri et al. 1996). Im Gegensatz dazu findet man Ang2-mRNA an der Spitze neuer Gefäße, die in das Corpus luteum vordringen. Ang2 scheint also zusammen mit VEGF an den frühen Phasen der Gefäßinvasion mitzuwirken, indem es das stabilisierende Ang1-Signal blockiert, damit die Gefäße auf den proliferationsfördernden Effekt von VEGF reagieren können (Maisonpierre et al. 1997). In alternden Corpora lutei oder in atretischen Follikeln, in denen es zur

Gefäßregression kommt, findet man kaum VEGF- aber viel Ang2-mRNA. Maisonpierre et al. folgerten hieraus, dass Ang2 in Gegenwart von viel VEGF zu neuen Gefäßaussprossungen führt, indem es ein konstitutives stabilisierendes Ang1-Signal blockiert, dadurch zur Destabilisierung beiträgt und einen vaskulären Umbau ermöglicht. In Abwesenheit von VEGF führt die durch Ang2 vermittelte Destabilisierung zur Gefäßregression (Maisonpierre et al. 1997). Abb. 1 zeigt diese Zusammenhänge schematisch.

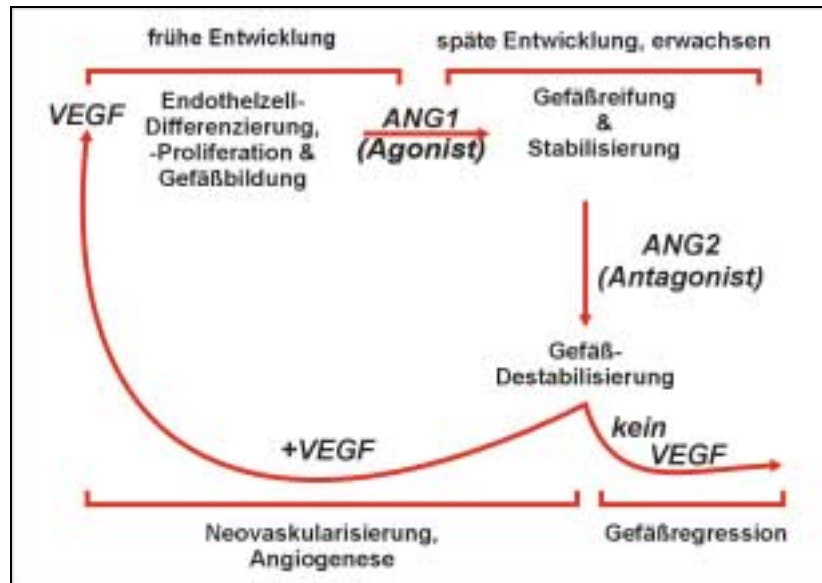


Abb. 1

**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Interaktionen und Wirkungen von VEGF, Ang1 und Ang2. VEGF induziert Angiogenese und führt zur Gefäßbildung. Ang1 hat einen stabilisierenden Effekt auf das Gefäß. Dieser Effekt wird durch Ang2 blockiert. Unter dem Einfluss von Ang2 kommt es in Gegenwart von VEGF zum Aussprossen neuer Gefäße, in dessen Abwesenheit zur Gefäßregression (nach Davis und Yancopoulos 1999).

Beide Angiopoietine wurden im weiblichen Reproduktionstrakt nicht nur im Ovar, sondern auch in der Plazenta, im Endometrium und in Endometriose-läsionen nachgewiesen (Dunk et al. 2000; Krikun et al. 2000; Kressin et al. 2001a; Li et al. 2001). Bei Frauen mit Menorrhagien ist der Gehalt von Ang1 im Endometrium vermindert, was an einer fehlerhaften Entwicklung der endometrialen Gefäße bei diesen Patientinnen beteiligt sein könnte (Hewett et al. 2002). Es wird angenommen, dass eine veränderte Expression der Angiopoietine auch bei anderen gynäkologischen Erkrankungen wie Endometriose, Endometriumpolypen oder Myomen von Bedeutung ist (Geva und Jaffe 2000).

### 1.3 CAM-Modell

Das Modell der Chorioallantoismembran (CAM) des befruchteten Hühnereies ermöglicht es, die Angiogenese als *dynamischen* Prozess im Zeitverlauf zu untersuchen (Gerlach 1887). Zum einen wird es zur Beobachtung der Angiogenese und deren Beeinflussung durch pro- oder antiangiogenetische Faktoren genutzt (Oosterlynck et al. 1993; Brooks et al. 1994a; Brooks et al. 1994b). Zum anderen ist es möglich, verschiedene Gewebe auf der CAM zu kultivieren, bevor das Immunsystem des Hühnerembryos am 16. bzw. 17. Tag der Bebrütung suffizient ausgebildet ist (Ausprunk et al. 1975). Zu den humanen Geweben, deren Implantation auf die CAM gelang, gehören Haut, Endometrium, Ovarialzellen, Pankreas- und Blasenkarzinomzellen (Rubovits und Abrams 1951, Kunzi-Rapp 1995).

Als Schlüsselpunkt für die Pathogenese der Endometriose gilt die Implantation ektopter Endometriumzellen, wobei die angiogenetische Aktivität dieser Zellen über die Etablierung von Läsionen entscheidet. Analog zu diesem Vorgang lässt sich mit dem CAM-Modell Endometriumgewebe in einer vergleichbaren ektopten Situation untersuchen. Die für die Implantation notwendigen angiogenetischen Prozesse können einerseits anhand von Veränderungen der Gefäßdichte und andererseits anhand der Expression angiogeneserelevanter Faktoren untersucht werden. Deshalb ist das CAM-Modell außerordentlich gut für die Erforschung der Pathogenese der Endometriose geeignet. 72 h nach Transplantation von Endometriumgewebe lassen sich sogar Endometriose-ähnliche Läsionen auf der CAM nachweisen (Maas et al. 2001). Auf die CAM transplantiertes Endometrium erwies sich als geeignetes Endometriosemodell für die Etablierung der Fluoreszenzdiagnostik der Endometriose (Malik et al. 2000a). Anhand dieses Modells gewonnene Erkenntnisse konnten dabei anschließend auf die Anwendung beim Menschen übertragen werden (Malik et al. 2000b). mRNA-Analysen von Endometriumfragmenten, die über 72 h auf der CAM kultiviert worden waren, zeigen einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF und MMP1. Parallel dazu lässt sich eine signifikante Angiogeneseinduktion durch das Endometriumgewebe auf der CAM beobachten (Kressin et al. 2001b; Kressin et al. 2001c). Im Zusammenhang mit der zentralen Stellung der Angiogenese für die

Pathogenese der Endometriose ist das VEGF als wichtiger Angiogenesefaktor intensiv untersucht worden. Die Bedeutung der Angiopoietine 1 und 2, welche eng mit dem VEGF interagieren, ist allerdings noch weitgehend ungeklärt. In ersten Experimenten wurden Ang1 und Ang2 in Endometrioseläsionen nachgewiesen (Greb et al. 2001; Kressin et al. 2001a). Weitere Untersuchungen am CAM-Modell erscheinen sinnvoll, um ein besseres Verständnis von den komplexen Mechanismen, die zur Entstehung von Endometriose führen, zu erlangen. Dies kann letztlich zur Etablierung neuer Therapieansätze führen.

#### **1.4 Fragestellung**

An einem Modell der Endometriose auf der CAM wurde nach Applikation von humanem Endometrium die Expression von Ang1 und Ang2 über einen Zeitraum von 72 h unter Berücksichtigung folgender Fragestellungen untersucht:

- Sind Ang1- und Ang2-mRNA in den Transplantaten nachweisbar? Lässt sich durch die Etablierung einer RT-PCR für diese mRNA ein quantitatives Nachweissystem entwickeln?
- Verändert sich die Ang1- und Ang2-mRNA-Expression nach Transplantation und Kultivierung auf der CAM?
- Sind Ang1 und Ang2 in den Transplantaten auf Proteinebene immunhistologisch nachweisbar? In welchen Kompartimenten (Drüsen, Stroma) lässt sich das Protein lokalisieren? Gibt es Unterschiede im Expressions- bzw. Verteilungsmuster vor und nach Transplantation?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Agarose	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe
DEPC	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Takara Biomedicals, Shiga, Japan
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe
Puffer B <sup>+</sup>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer Y	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tris	Merck, Darmstadt
Trizol® Reagent	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe
Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel in p.a. Qualität	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.2 Enzyme und Proteine

Ang1-blocking peptide	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ang2 (rekombinant)	R&D Systems, Wiesbaden
goat polyclonal anti-hAng1	Santa Cruz Biotechnology, USA
goat polyclonal anti-hAng2	Santa Cruz Biotechnology, USA
<i>KspAI</i> (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Promega, Madison, USA
<i>PdII</i> (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

#### 2.1.3 Geräte und sonstige Materialien

Axio Vision Release 2.05	Carl Zeiss Vision GmbH, München-Hallbergmoos
DAB substrate kit for peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Easy Gel-Dokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Falcon-Gewebekulturschälchen, 35x10 mm	Becton Dickinson u. Company, Franklin Lakes, USA
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Renner GmbH, Dannstadt
Mikroskop Axioplan2 imaging	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena
Mikrozentrifuge MC-13	Millipore/Amicon, Eschborn
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Fotometer GenQuant II	Pharmacia Biotech (jetzt Amersham Biosciences, Freiburg)
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Staufen
Vectastain® Elite® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wizard PCR Preps Purification System	Promega, Madison, USA
Zentrifuge Hettich Rotanta/RP	Hettich RotantaTuttlingen
Zentrifuge 2K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

##### Citratpuffer:

9,5 mM Citronensäure-Monohydrat, pH 6,0

##### DEPC-Wasser:

0,1% (v/v) DEPC in Wasser über Nacht rühren, autoklavieren

##### 75% (v/v) Ethanol:

75% (v/v) Ethanol in DEPC-Wasser

##### TAE-Puffer:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,0

1 mM EDTA

##### TBS-Puffer:

50 mM Tris-HCL, pH 7,7

150 mM NaCl

### 2.1.5 Primer/Oligonukleotide

Oligo-dT<sub>15</sub>

MWG Biotech, Ebersberg

Die für die PCR als Startermoleküle verwendeten Primer wurden alle von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

Name	Position	Sequenz	T <sub>AN</sub>	Gen	Genbank-nummer*
5'-Ang1	1441-1461	5'-ATG GAC TGG GAA GGG AAC CGA-3'	62°C	Ang1	NM_001146
3'-Ang1	1770-1749	5'-ACG TAA GGA GTA ACT GGG CCC T-3'			
k-3'-Ang1	1770-1749, 1714-1695	5'-ACG TAA GGA GTA ACT GGG CCC T = CAT GGT TTT GTC CCG CAG TA-3'			
5'-Ang2	1314-1334	5'-GGA CAA TTA TTC AGC GAC GTG-3'	54°C	Ang2	NM_001147
3'-Ang2	1801-1782	5'-GAG CGA ATA GCC TGA GCC TT-3'			
k-3'-Ang2	1801-1782, 1719-1700	5'-GAG CGA ATA GCC TGA GCC TT = CCG TTC AAG TTG GAA GGA CC-3'			
5'-Gapdh	4296-4315	5'-ATC ATC CCT GCC TCT ACT GG-3'	59°C	GAPDH	NM_014364
3'-Gapdh	4552-4533	5'-TGG GTG TCG CTG TTG AAG TC-3'			

**Tab. 1**

= kennzeichnet Stelle, an der eine Deletion von 34 bp bei Ang1 und von 63 bp bei Ang2 im Vergleich zur cDNA erzeugt wurde

T<sub>AN</sub>: Anheftungstemperatur (Annealing) in der PCR

\* NCBI Accession: Unter dieser Nummer ist die betreffende Gensequenz in der GenBank des „National Center for Biotechnology Information“ archiviert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)

### 2.1.6 DNA-Längenstandard

100 bp DNA ladder (1µg/µl)

GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

bp: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072

## 2.2 Extraktion der Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde nach der sauren Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987) unter Verwendung von Trizol® Reagent (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) durchgeführt. Das explantierte Gewebe wurde jeweils in 1 ml Trizol® Reagent für 30 sek mit dem Ultra-Turrax T25 homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat für 15 min bei 2000 \* g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Nukleoprotein-Komplexe vollständig dissoziieren konnten. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde der Ansatz 15 sek geschüttelt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 min bei 12000 \* g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Zur Präzipitation der RNA wurde der Ansatz nun für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 12000 \* g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte RNA wurde in 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min bei 7500 \* g und 4°C zentrifugiert. Zum Schluss wurde die RNA getrocknet, in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und bei – 80°C aufbewahrt.

## 2.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wie den Kompetitoren (2.6.1) und von RNA-Lösungen wurde durch photometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und 1 cm Schichtdicke entspricht eine Absorption von 1,0 einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Außerdem wurde der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm als Maß für Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol bestimmt. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

## 2.4 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA durch reverse Transkription (RT) wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Der vollständige Reaktionsansatz von 25 µl enthielt

außerdem 500 ng oligo-dT<sub>15</sub> als Startermolekül, je 12,5 nmol dNTPs und 100 U reverse Transkriptase im vom Hersteller mitgeliefertem Einfach-Puffer (Promega, Madison, USA). Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne RNA mitgeführt.

Zunächst wurden RNA und oligo-dT-Primer in 14,5 µl DEPC-behandeltem Wasser für 15 min in einem Wasserbad von 68°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Die Renaturierung wurde durch anschließende Inkubation auf Eis für 15 min verhindert. Nach Hinzufügen der restlichen Reagenzien wurde der Ansatz für 45 min bei 42°C und für 45 min bei 52°C inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 100°C wurde das Enzym inaktiviert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung kurzfristig bei 4°C, längerfristig bei - 20°C aufbewahrt und konnte in dieser Form direkt zur PCR-Analyse eingesetzt werden.

## **2.5 Qualitative PCR**

Die PCR für GAPDH wurde nach einem bereits veröffentlichten Protokoll durchgeführt (Kressin et al. 2001c). Für Ang1 und Ang2 wurden neue PCR-Protokolle etabliert. Die Angiopoietin-Primer sind in ihrer Sequenz human-spezifisch, die GAPDH-Primer können mit der cDNA von humaner und Hühner-GAPDH reagieren. Allerdings wurden die PCR-Bedingungen so gewählt, dass die Primer ausschließlich an die humane cDNA banden.

Für die gewählten Primerpaare (s. Tab. 1) ergeben sich folgende Fragmente: Ang1 (330 bp), Ang2 (488 bp), GAPDH (256 bp).

Als Matrize für die DNA-Polymerase wurde die durch reverse Transkription gewonnene cDNA eingesetzt (s. 2.4). Jeder PCR-Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl. Dabei wurden jeweils 1 µl cDNA, 0,75 U Taq DNA Polymerase (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe), 20 pmol von jedem zugehörigen Primer und 10 nmol von jedem dNTP im vom Enzymhersteller mitgelieferten Einfach-Puffer eingesetzt. Nach Optimierung ergaben sich folgende PCR-Bedingungen:

*Programm für Ang1:*

- Denaturierung der cDNA (1x): 3 min bei 94°C
- Amplifizierung (37x):
  - Denaturierung: 1 min bei 94°C
  - Primerannealing (Anheftung): 1 min 30 sek bei 62°C
  - Elongation: 3 min bei 72°C
- terminale Extension (1x): 7 min bei 72°C

*Programm für Ang2:*

- Denaturierung der cDNA (1x): 3 min bei 94°C
- Amplifizierung (32x):
  - Denaturierung: 1 min bei 94°C
  - Primerannealing (Anheftung): 1 min 30 sek bei 54°C
  - Elongation: 3 min bei 72°C
- terminale Extension (1x): 7 min bei 72°C

*Programm für GAPDH:*

- Denaturierung der cDNA (1x): 3 min bei 94°C
- Amplifizierung (28x):
  - Denaturierung: 1 min bei 94°C
  - Primerannealing (Anheftung): 1 min 30 sek bei 59°C
  - Elongation: 3 min bei 72°C
- terminale Extension (1x): 7 min bei 72°C

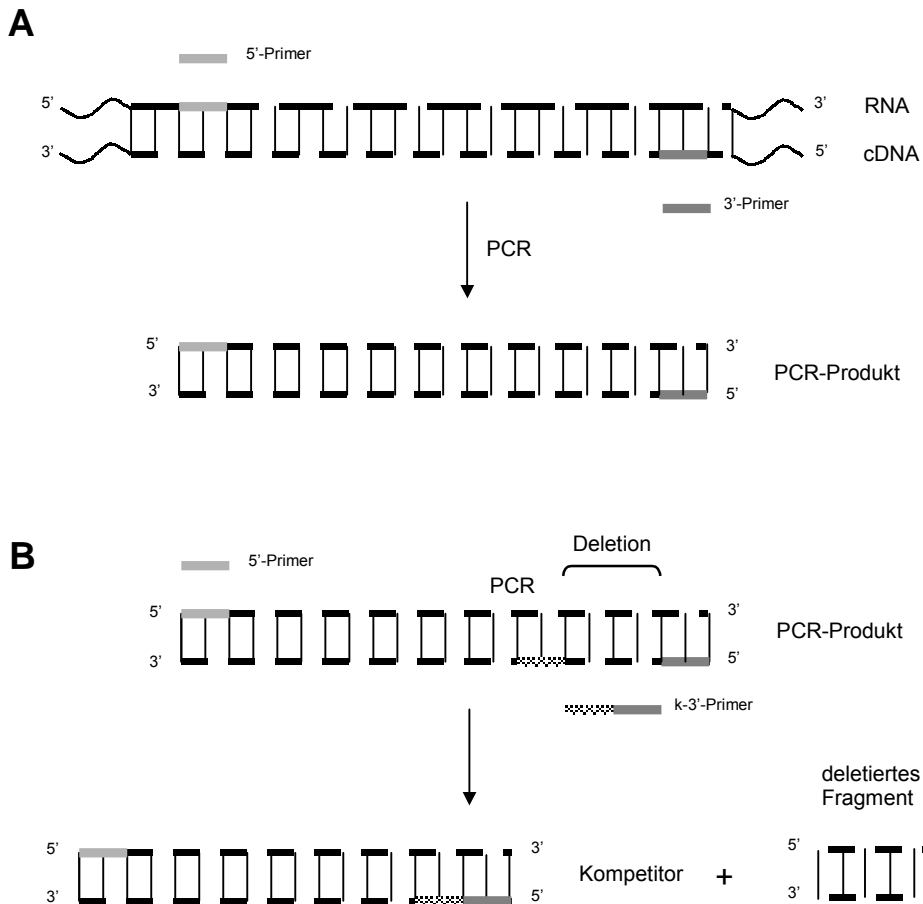
Die PCR-Ergebnisse wurden anhand von Agarosegelen untersucht (2.7).

## **2.6 Quantitative PCR**

### **2.6.1 Herstellung der Kompetitoren**

Die für die kompetitive PCR (s. 2.6.2) benötigten internen Standards für Ang1 und Ang2 wurden mittels PCR unter den oben beschriebenen Bedingungen hergestellt. Als cDNA-Matrize diente dabei Ang1- bzw. Ang2-PCR-Produkt. Anstelle der 3'-Primer wurden jedoch spezielle 3'-Primer verwandt, die für eine Deletion von 34 bp für Ang1, bzw. 63 bp für Ang2 im jeweiligen Kompetitorfragment im Vergleich zum regulären PCR-Produkt sorgten. Die Sequenzen

dieser speziellen Kompetitorprimer (k-3'-ang1, k-3'-ang2) sind in Tab. 1 angegeben. Eine schematische Darstellung der Herstellung der Kompetitoren zeigt Abb. 2.



**Abb. 2**

**Abb. 2:** Herstellung der internen Standards für die kompetitive PCR. (A) zeigt schematisch die RT-PCR, die zur Entstehung der Ang1- und Ang2-PCR-Produkte führt. Unter Verwendung des jeweiligen PCR-Produktes als Matrize und spezieller k-3'-Primer wurden die Kompetitorfragmente erzeugt (B). Die k-3'-Primer sind zu zwei Bereichen der cDNA komplementär, die 34 bp (Ang1), bzw. 63 bp (Ang2) auseinander liegen, sodass eine Deletion im Kompetitorfragment erzeugt wird.

Die Herstellung des GAPDH-Kompetitors erfolgte im Zusammenhang mit einer vorangegangenen Studie durch die Einführung einer Deletion (43 bp) mittels überlappender PCR in das normale GAPDH-PCR-Produkt (Kressin et al. 2001c).

Die korrekten Fragmentlängen dieser PCR-Produkte (Ang1: 296 bp, Ang2: 425 bp, GAPDH: 213 bp) wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (s. 2.7). Aus den PCR-Ansätzen, die ein kräftiges Signal in der Elektrophorese zeigten, wurde das PCR-Produkt mit dem Wizard PCR Preps Purification System gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt (Promega, Madison, USA). Die Konzentrationen der neu gewonnenen Kompetitorlösungen wurden wie in Abschnitt 2.3 beschrieben gemessen. Die Kompetitorstammlösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Nach Bedarf wurden 1:2-Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich zwischen 140 fg/ $\mu\text{l}$  und 2 ag/ $\mu\text{l}$  für Ang1 und Ang2 bzw. zwischen 1150 fg/ $\mu\text{l}$  und 1 fg/ $\mu\text{l}$  für GAPDH hergestellt.

### 2.6.2 Kompetitive PCR

Zur quantitativen Bestimmung der relativen cDNA-Konzentration von Ang1, Ang2 und GAPDH wurde für jede Probe und jeden Faktor eine kompetitive PCR durchgeführt. Das Prinzip der kompetitiven PCR beruht auf der gleichzeitigen Amplifikation von cDNA und einem als Kompetitor eingesetzten internen Standard in einer bekannten Konzentration (Siebert und Larrick 1992). Beide konkurrieren um Polymerase, Primer und dNTPs. Ihre PCR-Produkte unterscheiden sich jedoch in ihrer Fragmentlänge, so dass man durch Vergleich ihrer beiden Banden in der Agarose-Gelelektrophorese auf die Konzentration der cDNA des betreffenden Faktors in der jeweiligen Probe schließen kann. Aus diesem Wert lässt sich der mRNA-Gehalt der betreffenden Probe berechnen.

Nach einer qualitativen Übersichts-PCR (s. 2.5) zur groben Abschätzung der Konzentration des untersuchten Faktors wurde die kompetitive PCR unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie die qualitative PCR durchgeführt. Zusätzlich zu 1  $\mu\text{l}$  eingesetzter cDNA-Lösung (s. 2.4) enthielt jeder Ansatz auch 1  $\mu\text{l}$  Kompetitor in bekannter Konzentration. Für jede Probe und jeden Faktor (Ang1, Ang2, GAPDH) wurden vier Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Kompetitors in einer 1:2-Verdünnungsreihe bereit. Anhand der zuvor erfolgten Übersichts-PCR konnte das jeweils entsprechende Konzentrationsfenster dieser Verdünnungsreihe abgeschätzt werden. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.7) analysiert.



### 2.6.3 Konzentrationsbestimmung der mRNA

Aus den Ansätzen, in denen cDNA und Kompetitor gleich stark fluoreszierende Banden aufwiesen, wurden die Kompetitor-Konzentrationen notiert. Mit Hilfe dieser Äquivalenz-Konzentrationen und unter Berücksichtigung der molekularen Masse des jeweiligen Kompetitors, der in der RT eingesetzten Menge Gesamt-RNA, der RT-Effizienz (Wolber et al. 1999) und der Tatsache, dass der Kompetitor im Gegensatz zur einzelsträngigen cDNA doppelsträngig ist, wurden die mRNA-Konzentrationen in fmol berechnet.

## 2.7 Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR wurden 30 µl PCR-Produkt in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde 2% (w/w) Agarose in TAE-Puffer erhitzt und gelöst. Nach moderatem Abkühlen wurde Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden bei einer Spannung von 90-120 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die Gele im durchscheinenden UV-Licht fotografiert. Die Länge der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 100 bp DNA-Marker (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) bestimmt.

## 2.8 Verdau mit Restriktionsenzymen

Für den Verdau wurden PCR-Produkte beider Angiopoietine mit dem Wizard PCR Preps Purification System gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt (Promega, Madison, USA). Es wurden für jedes Angiopoietin je 2 µl bzw. 10 µl PCR-Produkt (s. 2.5) mit 5 U *KspAI* bzw. *PdI* in einem Gesamtvolumen von 20 µl im Originalpuffer B<sup>+</sup>, bzw. Y<sup>+</sup> (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) bei 37°C für 90 min inkubiert. Die Analyse der nach dem Verdau erhaltenen Fragmentlängen erfolgte im Agarosegel (s. 2.7).

## 2.9 Immunhistochemie (IHC)

Zum qualitativen Nachweis der Proteinexpression von Ang1 und Ang2 wurden paraffinierte Gewebeschnitte der Transplantate von zwei der fünf Patientinnen

immunhistochemisch behandelt. Dafür wurde als Modifikation eines Protokolles von Otani (Otani et al. 1999) eine indirekte Peroxidase-Färbung etabliert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom etwa 4 µm dick geschnitten. Vor dem Färbevorgang wurden die Gewebeschnitte durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte zur Freilegung des Antigens 5 min (Ang1) bzw. 2,5 min (Ang2) in Citratpuffer im Dampfdrucktopf gekocht und 15 min im heißen Citratpuffer inkubiert. Danach wurden sie mit TBS-Puffer gespült und zur Hemmung der endogenen Peroxidase für 10 min in 7,5% (v/v) Wasserstoffperoxid in Wasser inkubiert. Nach einer weiteren Spülung mit TBS wurden die Schnitte für 20 min zur Blockierung von unspezifischen Antigenstrukturen mit Kaninchen-Normalserum (Vectastain® Elite® ABC Kit; Ang1: 2 Tropfen auf 3300 µl TBS, Ang2: 1 Tropfen auf 3300 µl TBS) inkubiert, um später unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers und damit die Hintergrundreaktivität zu verringern. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper für 30 min (goat polyclonal anti-hAng1 in einer Verdünnung von 1:50, bzw. goat polyclonal anti-hAng2 in einer Verdünnung von 1:40), gefolgt von einer Spülung mit TBS und der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Vectastain® Elite® ABC Kit; rabbit-anti-goat in einer Verdünnung von 1:400) für 30 min. Nach einem weiteren Spülschritt wurden die Schnitte für 30 min mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex in der vom Hersteller angegebenen Konzentration inkubiert (Vectastain® Elite® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Danach wurden die Schnitte noch einmal mit TBS gespült und für 8 min mit dem Chromogen DAB gemäß Herstellerangaben inkubiert (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Die Detektion mit diesem Chromogen resultiert in einer stark dunkelbraunen Färbung. Eine Gegenfärbung erfolgte am Schluss für 20 sek mit Hämatoxylin nach Mayer. Als Positivkontrollen wurden Schnitte von Plazenta- und Endometriumgewebe mitgeführt (Dunk et al. 2000; Krikun et al. 2000; Hewett et al. 2002), bei den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper weggelassen. Um die Spezifität dieser immunhistochemischen Färbungen nachzuweisen, wurden einige Schnitte mit Primärantikörpern behandelt, die mit Ang1-blocking peptide in achtfachem Überschuss im Vergleich zur Ang1-

Primärantikörper-Konzentration bzw. mit rekombinantem Ang2 in zweifachem Überschuss im Vergleich zur Ang2-Primärantikörper-Konzentration für 2 h vorinkubiert worden waren. Diese Schnitte wiesen keine immunhistochemische Positivität auf.

## **2.10 Patientinnen**

Für die Untersuchungen wurde Endometrium von fünf Patientinnen verwendet, bei denen aufgrund von gutartigen gynäkologischen Erkrankungen eine Hysterektomie in der Frauenklinik der Universität zu Lübeck durchgeführt wurde. Bei vier der Patientinnen lag ein Uterus myomatosus, bei einer ein Deszensus uteri et vaginae vor. Die Patientinnen waren im reproduktiven Alter und befanden sich in der Proliferationsphase des Menstruationszyklusses. Keine der Patientinnen nutzte ein intrauterines Kontrazeptivum oder befand sich in den drei Monaten vor der Hysterektomie in Behandlung mit Medikamenten, die Steroidhormone enthielten, wie z.B. steroidale Kontrazeptiva. Die Patientinnen wurden über die Studie aufgeklärt und gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis. Ein Votum der örtlichen Ethikkommission lag vor.

## **2.11 Präparation des Gewebes**

Nach der Hysterektomie wurde der Uterus auf der anterioren Seite durch einen Schnitt von der Cervix bis zum Fundus eröffnet und eine Endometriumprobe aus dem Cavum entnommen. Gewebeproben, die für die Transplantation auf die CAM vorgesehen waren, wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung transportiert und in einer sterilen Petrischale mit einem sterilen Skalpell zu 1 mm<sup>3</sup> großen Präparaten zerkleinert. Gewebematerial, das nicht mehr rosig erschien, wurde nicht verwendet. Zwischen Materialentnahme und Applikation des Endometriums auf die CAM (s. u.) vergingen maximal drei Stunden.

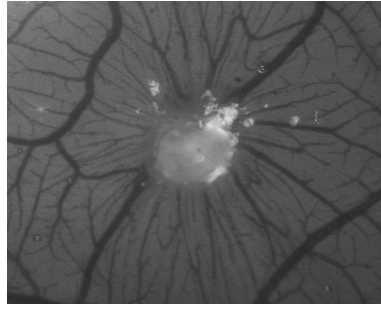
## **2.12 Diagnosestellung**

Die histologische Sicherung der Diagnose sowie die genaue Bestimmung der Zyklusphase erfolgte durch einen Mitarbeiter des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck.

## **2.13 Kultivierung des Gewebes (CAM-Modell)**

Die Untersuchung des Implantationsprozesses und der angiogenetischen Aktivität von ektopem Endometrium erfolgte am Modell der Chorioallantois-membran (CAM) des befruchteten Hühnereies.

Die befruchteten Hühnereier wurden von der Firma Lohmann Tierzucht (Cuxhaven, Deutschland) bezogen. Nach Ankunft im Labor wurden die Eier an ihrem spitzen Pol mit Klebeband beklebt, damit später beim Eröffnen des Eies die Schale nicht splitterte und keine kleinen Bruchstücke auf die CAM gelangten. Die Eier wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 60% Luftfeuchtigkeit gelagert. Am sechsten Tag der Bebrütung wurde in den abgeklebten Pol jedes Eies mit einer Schere ein ca. 3 cm durchmessendes Fenster geschnitten, das danach mit einem kleinen Plastikdeckel verschlossen wurde. Die Eier wurden nun mit dem Fenster nach oben gelagert, und die Bebrütung wurde fortgesetzt, bis am 10. Tag die Transplantation des Endometriums auf die CAM erfolgte. Untersuchungen von Malik et al. (Malik et al. 2000a) zeigten, dass man bei Transplantation des Gewebes zu diesem Zeitpunkt Präparate mit den besten Vitalitätszeichen erhält. Dazu wurde das Fenster in der Eierschale soweit vergrößert, dass die wie oben beschrieben erhaltenen 1 mm<sup>3</sup> großen Endometriumfragmente nun mit einer sterilen Pinzette mittig auf der CAM platziert werden konnten (s. Abb. 3).



**Abb. 3**

**Abb. 3:** Menschliches Endometriumtransplantat nach 96 h Kultivierung auf der CAM.

Dabei wurde für jede CAM nur ein Endometriumfragment verwendet. Nach dem Aufbringen des Gewebes auf die CAM wurde der Plastikdeckel wieder verschlossen und mit Isolierband verklebt. Für die mRNA-Analysen wurden je drei Präparate vom Endometrium jeder Patientin 24 h, 48 h und 72 h unter den oben beschriebenen Bedingungen auf der CAM kultiviert. Zur Explantation wurde die CAM in der Nähe des Transplantats mit einer Pinzette angehoben und das Transplantat mit etwas CAM-Gewebe mittels einer Schere abgetrennt. Die Präparate, die der mRNA-Analyse dienten, wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Bestimmung des Wertes zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden jeweils drei Endometriumfragmente jeder Patientin direkt nach der Hysterektomie ohne Kultivierung auf der CAM eingefroren. Für die immunhistologischen Färbungen wurden zusätzlich von zwei der fünf Patientinnen in gleicher Weise Präparate zu den vier Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) gewonnen. Diese wurden in einer 4,5% (v/v) Formalinlösung fixiert, dehydriert und in Paraffin gebettet.

## **2.14 Statistische Auswertung**

Für die mRNA-Konzentrationsbestimmung wurden von jeder Patientin jeweils drei Endometriumproben zu jedem Untersuchungszeitpunkt analysiert. Um die Größenunterschiede der Transplantate auszugleichen und die dazugehörigen Werte vergleichbar zu machen, wurden die Konzentrationen der Ang1- und Ang2-mRNA auf die Konzentration der GAPDH-mRNA jeder Probe bezogen. Es sollte untersucht werden, wie sich der mRNA-Gehalt der Angiopietine im Zeitverlauf verhält. Außerdem sollte das Verhältnis der Ang1- und Ang2-Werte zueinander beurteilt werden. Dazu wurde für jedes Transplantat der

Ang2/Ang1-Quotient gebildet. Die Quotienten Ang1/GAPDH, Ang2/GAPDH und Ang2/Ang1 wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Als statistisch signifikant erachtet wurden Werte für  $P < 0,05$ . Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 9.0 für Windows durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines quantitativen Nachweises für Ang1 und Ang2

##### 3.1.1 Optimierung der PCR für Ang1 und Ang2

Nach RNA-Extraktion (s. 2.2) und reverser Transkription (s. 2.4) der Endometriumproben ergab die PCR mit den als Primer verwendeten Oligonukleotiden 5'-ang1 und 3'-ang1 ein Produkt mit der erwarteten Länge von 330 bp. Nach PCR mit den Starteroligonukleotiden 5'-ang2 und 3'-ang2 erhielt man ein Fragment mit einer Länge von 488 bp (s. Abb. 4).

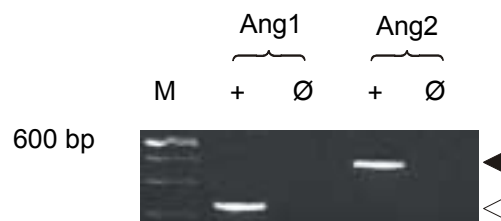


Abb. 4

**Abb. 4:** Qualitative PCR für Ang1 und Ang2. Die Gelelektrophorese zeigt die erwartete Bande für das Ang1-PCR-Produkt bei 330 bp (weißer Pfeil) und die erwartete Bande für das Ang2-PCR-Produkt bei 488 bp (schwarzer Pfeil). M: 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard; +: PCR-Ansatz mit cDNA; Ø: Negativkontrolle ohne cDNA.

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde untersucht, welchen Einfluss die Anzahl der Zyklen auf das Ergebnis der PCR hatte und ob mit den gewählten Zykluszahlen die Amplifikation der entsprechenden cDNA im linearen<sup>1</sup> Bereich liegt.

Dafür wurden jeweils drei Ansätze cDNA aus Endometriumgewebe einer PCR mit 23-43 (Ang1) bzw. 22-39 Zyklen (Ang2) unterzogen. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, und die Bandenintensität wurde densitometrisch gemessen. Durch graphische Auftragung der mittleren Bandenintensität gegen die Zykluszahlen wurde der lineare Amplifikationsbereich ermittelt. Abb. 5 zeigt die PCR-Produkte mit verschiedenen Zykluszahlen für Ang1 und Ang2. Mit steigenden Zykluszahlen nimmt auch die Bandenintensität zu. In Abb. 6 werden die densitometrisch gemessenen Intensitätsunterschiede

<sup>1</sup> Rechnerisch handelt es sich um eine exponentielle Vervielfältigung der Fragmente

in Abhängigkeit zur Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass mit den gewählten Zykluszahlen (Ang1: 37, Ang2: 32) die Amplifikation von Ang1 und Ang2 vor der Plateauphase im linearen Bereich liegt. In diesem Bereich besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl von Ausgangsmolekülen und der Menge an PCR-Produkt, und aufgrund der größten Intensitätsunterschiede ist hier die beste Differenzierung der Banden im Agarosegel möglich.

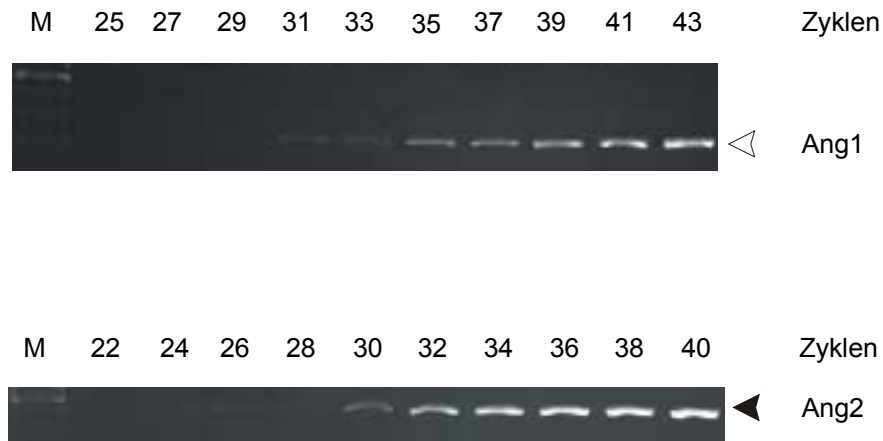


Abb. 5

**Abb. 5:** Überprüfung der PCR-Zykluszahlen für die Ang1- und Ang2-PCR: Gelelektrophoresen mit Ang1- (weißer Pfeil: 330 bp) bzw. Ang2-PCR-Produkten (schwarzer Pfeil: 488 bp). Oberhalb der Banden sind die jeweiligen Zykluszahlen angegeben. M: 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard.

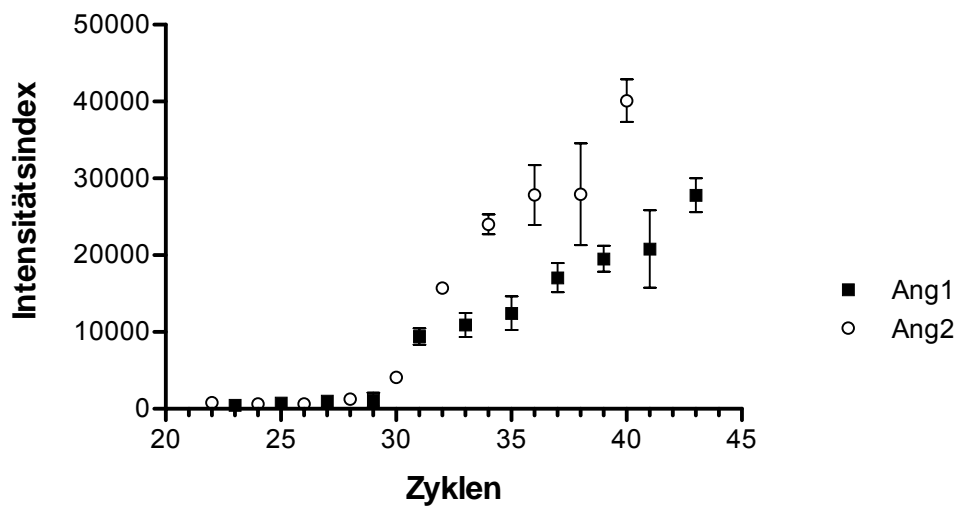
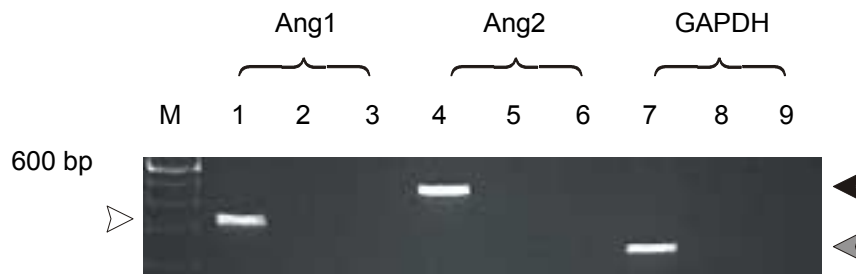


Abb. 6

**Abb. 6:** Überprüfung der PCR-Zykluszahlen für die Ang1- und Ang2-PCR: Densitometrisch bestimmte Bandenintensität in Abhängigkeit der Zykluszahlen (Mittelwert  $\pm$  SD von Dreifachbestimmungen). Für Ang1 wurden 37 und für Ang2 32 Zyklen gewählt.



Um auszuschließen, dass cDNA von CAM-Gewebe die Untersuchungsergebnisse beeinflusst, wurde die am humanen Endometrium etablierte PCR auf ihre Speziesspezifität hin getestet. Dazu wurde mRNA aus reinem CAM-Gewebe extrahiert (s. 2.2) und nach reverser Transkription (s. 2.4) neben cDNA von humanem Endometrium als Matrize eingesetzt. Nach PCR mit den Primern 5'-Ang1 und 3'-Ang1 bzw. 5'-Ang2 und 3'-Ang2 sowie 5'-Gapdh und 3'-Gapdh wurden in der Gelelektrophorese nur PCR-Produkte detektiert, wenn als Matrize cDNA von reinem humanem Endometrium diente. Wurde in der PCR cDNA einer CAM ohne Transplantat als Matrize verwandt, erhielt man kein Signal in der Gelelektrophorese (s. Abb. 7).



**Abb. 7**

**Abb. 7:** Testung der Speziesspezifität von Primer und PCR-Bedingungen. Agarosegel von PCR-Produkten nach PCR für Ang1 (Bahn 1-3, weißer Pfeil: 330 bp), Ang2 (Bahn 4-6, schwarzer Pfeil: 488 bp) und GAPDH (Bahn 7-9, grauer Pfeil: 256 bp) mit cDNA aus Endometrium (Bahn 1, 4, 7) und aus CAM-Gewebe (Bahn 2, 5, 8); Negativkontrollen ohne cDNA (Bahn 3, 6, 9). Nur die PCR mit Endometrium-cDNA zeigt Signale. M: 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard.

Um nachzuweisen, dass die verwendeten Primerpaare tatsächlich spezifisch an die humane cDNA von Ang1 bzw. Ang2 binden und dass es zu keinen Kreuzreaktionen eines Primerpaares mit cDNA des jeweils anderen Angiopoietins kommt, wurde ein Verdau der Ang1- und Ang2-PCR-Produkte mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Jedes der Enzyme schneidet eine Sequenz, die in einem der beiden PCR-Produkte vorkommt und im anderen fehlt. Das Enzym *KspAI* schneidet eine Sequenz, die nur im PCR-Produkt von Ang1 (Davis et al. 1996) enthalten ist. *PdI* dagegen schneidet eine Sequenz, die nur im PCR-Produkt von Ang2-cDNA (Maisonpierre et al. 1997) vorkommt. Der Verdau von PCR-Produkten nach PCR mit 5'-Ang1 und 3'-Ang1 durch das Enzym *KspAI* führte zum Erhalt von zwei Fragmenten mit einer Länge von 198 bp und 132 bp. Nach Verdau mit *PdI* wurden diese PCR-Produkte nicht geschnitten. Durch Verdau von PCR-Produkten nach PCR mit 5'-Ang2 und 3'-Ang2 mit dem Enzym *PdI* erhielt man zwei Fragmente mit einer

Länge von 267 bp und 221 bp. Nach Verdau mit *KspAI* wurden diese PCR-Produkte nicht geschnitten. Wie erwartet schnitt das Enzym *KspAI* also nur eine Sequenz, die in Produkten vorkommt, die durch PCR mit den Ang1-Primern erhalten wurden. *PdII* hingegen schnitt nur eine Sequenz, die in Produkten vorkommt, die durch PCR mit den Ang2-Primern gewonnen wurden. Somit konnten Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Primerpaaren ausgeschlossen werden. Die Produkte des analytischen Verdau zeigt Abb. 8.

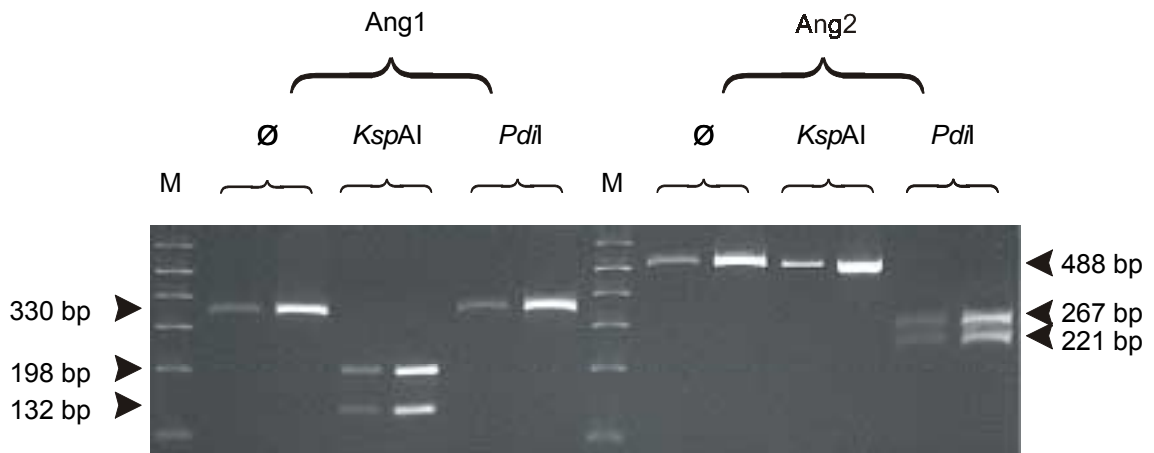


Abb. 8

**Abb. 8:** Testung der Primerspezifität. Agarosegel von PCR-Produkten von Ang1 und von Ang2 nach Verdau mit *KspAI* bzw. *PdII*. *KspAI* schneidet eine Sequenz im Ang1-PCR-Produkt nicht aber im Ang2-PCR-Produkt. *PdII* schneidet eine Sequenz im Ang2-PCR-Produkt nicht aber im Ang1-PCR-Produkt, so dass Kreuzreaktionen zwischen den Primerpaaren ausgeschlossen werden konnten. Eingesetzt wurden jeweils 2  $\mu$ l und 10  $\mu$ l PCR-Produkt. M: 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard, Ø: unverdautes PCR-Produkt.

### 3.1.2 Herstellung der internen Standards als Kompetitoren

Die PCR-Amplifikation von Ang1-cDNA mit den Primern 5'-ang1 und dem kompetitorspezifischen k-3'-ang1 ergab wie erwartet ein einzelnes Fragment mit einer Länge von 296 bp. Nach Aufreinigung des Fragmentes wurde dieses als Matrize für eine PCR mit dem Ang1-Primerpaar benutzt, wobei man wiederum nur Ang1-Kompetitorfragmente mit einer Länge von 296 bp erhielt (Abb. 9; s. auch Abb. 2 in Abschnitt 2.6.1).



Abb. 9

**Abb. 9:** Ang1-PCR-Produkt (schwarzer Pfeil: 330 bp) im Vergleich zu PCR-Produkten einer 1:2-Verdünnungsreihe des Ang1-Kompetitors (weißer Pfeil: 296 bp). M: 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard, Ø: Negativkontrolle ohne cDNA.

Entsprechend führte die PCR von Ang2-cDNA mit den Primern 5'-ang2 und dem kompetitorspezifischen k-3'-ang2 zu einem einzelnen Fragment mit einer Länge von 425 bp. Nach einer PCR mit diesem aufgereinigten Fragment als Matrize und den Ang2-Primern erhielt man ausschließlich Ang2-Kompetitorfragmente der gleichen Länge (s. Abb. 10). Weder nach PCR von Ang1-Kompetitor als cDNA mit Ang2-Primern noch nach PCR von Ang2-Kompetitor als cDNA mit Ang1-Primern erhielt man ein Signal in der Gelelektrophorese.

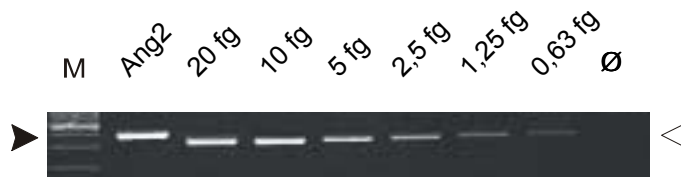


Abb. 10

**Abb. 10:** Ang2-PCR-Produkt (schwarzer Pfeil: 488 bp) im Vergleich zu PCR-Produkten einer 1:2-Verdünnungsreihe des Ang2-Kompetitors (weißer Pfeil: 425 bp). M: 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard, Ø: Negativkontrolle ohne cDNA.

### 3.2 mRNA-Expression von Ang1 und Ang2

Um die Integrität der cDNA und den Gehalt der genannten Faktoren abzuschätzen, wurden qualitative Analysen der mRNA-Expression von Ang1, Ang2 und GAPDH mittels PCR (s. 3.1) durchgeführt. Während das PCR-Signal für GAPDH zu jedem Zeitpunkt ungefähr gleich stark war, änderten sich die Signale für Ang1 und Ang2 in den Proben aus unterschiedlich langer Kultivierung auf der CAM (s. Abb. 11).

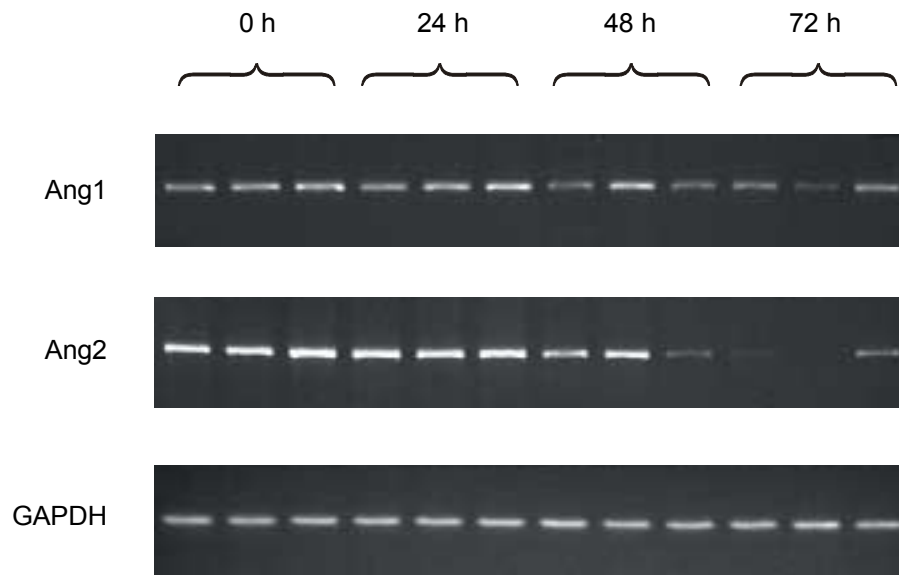


Abb. 11

**Abb. 11:** Qualitative Analysen der mRNA-Expression von Ang1-, Ang2- und GAPDH. Abgebildet sind Gelelektrophoresen von Ang1-, Ang2- und GAPDH-PCR-Produkten nach PCR mit cDNA von Endometriumfragmenten einer Patientin, die 0 h, 24 h, 48 h und 72 h auf der CAM kultiviert wurden. Die schwächeren Ang2-Banden in den 72-h-Proben sind PCR-Artefakte, wie sich nach Wiederholung der PCR und nach kompetitiver PCR zeigte.

Mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR wurden die mRNA-Konzentrationen von Ang1, Ang2 und GAPDH aus den Endometriumtransplantaten ermittelt. Die abgebildeten Gelelektrophoresen (s. Abb. 12-14) zeigen repräsentative Resultate der kompetitiven PCR.

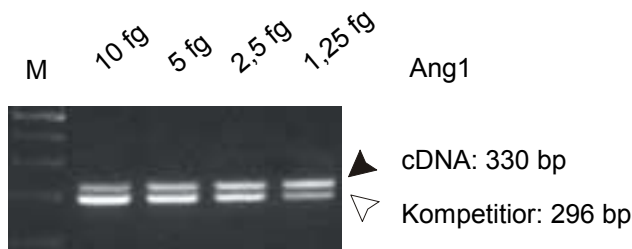


Abb. 12

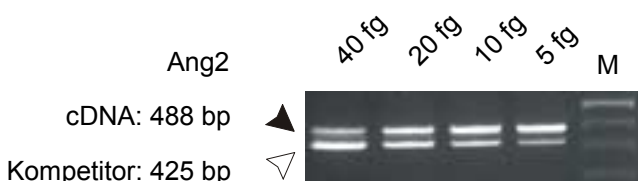
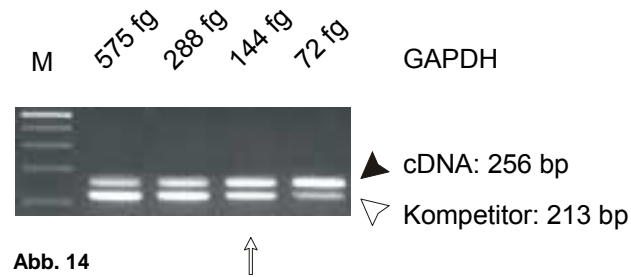


Abb. 13



**Abb. 12-14:** Agarosegele mit PCR-Produkten von kompetitiven PCR. Abb. 12: Ang1, Abb. 13: Ang2, Abb. 14: GAPDH. Die oberen Banden entsprechen der cDNA, die von der Endometrium-mRNA stammt, die unteren Banden entsprechen dem jeweiligen Kompetitor in einer 1:2-Verdünnungsreihe. Die Pfeile zeigen den Äquivalenzpunkt an, an dem gleiche Mengen cDNA und Kompetitor vorhanden sind. M: 100 bp DNA-Molekulargewichtstandard.



Für die Auswertung wurde der mRNA-Gehalt der Angiopoietine ins Verhältnis zum GAPDH-Wert der entsprechenden Probe gesetzt, um die Ergebnisse für unterschiedlich große Transplantate vergleichbar zu machen. Dabei zeigte sich, dass der Gehalt an Ang1-mRNA im nicht-kultivierten Endometrium (0 h) am höchsten war und nach 24 h Kultivierung auf der CAM signifikant absank ( $P < 0,001$ ). Im weiteren Verlauf der Kultivierung blieb dieser Wert niedrig, und es kam zu keiner signifikanten Änderung (s. Abb. 15).

Der Median der Ang1-Konzentration betrug im Endometrium zum Zeitpunkt 0 h 5,07 amol Ang1-mRNA/fmol GAPDH-mRNA (Streubreite: 0,51-22,53), im Endometrium nach 24 h Kultivierung auf der CAM 0,31 (0,05-1,69) amol Ang1-mRNA/fmol GAPDH-mRNA, nach 48 h 0,19 (0,04-1,27) amol Ang1-mRNA/fmol GAPDH-mRNA und nach 72 h 0,25 (0,02-1,68) amol Ang1-mRNA/fmol GAPDH-mRNA.

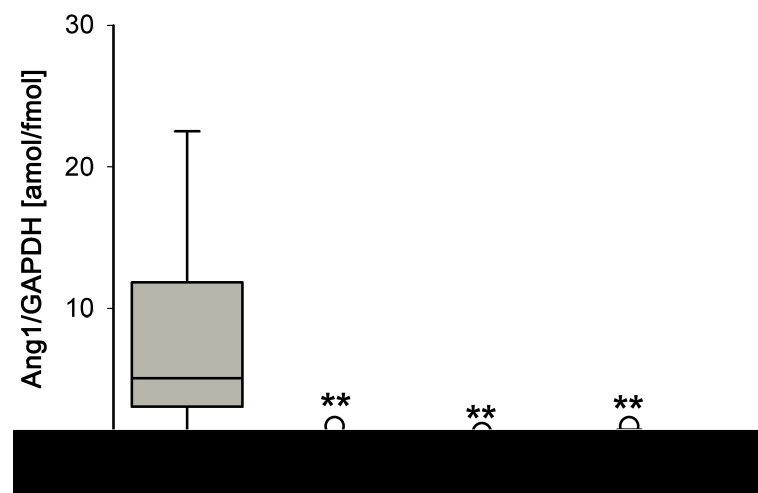


Abb. 15

**Abb. 15:** Konzentration von Ang1-mRNA in humanen Endometriumtransplantaten nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Kultivierung auf der CAM. Die Werte für die Ang1-mRNA sind auf den GAPDH-Gehalt der einzelnen Probe normiert. Der Median des Verhältnisses beträgt nach 0 h 5,07 amol Ang1-mRNA/fmol GAPDH-mRNA. Im Vergleich zu diesem Wert fällt das Verhältnis im weiteren Verlauf signifikant ab. (0 h und 72 h:  $n = 13$ , 24 h und 48 h:  $n = 14$ ; Boxplot zeigt Median mit 25er und 75er Perzentilen; Fehlerbalken entsprechen 10er und 90er Perzentilen; Ausreißer = O; \*\*  $P < 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test)

Der Gehalt an Ang2-mRNA war ebenfalls am höchsten im Endometrium zum Zeitpunkt 0 h. Nach längerer Kultivierung des Endometriums nahm er in den Transplantaten ab. In den ersten 24 h kam es zu keiner signifikanten Änderung im Vergleich zur Ang2-mRNA-Konzentration im eutopen Endometrium ( $P = 0,4$  nach 24 h). Nach 48 h und 72 h kam es allerdings zu einer signifikanten Abnahme im Vergleich zum 0 h-Wert ( $P < 0,05$  nach 48 h,  $P < 0,001$  nach 72 h; s. Abb. 16).

Der Median der Ang2-Konzentration betrug im Endometrium zum Zeitpunkt 0 h 126,1 (7,88-252,1) amol Ang2-mRNA/fmol GAPDH-mRNA und im Endometrium nach 24 h Kultivierung auf der CAM 79,4 (9,00-158,0) amol Ang2-mRNA/fmol GAPDH-mRNA, nach 48 h 47,4 (3,36-474,0) amol Ang2-mRNA/fmol GAPDH-mRNA sowie nach 72 h 7,56 (0,76-63,0) amol Ang2-mRNA/fmol GAPDH-mRNA.

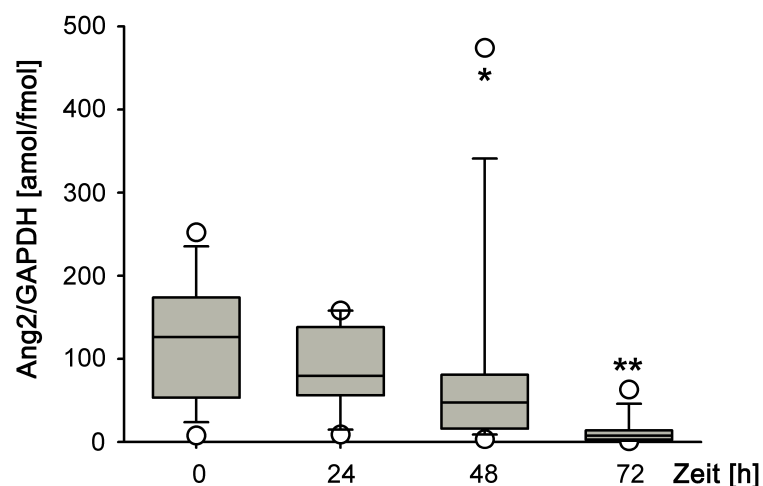


Abb. 16

**Abb. 16:** Konzentration von Ang2-mRNA in humanen Endometriumtransplantaten nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Kultivierung auf der CAM. Die Werte für die Ang2-mRNA sind auf den GAPDH-Gehalt der einzelnen Probe normiert. In den ersten 24 h kommt es zu keiner signifikanten Änderung. Nach 48 h und 72 h sinkt das Verhältnis Ang2-mRNA/GAPDH-mRNA im Vergleich zum 0 h-Wert signifikant ab. (0 h und 24 h:  $n = 13$ , 48 h:  $n = 15$ , 72 h:  $n = 14$ ; Boxplot zeigt Median mit 25er und 75er Perzentilen; Fehlerbalken entsprechen 10er und 90er Perzentilen; Ausreißer = O; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test)

Außerdem wurde für jedes Präparat der Quotient aus dem Ang2-mRNA-Gehalt und dem Ang1-mRNA-Gehalt gebildet, um das funktionelle Verhältnis beider Angiopoietine beurteilen zu können. Zu jedem Zeitpunkt enthielten alle Proben mehr Ang2- als Ang1-mRNA. Der Median lag im Endometrium zum Zeitpunkt 0 h bei 18,65 (4,7-93,51) fmol Ang2-mRNA/fmol Ang1-mRNA. Der höchste

Unterschied konnte nach 24 h Kultivierung auf der CAM gemessen werden, als der Median des Ang2/Ang1-Verhältnisses 282,80 (31,09-1468,90) fmol Ang2-mRNA/fmol Ang1-mRNA betrug. Das Verhältnis beider Angiopoietine stieg in den ersten 48 h im Vergleich zum 0 h-Wert signifikant an ( $P < 0,001$ ). Im Vergleich zum 48 h-Wert von 188,03 (63,80-621,70) fmol Ang2-mRNA/fmol Ang1-mRNA sank der Wert des Ang2/Ang1-Verhältnisses nach 72 h signifikant ab auf 18,70 (6,00-248,70) fmol Ang2-mRNA/fmol Ang1-mRNA ( $P < 0,003$ ). Verglichen mit dem 0 h-Wert änderte sich das Verhältnis nach 72 h jedoch nicht signifikant ( $P = 0,5$ ; s. Abb. 17).

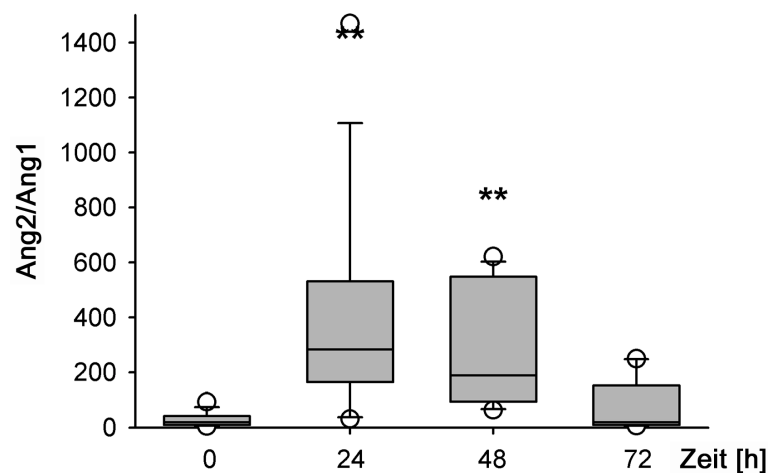


Abb. 17

**Abb. 17:** Verhältnis von Ang2-mRNA und Ang1-mRNA in humanen Endometriumtransplantaten nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Kultivierung auf der CAM. Im Vergleich zum 0 h-Wert steigt das Verhältnis während der ersten 48 h Kultivierung signifikant an. Das Verhältnis nach 72 h unterscheidet sich nicht signifikant vom 0 h-Wert. (0 h, 24 h und 72 h:  $n = 13$ , 48 h:  $n = 14$ ; Boxplot zeigt Median mit 25er und 75er Perzentilen; Fehlerbalken entsprechen 10er und 90er Perzentilen; Ausreißer = O; \*\* $P < 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test)

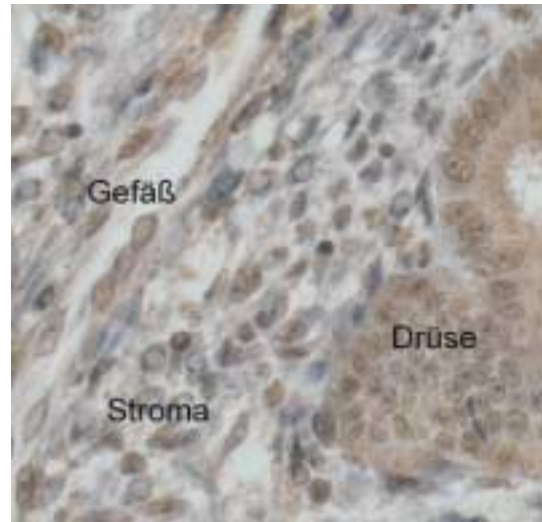
### 3.3 Proteinexpression von Ang1 und Ang2

Endometriumproben von zwei der fünf Patientinnen wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht, um die Proteinexpression und -lokalisierung von Ang1 und Ang2 im Zeitverlauf zu beobachten. Von den insgesamt 20 paraffinierten Gewebeproben wurde nicht in allen Schnitten ausreichend endometriales Drüsen- und Stromagewebe getroffen, deshalb wurden exemplarisch insgesamt zwölf (Ang1), bzw. neun (Ang2) Gewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt.



**Abb. 18**

**Abb. 18:** Humanes Endometrium in einer Negativkontrolle aus einer Färbeserie für Ang1. Der Primärantikörper wurde durch Puffer ersetzt. Es ist kein braunes immunhistochemisches Signal erkennbar (Vergrößerung X 100).



**Abb. 19**

**Abb. 19:** Humanes Endometrium in einer Positivkontrolle aus einer Färbeserie für Ang1. Die durch DAB braun gefärbten Bereiche stellen das positive Signal dar. Ang1-Protein ist lokalisiert im Drüsenepithel, im Stroma und im Gefäßendothel (Vergrößerung X 200).



**Abb. 20**

**Abb. 20:** Humanes Plazentagewebe in einer Negativkontrolle aus einer Färbeserie für Ang2. Der Primärantikörper wurde durch Puffer ersetzt. Es ist kein braunes positives Signal erkennbar (Vergrößerung X 100).



**Abb. 21**

**Abb. 21:** Humanes Plazentagewebe in einer Positivkontrolle aus einer Färbeserie für Ang2. Der Synzytiotrophoblast reagierte in der IHC-Färbung positiv für Ang2-Protein (Vergrößerung X 100).



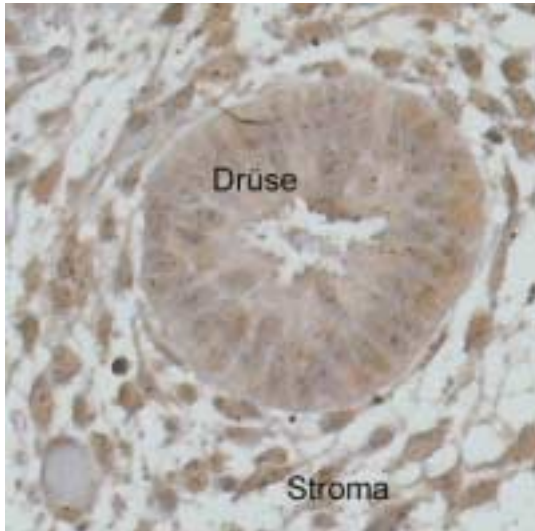
Als Positivkontrollen diente normales Endometriumgewebe und Plazentagewebe, in denen beide Angiopoietine bereits nachgewiesen wurden (Dunk et al. 2000; Krikun et al. 2000; Hewett et al. 2002; Wulff et al. 2002). Als Negativkontrollen wurde Plazenta- bzw. Endometriumgewebe verwandt, bei dem der betreffende Primärantikörper weggelassen wurde (s. Abb. 18-21).

Positiv für Ang1 reagierten elf, für Ang2 acht Präparate. Tab. 2 zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen unter Berücksichtigung der Kultivierungsdauer der Endometriumfragmente auf der CAM.

Dauer der CAM-Kultivierung	Ang1		Ang2	
	Anzahl der gefärbten Schnitte	Positiv reagierende Schnitte	Anzahl der gefärbten Schnitte	Positiv reagierende Schnitte
0 h	3	3	1	1
24 h	5	4	5	5
48 h	2	2	2	1
72 h	2	2	1	1

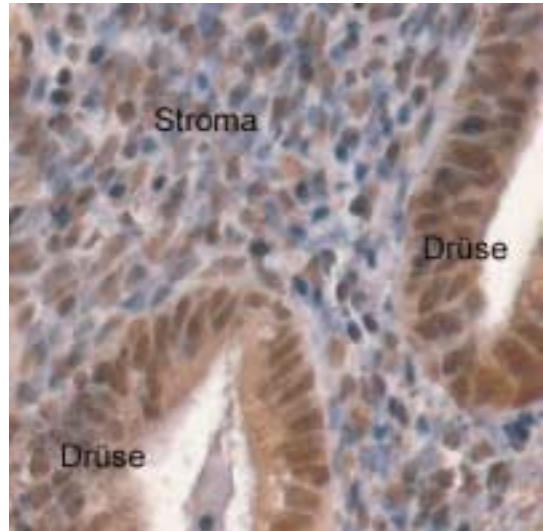
Tab. 2

Ang1 wurde in Drüsen- und Stromazellen von elf verschiedenen Gewebeproben detektiert. Es war hauptsächlich am Rand des Transplantates in der Nähe des CAM-Gewebes lokalisiert. In diesem Bereich erschien die Ang1-Immunoreaktivität stärker zu sein als die von Ang2. Ang2 wurde ebenfalls in Drüsenzellen (n = 5) und Stromazellen (n = 7) gefunden. Seine Immunoreaktivität wies ein eher fokales oder punktuelleres Muster auf als diejenige von Ang1. Es bestand keine offensichtliche Korrelation zwischen der Ang1- oder Ang2-Immunoreaktivität und der Dauer der Kultivierung auf der CAM. Beispiele für beide immunhistochemischen Färbungen zeigen Abb. 22-25.



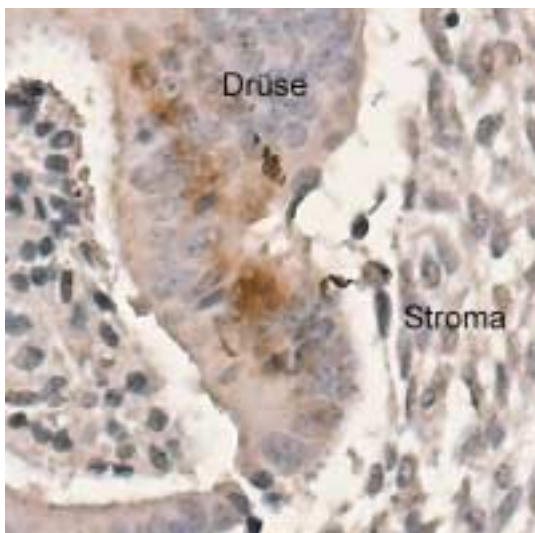
**Abb. 22**

**Abb. 22:** Immunhistochemie für Ang1. Humanes Endometrium vor Transplantation auf die CAM (0 h-Wert). Positiv reagierten Drüsenepithelzellen, Zellen im Stroma und Endothelzellen (fehlen auf der Abbildung; Vergrößerung X 200).



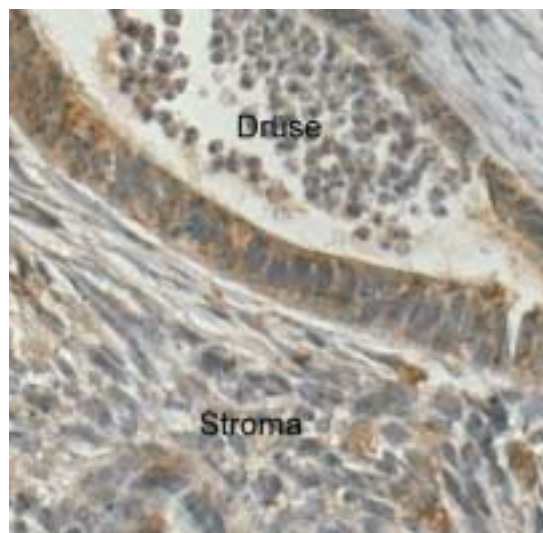
**Abb. 23**

**Abb. 23:** Immunhistochemie für Ang1. Humanes Endometrium nach 24 h Kultivierung auf der CAM. Positiv reagierten Drüsenepithelzellen und Zellen im Stroma (Vergrößerung X 200).



**Abb. 24**

**Abb. 24:** Immunhistochemie für Ang2. Humanes Endometrium vor Transplantation auf die CAM (0 h-Wert). Das Drüsenepithel weist punktuell ein positives Signal auf, Zellen im Stroma sind schwach positiv (Vergrößerung X 200).



**Abb. 25**

**Abb. 25:** Immunhistochemie für Ang2. Humanes Endometrium nach 72 h Kultivierung auf der CAM. Positiv reagierten Drüsenepithelzellen und Zellen im Stroma (Vergrößerung X 200).

## 4 Diskussion

Bei der Entstehung von endometriotischen Läsionen ist der Vorgang der Implantation der wesentliche Schritt, der darüber entscheidet, ob ektope Endometriumzellen zum Krankheitsbild der Endometriose führen oder nicht. Für diesen Prozess ist eine suffiziente Angiogenese essentiell (Nisolle und Donnez 1997; McLaren 2000). Sie wird reguliert durch ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl angiogenetischer Faktoren. Unter ihnen sind das VEGF, das Ang1 und das Ang2 vielfach untersucht worden. Dennoch ist über die Rolle der Angiopoietine im Zusammenhang mit der Entstehung der Endometriose noch wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein dynamisches Modell der Endometriose, das Chorioallantoismembran (CAM)-Modell genutzt, um den Implantationsprozess anhand der Expression von Ang1 und Ang2 in Endometriumproben zu untersuchen.

Mit der Applikation menschlichen Endometriums auf die CAM wird ein wichtiges Charakteristikum der Transplantationstheorie nachgestellt, nämlich die ektope Kultivierung von Endometrium auf einer Membran außerhalb des Uterus. Auf der CAM unterliegt das Endometrium ähnlichen Gegebenheiten wie Endometriumfragmente auf dem Peritoneum des kleinen Beckens, wo sich Endometrioseläsionen am häufigsten ausbilden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein geeignetes Endometriosemodell handelt, dessen Ergebnisse auch klinische Relevanz haben (Malik et al. 2000a; Malik et al. 2000b). Das Modell ermöglicht es, die Eigenschaften von ektopem Endometrium während der frühen Vorgänge bei der Implantation zu untersuchen. Innerhalb von 72 h nach Transplantation von humanem Endometrium auf die CAM entwickeln sich Endometriose-ähnliche Läsionen (Maas et al. 2001). Um die Vorgänge im Zusammenhang mit dieser Entwicklung zu untersuchen, wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit als Beobachtungszeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Transplantation gewählt.

Andere *in vivo* Modelle für die Endometriose sind an Tierversuche gebunden, wohingegen das CAM-Modell als Tierversuchersatzmodell anerkannt ist. Beispielsweise wurde humanes Endometrium in die Peritonealhöhle von immundefizienten Mäusen implantiert (Nisolle et al. 2000). Auch die Transplantation von Endometrium in die Peritonealhöhle von Kaninchen

(Dunselman et al. 1989) und Ratten (Sharpe et al. 1991) und die subkutane Injektion von humanem Endometrium in Mäuse mit kongenitalen Immundefekten (Aoki et al. 1994), wurden zur Nachahmung der Vorgänge während der Entstehung von Endometriose benutzt. Das CAM-Modell bietet im Gegensatz zu diesen Modellen die Möglichkeit, das transplantierte Material direkt zu beobachten, die Angiogenese als dynamischen Prozess zu verfolgen und das Wachstum des Gewebes durch lokale Applikation von Modulatoren zu beeinflussen. Außerdem ist das CAM-Modell mit einem geringeren technischen Aufwand und mit niedrigeren Kosten verbunden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Ang1- und Ang2-mRNA sowie -Protein in humanem Endometrium vor und erstmals auch 24 h, 48 h und 72 h nach Applikation auf die CAM nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen eine stärkere Expression von Ang2-mRNA als Ang1-mRNA im eutopen Endometrium und im Endometrium auf der CAM. Während des Kultivierungsprozesses wurde die Expression von Ang1-mRNA nahezu vollständig herabreguliert, während die Expression von Ang2-mRNA anfangs persistierte und erst später und langsamer abfiel. Über die Funktion von Ang1 ist bekannt, dass es durch Interaktionen zwischen Endothel und umgebender Zellmatrix an der Ausdifferenzierung und Reifung der Gefäße beteiligt ist (Suri et al. 1996). Beide Angiopoietine konkurrieren als kompetitive Antagonisten um den gleichen Rezeptor, Tie-2. Auf Endothelzellen führt Ang1 zu dessen Aktivierung, Ang2 hingegen nicht (Maisonpierre et al. 1997). Ang2 bewirkt in Gegenwart von VEGF die Entstehung neuer Gefäßausprossungen, indem es das Gefäßstabilisierende Signal von Ang1 blockiert. In Zonen, in denen Ang2 so zur lokalen Destabilisierung der Gefäßwand führt, kommt es durch den Einfluss von VEGF zur Einwanderung von Endothelzellen und zu deren Proliferation (Maisonpierre et al. 1997; Davis und Yancopoulos 1999). Das quantitative Verhältnis von Ang2 zu Ang1 scheint also eine wichtige Rolle in der Regulation der Gefäßreifung und Stabilisierung zu spielen. In der vorliegenden Arbeit stieg das Verhältnis der Ang2- zur Ang1-mRNA-Konzentration in den Endometriumtransplantaten mit einem Maximum nach 24 h Kultivierung auf der CAM signifikant an. Parallel zu den hier dargestellten Resultaten kommt es zu einem Anstieg der mRNA-Expression von VEGF und MMP1 im ektopen Endometrium

auf der CAM (Kressin et al. 2001c; Wolber et al. 2003). Diese proangiogenetische Konstellation im Expressionsmuster der genannten Faktoren zeigt deutlich, dass das ektope Endometrium auf der CAM angiogenetisch aktiv ist. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass das Endometrium nach 72 h Kultivierung auf der CAM eine signifikante, messbare Angiogenese induziert (Kressin et al. 2001b).

Die hier dargestellten Ergebnisse der mRNA-Expression werden durch andere Studien bestätigt: Eine insgesamt höhere mRNA-Expression von Ang2 gegenüber Ang1 im nicht kultivierten Endometrium aus der Proliferationsphase findet sich wieder in Analysen von eutopem Endometrium, bei denen während des ganzen Menstruationszyklusses mehr Ang2- als Ang1-mRNA gemessen wurde (Li et al. 2001; Hewett et al. 2002). Greb et al. haben einen biphasischen Verlauf des Verhältnisses von Ang2- zu Ang1-mRNA parallel zum Verlauf der VEGF-mRNA-Expression beobachtet. Dabei korreliert das eine Expressionsmaximum der genannten Faktoren mit der Gefäßregeneration in der frühen Proliferationsphase und das andere mit der funktionellen Gefäßreifung während der Sekretionsphase (Greb et al. 2001). Diese Ergebnisse weisen auf ein Überwiegen der Ang2- über die Ang1-mRNA-Expression in retrograd menstruierten Endometriumfragmenten zum Implantationszeitpunkt während der Entstehung von Endometrioseläsionen hin. Das oben beschriebene Muster der Ang1-, Ang2- und VEGF-Expression wurde auch in anderen Arbeiten als Parameter einer angiogenetischen Aktivität interpretiert. So zeigen Ergebnisse von Goede et al. am Beispiel des Ovars, dass während der Luteolyse das Ang2/Ang1-Verhältnis stark ansteigt. Parallel dazu sinkt die VEGF-Expression. Dies wurde als mögliche Ursache für die Regression von Corpus-luteum-Kapillaren interpretiert (Goede et al. 1998).

In den in dieser Arbeit untersuchten Endometriumfragmenten auf der CAM sanken die mRNA-Konzentrationen beider Angiopoietine nach längerer Kultivierung ab. Als Gründe dafür könnte man eine generelle Herabregulation der Genexpression oder das Absterben der Transplantate annehmen. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen. Die Kultivierung der Endometriumfragmente erfolgte nach den Bedingungen, für die

Malik et al. die besten Vitalitätszeichen des Gewebes festgestellt hatten (Malik et al. 2000a). Es wurden nur Transplantate untersucht, die auf der CAM weißlich bis hellrosa erschienen. Abgestorbenes Material, das sich 1-2 Tage nach Transplantation auf die CAM schwarz verfärbte, wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen. Darüber hinaus blieb die mRNA-Expression von GAPDH über den Zeitraum der Kultivierung nahezu konstant. In derselben Versuchsreihe zeigte sich sogar ein Anstieg der VEGF- und MMP1-mRNA-Expression in den Endometriumtransplantaten (Kressin et al. 2001c; Wolber et al. 2003). Diese Resultate widersprechen einem Absterben des Endometriums auf der CAM oder einer allgemeinen Herabregulation der Genexpression in den Transplantaten.

Für die im Verlauf der Kultivierung auftretende Verringerung der absoluten Ang1- und Ang2-mRNA-Konzentration in den Transplantaten sind verschiedene Ursachen denkbar. Es ist bekannt, dass beide Angiopoetine vorwiegend in Gefäß-assoziierten Zellen wie Perizyten und glatten Muskelzellen und zumindest Ang2 auch in Endothelzellen produziert werden (Davis et al. 1996; Suri et al. 1996, Maisonpierre et al. 1997; Mandriota und Pepper 1998; Kim et al. 2000a). Da die endometrialen Gefäße in den Transplantaten zu Beginn der Kultivierung nicht mit den CAM-Gefäßen in Verbindung stehen, verlieren sie möglicherweise ihre Funktion und gehen zugrunde. Dies wird erhärtet durch Untersuchungen zur Kapillardichte, die zeigen, dass die Immunoreaktivität für den endothelzellspezifischen Faktor VIII in den Transplantaten im Gegensatz zum eutopen Endometrium schwächer ist (Malik et al., unveröffentlicht). Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen der regredienten Gefäße fallen nun wahrscheinlich als Produktionsorte für Ang1 und Ang2 aus, und ihre mRNA-Konzentrationen im gesamten Endometriumfragment sinken. Daneben wurde mit den hier verwendeten Methoden die mRNA-Konzentration gemessen, die alle Zellen im Transplantat gemeinsam bildeten. Dabei konnte nicht berücksichtigt werden, wie hoch der mRNA-Gehalt in einzelnen Zellen war. Für Ang2 wird ein fokales Expressionsmuster beschrieben (Maisonpierre et al. 1997). Es könnte sein, dass die Expression der Ang2-mRNA auch innerhalb eines Transplantates ein inhomogenes Verteilungsmuster aufweist mit Bereichen mit hoher Ang2-mRNA-Expression bis hin zu Bereichen ohne Ang2-mRNA-Expression. Wenn wenige Zellen lokal relativ viel Ang2-mRNA

produzieren würden, worauf die Ergebnisse der IHC-Färbungen (s. 3.3) hinweisen, könnte die Konzentration verteilt auf das ganze Transplantat trotzdem niedrig sein. Protein- und mRNA-Gehalt müssen allerdings nicht unbedingt parallel verlaufen. mRNA reagiert sehr empfindlich auf sie zerstörende RNAsen und besitzt eine kürzere Halbwertszeit als Proteine. Deshalb geht ein Abfall der mRNA-Konzentration nicht zwingend mit einem gleichzeitigen Abfall der Proteinkonzentration einher. Leider konnte der Proteingehalt aus methodischen Gründen nicht quantifiziert werden (s. u.).

Möglicherweise spielen noch andere Faktoren für die Regulation der Expression von Ang1- und Ang2-mRNA in den Endometriumtransplantaten eine Rolle. In den vorgestellten Ergebnissen sank die Ang1-mRNA-Konzentration schon nach 24 h Inkubation auf der CAM sehr stark ab und blieb während der nächsten 48 h konstant niedrig. Das Ang1-Signal scheint nach Transplantation auf die CAM „abgestellt“ worden zu sein. Demgegenüber war die Ang2-mRNA-Expression nach 24 h etwa gleich hoch wie vor der Transplantation auf die CAM. Für Ang1 wird eine Verminderung der mRNA-Konzentration durch den Einfluss von Hypoxie beschrieben (Enholm et al. 1997; Ding et al. 2001). Obwohl die Hühnereier in den hier durchgeführten Versuchen unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurden, ist es möglich, dass aufgrund der limitierten Diffusionskapazität von Sauerstoff im Inneren der Endometriumfragmente hypoxische Bedingungen vorlagen. Denn die Transplantate hatten keine Verbindung zu den CAM-Gefäßen, so dass die Sauerstoffversorgung über den Blutkreislauf der Hühnerembryonen nicht möglich war. Es ist möglich, dass der niedrige Sauerstoffgehalt im Inneren des Transplantates verantwortlich für das starke Absinken der Ang1-mRNA-Expression ist.

Für Ang2 wird in verschiedenen Untersuchungen eine Hypoxie-abhängige *Induktion* der Transkription beschrieben (Mandriota und Pepper 1998; Oh et al. 1999). Trotzdem wurde in der vorliegenden Arbeit kein Anstieg der Ang2-mRNA-Expression in den kultivierten Endometriumfragmenten beobachtet. Eine Ursache dafür könnte sein, dass Ang2 zeitlich sehr früh in den Angiogenese-prozess eingebunden ist (Maisonpierre et al. 1997; Zagzag et al. 1999). In Endothelzellkulturen zeigt sich ein Maximum der Ang2-mRNA-Konzentration nach 2 h unter hypoxischen Bedingungen, während nach 4 h die Ang2-mRNA-Expression wieder auf den Ausgangswert abfällt (Oh et al. 1999). In der

vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Konzentration erst nach 24 h bestimmt, so dass nicht beurteilt werden kann, ob die Ang2-mRNA-Expression während der ersten Stunden nach Transplantation angestiegen und anschließend wieder abgesunken ist.

Da eine bestimmte mRNA-Konzentration nicht unbedingt mit der betreffenden Proteinkonzentration korreliert, wurde auch die Proteinexpression von Ang1 und Ang2 untersucht. Aufgrund der geringen Transplantatgröße konnte leider kein semiquantitatives Verfahren wie z. B. Western Blot eingesetzt werden. Deshalb wurde die Proteinlokalisierung durch Immunhistochemie(IHC)-Färbungen untersucht. Dabei wurden beide Angiopoetine im eutopen und im ektopen Endometrium auf der CAM bis 72 h nach der Transplantation in Drüsen und Stroma nachgewiesen. In einigen Schnitten wurde kein Protein gefunden. Parallel dazu wiesen die mRNA-Konzentrationen in den Endometriumfragmenten starke Schwankungen auf. Es ist möglich, dass in Transplantaten mit niedriger mRNA-Konzentration auch der Proteingehalt sehr gering war und deshalb nicht mittels IHC nachgewiesen werden konnte. Die Intensität der Immunoreaktivität wies für beide Angiopoetine keine Korrelation zur Dauer der Kultivierung auf der CAM auf. Dies könnte daran liegen, dass die im Gewebeschnitt erfassten Transplantatbereiche sehr unterschiedlich groß waren und dass darin nicht immer gleich viele Drüsen und gleich viel Stroma vorhanden waren, was eine Beobachtung der zeitlichen Veränderung der Proteinexpression nicht erlaubte.

Weiterhin ist für die Analyse der Proteinexpression im Zeitverlauf die Berücksichtigung des Einflusses von Transkriptionsfaktoren, posttranslationalen Modifizierungen oder Eigenschaften wie der Protein-Halbwertszeit, die an der Regulation der Proteinexpression beteiligt sind, bedeutsam. Diese können aus der immunhistologischen Untersuchung jedoch ebenfalls nicht ersehen werden. Deshalb wurde eine qualitative Beschreibung der IHC-Färbungen einer quantitativen Auswertung vorgezogen. Beide Proteine wurden im Stroma und im Drüsenepithel gefunden. Die Immunoreaktivität für Ang2 zeigte ein fokales Muster, z. B. in einzelnen Drüsenzellen, wohingegen ganze Drüsen positiv für Ang1 waren. Ein ähnlich punktuell Expressionmuster von Ang2 wurde bereits im Ovar beobachtet und als Zeichen dafür interpretiert, dass Ang2 nur



an eng umgrenzten Stellen das Ang1-Signal blockiert und zur Destabilisierung von Gefäßen führt (Maisonpierre et al. 1997). Ebenso beschreiben Kressin et al. das Expressionsmuster von Ang2-Protein in den verschiedenen Manifestationsformen von Endometrioseherden (braun, weiß, rot, andere nicht-pigmentierte) (Kressin et al. 2001a). Dort ist das Protein hauptsächlich in endo- und periendothelialen Zellen der Endometrioseläsionen lokalisiert, aber eine fokale Immunreaktivität für Ang2 zeigt sich auch in Stroma und Drüsenepithelzellen.

Wie oben bereits erwähnt wurde, hatten die Endometriumgefäße in den Transplantaten keine primäre Verbindung zur Blutzirkulation der CAM, so dass es zur Gefäßregression darin kam. Im Transplantat fehlten regelrechte Gefäße, deshalb konnte keine Angiopoietin-Proteinexpression in Endothel- oder in periendothelialen Zellen beobachtet werden. Anders als in den Endometriumfragmenten auf der CAM wurden Ang1 und Ang2 im nicht-kultivierten Endometrium auch in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen nachgewiesen, wie es den publizierten Expressionsorten der Angiopoietine entspricht (Davis et al. 1996; Maisonpierre et al. 1997). Im Endometrium auf der CAM hingegen war besonders die Immunreaktivität für Ang1 am Rand der Transplantate, wo die Versorgung des ektopen Gewebes über Diffusion vom CAM-Gewebe übernommen wird, stärker als im Zentrum.

In der gegenwärtigen Literatur finden sich hinsichtlich der Lokalisation und der Produktionsorte von Angiopoietinen im Endometrium widersprüchliche Angaben. Mittels *in-situ*-Hybridisierung entdeckten Li et al. Ang2-mRNA während der Sekretionsphase ausschließlich in den uterinen NK-Zellen im Endometriumstroma (Li et al. 2001). Die Hybridisierung während der Proliferationsphase, aus der auch das Endometrium in der hier vorliegenden Arbeit stammt, war schwächer, aber nicht auf einzelne Zelltypen beschränkt. Da in der vorliegenden Arbeit die Zellen im Stroma nicht näher spezifiziert wurden, kann über die NK-Zellen keine genaue Aussage gemacht werden. Mit immunhistochemischen Methoden fanden Krikun et al. in humanem Endometrium eine schwache Immunreaktivität für Ang1- und Ang2-Protein im Stroma (Krikun et al. 2000). In Endothelzellen war das Signal für Ang1-Protein ebenfalls schwach, für Ang2-Protein war es intensiv. Die Expression von Ang2-Protein war während der Proliferations- und Sekretionsphase ähnlich hoch. Die

Proteinexpression von Ang1 wurde ausschließlich während der Sekretionsphase untersucht. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit angefertigten IHC-Färbungen fanden Krikun et al. keine Immunoreaktivität im Drüsenepithel. Die Proteinexpression der Angiopoietine im Drüsenepithel wird in einer Untersuchung von Hewett et al. allerdings bestätigt (Hewett et al. 2002). So wurden Ang1 und Ang2 mittels IHC im Stroma, im Drüsenepithel und im Endothel der Blutgefäße lokalisiert. Dabei war die Immunoreaktivität im Stroma für beide Angiopoietine während der Sekretionsphase schwächer als in der Proliferationsphase. Das Signal für Ang2 war im Drüsenepithel besonders intensiv.

Die zitierten Arbeiten widersprechen sich zwar teilweise bezüglich der Lokalisation der Angiopoietine, sie belegen aber, dass das Angiopoietin-System auch im humanen Endometrium aktiv ist. Abweichungen von den physiologischen Interaktionen der Angiopoietine mit dem VEGF tragen möglicherweise zur Ausbildung pathologischer Prozesse bei.

Über die Angiopoietin-Expression in Endometrioseläsionen ist noch nicht viel bekannt. Wie oben bereits erwähnt, lässt sich Ang2-Protein mittels IHC im Endothel und in Perizyten, aber auch im Stroma und in Drüsen von Endometriosebiopsien finden (Kressin et al. 2001a). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Malik zeigen immunhistochemisch Unterschiede in der Expression von Ang2 und VEGF in den verschiedenen Läsionsarten der Endometriose. Die in den schleierartigen Läsionen am stärksten ausgeprägte VEGF-Expression nimmt über die bläschenartigen, roten, weißen, und braunen Läsionen hin ab. Parallel fällt auch die Expression von Ang2 von den schleierartigen über die bläschenartigen bis zu den roten Herden ab. Sie steigt jedoch in den weißen und braunen Läsionen wieder an. Diese Expressionsmuster wurden interpretiert als Ausdruck einer proangiogenetischen Situation in den schleierartigen Herden, deren Stärke in den bläschenartigen, roten, weißen bis hin zu den braunen Herden abnimmt. Die verstärkte Angiogenese in den schleier- und bläschenartigen sowie den roten Läsionen gilt als Ausdruck einer höheren Aktivität dieser Läsionsarten (Nisolle et al. 1993; Donnez et al. 1998). Durch Untersuchungen mit RT-PCR fanden Greb et al. eine höhere Ang2-mRNA-Expression in Endometrioseläsionen im Vergleich zu eutopem Endo-

metrium (Greb et al. 2001). Ein Anstieg der Ang2-mRNA-Konzentration im ektopen Endometrium auf der CAM wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Dabei ist zu beachten, dass bei den von Greb untersuchten Endometrioseläsionen in die Analysen wahrscheinlich auch unmittelbar angrenzendes Peritoneum miteinbezogen wurde. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wo die Angiogenesefaktoren gebildet werden, die an der Vaskularisierung des ektopen Endometriums beteiligt sind. Als Produktionsorte kommen z. B. das Endometriumfragment, aktivierte Makrophagen oder das umgebende Peritonealgewebe in Frage. Es ist möglich, dass Signale vom ektopen Endometriumfragment das umgebende Peritoneum zur Bildung von Angiogenesefaktoren stimulieren, die zum Einsprossen von Peritonealgefäßen in das Implantat führen. Bei der Untersuchung durch RT-PCR von humanen Endometrioseläsionen kann nicht unterschieden werden, ob die mRNA aus dem Endometriumfragment selbst oder aus dem angrenzenden Peritoneum stammt. Hingegen wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die mRNA des Transplantates analysiert. Die PCR-Bedingungen wurden spezifisch für die menschliche cDNA gewählt, während die CAM als Korrelat zum Peritoneum vom Hühnerembryo stammt. Zukünftige Untersuchungen können zeigen, ob die CAM auf das Endometriumtransplantat mit der Bildung von Angiogenesefaktoren reagiert.

Ein anderer Aspekt bei den Untersuchungen von Greb ist, dass dort eutopes Endometrium von Frauen ohne Endometriose mit Biopsien von Endometrioseläsionen verglichen wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Endometrium von Frauen ohne Endometriose unter eutopen und unter ektopen Bedingungen auf der CAM untersucht wurde. Es stellt sich die Frage, ob eutopes Endometrium von Endometriosepatientinnen und Endometriumfragmente, die bei ihnen in die Bauchhöhle gelangen, einen höheren Gehalt an Angiogenesefaktoren aufweisen als Endometrium von gesunden Frauen. Ein höherer Ang2-Gehalt könnte durch eine Instabilisierung bestehender Peritonealgefäße zu einer leichteren Vaskularisierung der Endometriumfragmente führen. In neuen Untersuchungen von Malik et al. wurden die angiogenetischen Prozesse in auf der CAM kultivierten Endometriumfragmenten von Patientinnen mit und ohne Endometriose miteinander verglichen (zum Teil unveröffentlicht). Dabei zeigte sich jedoch

zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von VEGF, Ang1 und Ang2 sowie einem durch die Transplante induzierten Anstieg des Gefäßdichte-Indexes (Gescher et al. 2003). Diese Untersuchungen zeigen, dass die genannten Wachstumsfaktoren an der Angiogenese und Implantation von ektopem Endometrium auf der CAM beteiligt sind, dass sich aber das Endometrium von Patientinnen mit bzw. ohne Endometriose in seiner angiogenetischen Aktivität auf der CAM *per se* nicht unterscheidet. Auch wenn die Angiogenese für die Implantation von ektopen Endometriumzellen von essentieller Bedeutung ist, wird der Implantationsvorgang vermutlich durch weitere Einflussfaktoren wie z. B. Steroide oder Zytokine reguliert. Für die MMPs, die bei der Implantation von Endometrioseherden ebenfalls von Bedeutung sind (Kokorine et al. 1997; Sillem et al. 1998), konnte der regulierende Einfluss von Progesteron, Östradiol und TGF- $\beta$  bereits gezeigt werden (Osteen et al. 2002).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mRNA und Protein der Angiopoietine 1 und 2 in eutopem und auf der CAM kultiviertem Endometrium produziert werden. Der Verlauf des Verhältnisses von Ang2- zu Ang1-mRNA, das nach Kultivierung auf der CAM in den Transplantaten ansteigt, erscheint sinnvoll gemäß der gegenwärtigen Auffassung von der Wirkungsweise der Angiopoietine (Maisonpierre et al. 1997; Davis und Yancopoulos 1999) und spiegelt eine proangiogenetische Situation wider. Gemäß der Transplantationstheorie ist die Implantation von Endometriumfragmenten der entscheidende pathogene Mechanismus für die Entstehung von Endometrioseläsionen. Die Angiogenese ist für die Implantation essentiell und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Angiopoietine an der Regulation der Angiogenese im ektopen Endometrium auf der CAM beteiligt sind. Möglicherweise kann die Ang2-Expression wie die Expression anderer Wachstumsfaktoren als Parameter der Angiogenese Aussagen über die Aktivität der Endometrioseläsionen liefern (Donnez et al. 1998). In ähnlicher Weise wurde es experimentell als Prognosefaktor beim Magenkarzinom genutzt (Etoh et al. 2001). Anhand des CAM-Modells wird es außerdem möglich sein, die Angiogenese auf der CAM zu beobachten und diese durch Applikation von Angiogenese-hemmenden oder -fördernden Faktoren zu beeinflussen. Daraus könnten Erkenntnisse

gewonnen werden, ob die Beeinflussung der Angiogenese mittels neutralisierender Antikörper, löslichen Rezeptoren oder Tyrosinkinaseinhibitoren neue Therapieansätze für die Endometriose bieten können.

## 5 Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine der häufigsten benignen Erkrankungen in der Gynäkologie. Gemäß der Transplantationstheorie entsteht sie durch die retrograde Menstruation und peritoneale Implantation von Endometriumfragmenten. Für die Implantation ist die Angiogenese eine wichtige Voraussetzung, die durch die klassischen Angiogenesefaktoren VEGF, Ang1 und Ang2 vermittelt wird.

An einem Modell der Endometriose auf der Chorioallantoismembran (CAM) wurde die Expression von Ang1 und Ang2 in eutopem und ektopem Endometrium untersucht. Nach Applikation von Endometriumproben auf die CAM konnte die mRNA beider Angiopoietine in allen Transplantaten vor (0 h) und nach Kultivierung auf der CAM nachgewiesen werden. Ihre Konzentration war im eutopen Endometrium (0 h) am höchsten und sank nach 24 h (Ang1), bzw. 48 h (Ang2) Kultivierung signifikant ab. Im Vergleich zum eutopen Endometrium stieg das Verhältnis von Ang2- zu Ang1-mRNA-Konzentration nach 24 h und 48 h Kultivierung signifikant an. In dem kultivierten Endometrium veränderte sich die mRNA-Konzentration der Angiopoietine somit zugunsten eines Übergewichts von Ang2. Das Protein beider Angiopoietine wurde im eutopen und im ektopen Endometrium nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierung auf der CAM immunhistochemisch nachgewiesen. Dabei bestand keine Korrelation zwischen der Ang1- oder Ang2-Immunoreaktivität und der Dauer der Kultivierung.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Angiopoietine im eutopen Endometrium und in Endometriumfragmenten nach Kultivierung auf einer ektopen Membran gebildet werden. Dabei entspricht der Verlauf des Expressionsmusters des Ang2/Ang1-Verhältnisses der gegenwärtigen Auffassung von der Wirkungsweise der Angiopoietine und spiegelt eine proangiogenetische Situation wider. Ang1 und Ang2 sind somit vermutlich an der Regulation der Angiogenese im ektopen Endometrium beteiligt und spielen in diesem Zusammenhang bei der Pathogenese der Endometriose eine Schlüsselrolle.

## 6 Literaturverzeichnis

Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C und Nozawa S. Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol*, 83(2):220-8, 1994.

Ausprunk DH, Knighton DR und Folkman J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol*, 79(3):597-628, 1975.

Brooks PC, Clark RA und Cheresh DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  for angiogenesis. *Science*, 264(5158):569-71, 1994a.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G und Cheresh DA. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79(7):1157-64, 1994b.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W und Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573):435-9, 1996.

Carmeliet P und Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801):249-57, 2000.

Chomczynski P und Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156-9, 1987.

Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM und Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*, 53(6):978-83, 1990.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC und Yancopoulos GD. Isolation of

angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87(7):1161-9, 1996.

Davis S und Yancopoulos GD. The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237:173-85, 1999.

Ding H, Roncari L, Wu X, Lau N, Shannon P, Nagy A und Guha A. Expression and hypoxic regulation of angiopoietins in human astrocytomas. *Neuro-oncol*, 3(1):1-10, 2001.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F und Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*, 13(6):1686-90, 1998.

Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J und Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*, 7(8):1471-80, 1992.

Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B und Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol*, 156(6):2185-99, 2000.

Dunselman GA, Willebrand D, Land JA, Bouckaert PX und Evers JL. A rabbit model of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 27(1):29-33, 1989.

Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U und Alitalo K. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*, 14(20):2475-83, 1997.

Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S und Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res*, 61(5):2145-53, 2001.



Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ und Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573):439-42, 1996.

Gerlach L. Über neue Methoden auf dem Gebiet der experimentellen Embryologie. *Anat Anz*, 2:538-609, 1887.

Gescher DM, Meyhöfer-Malik A, Rath W und Malik E. mRNA Expression von Angiopoietin 1 und 2 im ektopen Endometrium auf der Chorioallantoismembran (CAM). *Geburtsh Frauenheilk*, 63:1279-1283, 2003.

Geva E und Jaffe RB. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstet Gynecol Surv*, 55(8):511-9, 2000.

Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D und Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*, 78(11):1385-94, 1998.

Greb RR, Armeanu S und Kiesel L. Angiogeneseaktivierung im eutopen und ektopen Endometrium: Expressionsprofil der molekularen Schlüssel-Mediatoren VEGF-A und der Angiopoietine. *XVII. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie*. Salzburg, 2001.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG und Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*, 64(2):151-4, 1984.

Hasson HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J Reprod Med*, 16(3):135-8, 1976.

Hazzard TM, Christenson LK und Stouffer RL. Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, 6(11):993-8, 2000.

Hewett P, Nijjar S, Shams M, Morgan S, Gupta J und Ahmed A. Down-regulation of angiopoietin-1 expression in menorrhagia. *Am J Pathol*, 160(3):773-80, 2002.

Hii LL und Rogers PA. Endometrial vascular and glandular expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in women with and without endometriosis. *Hum Reprod*, 13(4):1030-5, 1998.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD und Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284(5422):1994-8, 1999a.

Holash J, Wiegand SJ und Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, 18(38):5356-62, 1999b.

Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K und Suda T. Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 195(1):301-9, 1993.

Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis. *Cancer*, 2:399, 1949.

Khorrarn O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ und Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 169(6):1545-9, 1993.

Kiesel L, Greb R, Hornung D, Gómez-Braun A und Wallwiener D. Molekulare Aspekte zur Angiogenese und Immunologie der Endometriose. *Zentralbl Gynäkol*, 121:320-324, 1999.

Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ und Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*, 86(1):24-9, 2000a.

Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M und Koh GY. Tumor necrosis factor- $\alpha$  upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 269(2):361-5, 2000b.

Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC und Koh GY. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res*, 86(9):952-9, 2000c.

Kirshon B und Poindexter AN. Contraception: a risk factor for endometriosis. *Obstet Gynecol*, 71(6 Pt 1):829-31, 1988.

Klein NA und Olive DL. Management of endometriosis-associated infertility. In: Schlaff W D und Rock J A. *Decision making in reproductive endocrinology*. Oxford: Blackwell Scientific, 488-494, 1993.

Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U und Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol*, 8(9):529-32, 1998.

Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ und Marbaix E. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril*, 68(2):246-51, 1997.

Koks CA, Groothuis PG, Slaats P, Dunselman GA, de Goeij AF und Evers JL. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. *Fertil Steril*, 73(3):604-12, 2000.

Koyama N, Matsuura K und Okamura H. Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*, 43(1):45-50, 1993.

Kressin P, Moubayed P, Diedrich K und Malik E. Expression of angiopoietin 2 in endometriotic lesions. *Hum Reprod*, 16(Abstract Book 1):171, 2001a.

Kressin P, Wolber EM, Meyhöfer-Malik A, Diedrich K und Malik E. Differentielle Expression der Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) und der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) im ektopen Endometrium auf der Chorioallantoismembran. *XVII. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe*. Salzburg, 2001b.

Kressin P, Wolber EM, Wodrich H, Meyhöfer-Malik A, Buchweitz O, Diedrich K und Malik E. Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*, 76(6):1220-4, 2001c.

Krikun G, Schatz F, Finlay T, Kadner S, Mesia A, Gerrets R und Lockwood CJ. Expression of angiopoietin-2 by human endometrial endothelial cells: regulation by hypoxia and inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(1):159-63, 2000.

Kwak HJ, So JN, Lee SJ, Kim I und Koh GY. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett*, 448(2-3):249-53, 1999.

Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW und Smith SK. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(4):1823-34, 2001.

Lin TN, Wang CK, Cheung WM und Hsu CY. Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20(2):387-95, 2000.

Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA und Evers JL. Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod*, 16(4):627-31, 2001.

Mahnke JL, Dawood MY und Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 73(1):166-70, 2000.

Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD und Gao G. Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*, 8(6):1631-7, 1993.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN und Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(5322):55-60, 1997.

Malik E, Meyhöfer-Malik A, Berg C, Bohm W, Kunzi-Rapp K, Diedrich K und Ruck A. Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid. *Hum Reprod*, 15(3):584-8, 2000a.

Malik E, Berg C, Meyhöfer-Malik A, Buchweitz O, Moubayed P und Diedrich K. Fluorescence diagnosis of endometriosis using 5-aminolevulinic acid. *Surg Endosc*, 14(5):452-5, 2000b.

Mandriota SJ und Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res*, 83(8):852-9, 1998.

Martin DC, Hubert GD, Vander Zwaag R und el-Zeky FA. Laparoscopic appearances of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*, 51(1):63-7, 1989.

McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update*, 6(1):45-55, 2000.

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS und Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 11(1):220-3, 1996a.

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM und Smith SK. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest*, 98(2):482-9, 1996b.

Meyer R. Über den Stand der Frage Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen and insbesondere über Adenomyositis serosoepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynäkol*, 43:745, 1919.

Moen MH. Endometriosis in women at interval sterilization. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 66(5):451-4, 1987.

Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM und Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*, 59(3):681-4, 1993.

Nisolle M und Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*, 68(4):585-96, 1997.

Nisolle M, Casanas-Roux F und Donnez J. Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril*, 74(2):306-12, 2000.

Novak E. Pelvic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 22:826, 1931.

Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M und Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 274(22):15732-9, 1999.

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M und Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*, 56(1):45-51, 1991.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M und Koninckx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril*, 59(4):778-82, 1993.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M und Koninckx PR. Transforming growth factor- $\beta$  activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol*, 83(2):287-92, 1994.

Osteen KG, Bruner-Tran KL, Ong D und Eisenberg E. Paracrine Mediators of Endometrial Matrix Metalloproteinase Expression. Potential Targets for Progestin-Based Treatment of Endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 955:139-46, 2002.

Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Matsumura M und Honda Y. Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(9):1912-20, 1999.

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD und Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest*, 79(2):213-23, 1999.

Procopio WN, Pelavin PI, Lee WM und Yeilding NM. Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *J Biol Chem*, 274(42):30196-201, 1999.

Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C und Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 65(5):925-30, 1996.

Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V und Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem*, 273(14):8413-8, 1998.

Rubovits FE und Abrams BS. Human ovarian grafts onto the Chorio-allantoic-membrane of developing chick embryos. *Proc Soc Biol Med*, 77:447-451, 1951.

Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, Khorram O, Landers DV und Taylor RN. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 63(4):929-32, 1995.

Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Press, 2. Auflage, 1989.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 14:422-469, 1927.

Sato TN, Qin Y, Kozak CA und Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20):9355-8, 1993.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W und Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 376(6535):70-4, 1995.

Schweitzer R, Howes R, Smith R, Shilo BZ und Freeman M. Inhibition of Drosophila EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature*, 376(6542):699-702, 1995.

Schweppe K-W. Pathophysiologie der Endometriose. *Gynäkologe*, 22:279-288, 1989.

Schweppe K-W. Therapieprinzipien der Endometriose. *Frauenarzt*, 36(5):558-571, 1995.

Sharpe KL, Bertero MC, Muse KN und Vernon MW. Spontaneous and steroid-induced recurrence of endometriosis after suppression by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in the rat. *Am J Obstet Gynecol*, 164(1 Pt 1):187-94, 1991.

Siebert PD und Larrick JW. Competitive PCR. *Nature*, 359(6395):557-8, 1992.

Sillem M, Prifti S, Neher M und Runnebaum B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update*, 4(5):730-5, 1998.

Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update*, 4(5):509-19, 1998.

Steele RW, Dmowski WP und Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 6(1):33-6, 1984.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN und Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7):1171-80, 1996.

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN und Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282(5388):468-71, 1998.

Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S und Yancopoulos GD. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene



counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):1904-9, 1999.

van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW und Evers JL. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*, 63(6):1210-6, 1995.

van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, van der Linden EP, Ramaekers FC und Evers JL. Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril*, 61(1):85-90, 1994.

Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD und Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem*, 273(29):18514-21, 1998.

Wolber EM, Dame C, Fahnenstich H, Hofmann D, Bartmann P, Jelkmann W und Fandrey J. Expression of the thrombopoietin gene in human fetal and neonatal tissues. *Blood*, 94(1):97-105, 1999.

Wolber EM, Kressin P, Meyhöfer-Malik A, Diedrich K und Malik E. Differential induction of matrix metalloproteinase 1 and 2 in ectopic endometrium. *Reprod Biomed Online*, 6(2):238-43, 2003.

Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ und Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod*, 66(3):802-12, 2002.

Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD und Grumet M. In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp Neurol*, 159(2):391-400, 1999.

Zeng L, Dai J, Ying K, Zhao E, Jin W, Ye Y, Dai J, Xu J, Xie Y und Mao Y. Identification of a novel human angiopoietin-like gene expressed mainly in heart. *J Hum Genet*, 48(3):159-62, 2003.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. Eduard Malik danke ich für das interessante Thema, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe und ganz besonders für die stete Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen. Frau Dr. Dorothee Gescher, Frau Dr. Eva Wolber und Herrn Dr. Philip Kressin danke ich sehr für die engagierte Betreuung, für die Einarbeitung in die Thematik und Methodik und für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen. Bei Frau Dr. Annette Meyhöfer-Malik und Frau Inga Jensen bedanke ich mich für die Betreuung des CAM-Modells und für die organisatorische und fachliche Unterstützung. Herrn Prof. Wolfgang Jelkmann danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Physiologie, wo ich größtenteils die mRNA-Analysen durchgeführt habe. Zusätzlich danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie für die gute Zusammenarbeit und Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Friedrich für die Beratung in statistischen Fragen. Außerdem danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

## 7.2 Lebenslauf

<b>Name:</b>	Merle Drenkhahn
<b>Geburtsdatum:</b>	04. Oktober 1977
<b>Geburtsort:</b>	Bad Oldesloe
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Wohnort:</b>	Vogteiweg 4, 22083 Hamburg
<b>Schulbildung:</b>	1984-1988 Grund- und Hauptschule Bargteheide Land 1988-1997 Kreisgymnasium Bargteheide I Juni 1997 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
<b>Studium:</b>	Wintersemester 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  September 1999 Ärztliche Vorprüfung August 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung März 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung April 2003 – März 2004 Absolvierung des Praktischen Jahres an der Universität zu Lübeck (Innere Medizin), im Ipswich Hospital, Großbritannien (Chirurgie), in den Ostholsteinkliniken Eutin (Gynäkologie und Geburtshilfe) Mai 2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<b>Berufstätigkeit</b>	Vom 01.09.2004 – 30.09.2004 tätig als Ärztin im Praktikum und seit dem 01.10.2004 tätig als Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Asklepios Klinik Bad Oldesloe

### 7.3 Veröffentlichungen/Vorträge

Kressin Ph, Drenkhahn M, Wolber E-M, Meyhöfer-Malik A, Malik E. Expression of angiotensin-1 and angiotensin-2 in ectopic Endometrium. *European Journal of Physiology* 441; 6 Suppl.: R133, 2001.

Poster auf dem "Joint Congress of the German and Scandinavian Physiological Societies" im März 2001 in Berlin mit dem Titel "Expression of angiotensin-1 and angiotensin-2 in ectopic Endometrium"

Vortrag auf der 117. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe im Mai 2001 in Lübeck mit dem Titel „Expression von Angiotensin1 und Angiotensin 2 in eutopem und ektopem Endometrium“

Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM, Meyhöfer-Malik A, Malik E. Expression of angiotensin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril*, 81(1):869-75, 2004