

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie  
der Technischen Universität München  
Betreuer Dr. Bajram Berisha

vorgelegt über  
Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz  
Lehrstuhl für Tieranatomie II  
Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Expression von lokalen Regulationsfaktoren im Ovar des Schweins**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Vera Steinberg

aus  
Wuppertal

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München.

Dekan: Univ.- Prof. Dr. E. P. Märtelbauer  
Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz  
Korreferent: Priv. Doz. Dr. H.-Ch. Siebert

Tag der Promotion: 28.07.2006

**Meinen lieben Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Einleitung und Aufgabenstellung</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>10</b>
2.1 Der Brunstzyklus der Sau.....	10
2.1.1 Aufbau des Ovar.....	10
2.1.2 Follikulogenese und Ovulation .....	10
2.1.3 Corpus luteum und Luteolyse.....	12
2.1.4 Endokrine Regulation des Zyklus .....	13
2.2 Lokale (autokrine/parakrine) Regulation und Wachstumsfaktoren.....	17
2.2.1 Angiogenese.....	17
2.2.2 Wachstumsfaktoren.....	19
2.2.2.1 Fibroblasten Wachstumsfaktor Familie (FGF).....	20
2.2.2.2 Vasculäre Endothelzellen Wachstumsfaktor Familie (VEGF).....	22
2.2.2.3 Angiopoietin-Tie System.....	24
2.2.2.4 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NO-Synthasen) .....	27
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1 Labortechnik.....	29
3.2 Biochemika .....	31
3.3 Kits.....	32
3.4 Antikörper .....	33
3.5 Enzyme.....	33
3.6 Marker .....	33
3.7 Hormone.....	33
3.8 Puffer und Lösungen .....	34
3.9 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.10 Gewinnung und Präparierung des Probenmaterials.....	37
3.10.1 Experiment 1 .....	37
3.10.2 Experiment 2 .....	37
3.11 Enzymimmuntest (EIA).....	38
3.12 Gewinnung der RNA.....	39

3.13 Überprüfung der Quantität und Qualität der RNA.....	39
3.13.1 Biophotometer .....	39
3.13.2 Bioanalyser .....	40
3.14 Reverse Transkription (RT) .....	41
3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	42
3.15.1 Block-PCR .....	42
3.15.2 Gradienten PCR .....	43
3.15.3 Quantitative Reverse Transkription real-time PCR (qRT-PCR).....	44
3.15.4 Primer-Design und Optimierung .....	49
3.15.5 Analyse des PCR-Produktes .....	49
3.16 Westernblot .....	50
3.17 Immunhistochemie .....	52
3.18 Datenverarbeitung .....	53
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
4.1 Steroidhormone, Prostaglandin F2 $\alpha$ und Follikelklassifizierung .....	54
4.2 Bioanalyser .....	56
4.3 Housekeeping Gene Ubiquitin.....	57
4.4 Gonadotropinrezeptoren und Aromatase .....	58
4.5 Expression der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren .....	59
4.5.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie .....	59
4.5.1.1 mRNA Expression .....	59
4.5.1.2 Immunhistochemie FGF-2 .....	64
4.5.1.3 Westernblot FGF-2 .....	65
4.5.2 Vaskuläre Endothelzellen Wachstumsfaktor Familie.....	65
4.5.2.1 mRNA Expression .....	65
4.5.2.2 Immunhistochemie VEGF.....	70
4.5.2.3 Immunhistochemie VEGFR-1 .....	71
4.5.3 Angiopoietin-Tie-System .....	72
4.5.4 Stickstoffmonoxid-Synthasen .....	75
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>78</b>
5.1 Methodik.....	78
5.2 Gonadotropinrezeptoren und Aromatase .....	79
5.3 Wachstumsfaktoren.....	80
5.3.1 Fibroblasten Wachstumsfaktoren Familie (FGF).....	80

5.3.2 Vaskuläre Endothelzellen Wachstumsfaktoren Familie (VEGF).....	83
5.3.3 Angiotensin-Tie System.....	87
5.3.4 Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen .....	89
5.3.5 Zusammenwirkung der einzelnen Faktoren, Ausblick .....	90
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>95</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>112</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>113</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>114</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	RNA der 18S Ribosomen Untereinheit (18S)
28S rRNA	RNA der 28S Ribosomen Untereinheit (28S)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Angpt	Angiopoietin
P450 Aro	Aromatase P450 Cytochrom 19
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA (Komplementärstrang DNA)
CL	Corpus luteum, bzw. Corpora lutea (Gelbkörper)
CP	Crossing Point
E2	Östradiol-17 $\beta$
EC	Endothelzellen
eCG	equines Chorion Gonadotropin
ECM	Extrazelluläre Matrix
EIA	Enzymimmuntest
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FF	Follikelflüssigkeit
FGF	Fibroblasten-Wachstums-Faktor
FSH	Follikel-Stimulierendes Hormon
FSHR	FSH Rezeptor
GC	Granulosazellen
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
GP	Gesamtprotein
h	Stunde
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
HKG	Housekeeping Gen
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KO	Knockout

LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	LH Rezeptor
MM	Magermilchpulver
MMP	Matrix Metalloproteine
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS	NO-Synthase
Nrp	Neuropilin
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P4	Progesteron
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulphat-Polyacryl-Amid Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
sVEGFR-1	soluble VEGF Rezeptor-1
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Base/Essigsäure/EDTA Puffer
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TE	Theka externa
TI	Theka interna
Tie	Tyrosin Kinase mit Immunoglobulin und Epidermalzellen-Wachstumsfaktor homologen Domänen
Tris	Trometamol(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)
Ubiq	Ubiquitin
VEGF	Vaskulärer-Endothelzellen-Wachstumsfaktor
VEGFR	VEGF Rezeptor

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Eine der Hauptfunktionen des Ovarialzyklus beim Schwein, Rind, Mensch und anderen Säugetieren besteht in der periodischen Bereitstellung ein oder mehrerer befruchtungsfähiger Eizellen. Charakteristisch für den ovariellen Zyklus dieser Spezies ist das wiederholte Auftreten von Follikelentwicklung, Gelbkörperbildung und –regression, welche von zellulärer Proliferation und Differenzierung begleitet werden.

Hierfür ist ein perfekt abgestimmtes Wechselspiel verschiedener Faktoren nötig. Die bedeutendsten regulatorischen Elemente der Follikel- und Gelbkörperentwicklung sind die hypophysären Gonadotropine, welche Bestandteil eines komplizierten neuroendokrinen Systems sind. Ihre Funktion im ovariellen Zyklus ist zum Teil schon sehr gut verstanden. Neben im Hypothalamus, Adenohypophyse und Ovar gebildeten endokrinen Hormonen, welche sich durch komplexe Feedbacksysteme gegenseitig regulieren, sind auch intraovarielle Faktoren auf autokriner und parakriner Ebene für die Ovarfunktions-Regulation wichtig. Zu diesen lokal wirksamen Faktoren zählen Wachstumsfaktoren und Zytokine. Follikelwachstum verläuft sehr dynamisch, auf dem Weg zur Ovulation nimmt ein Follikel auf beeindruckende Weise an Volumen zu. Er durchläuft dabei verschiedene Entwicklungsstadien und muss aus einem Pool von vielen Follikeln rekrutiert und für das Endwachstum selektiert werden, um letztendlich ovulieren zu können. Im Gegensatz zu monoovulatorischen Spezies wie z.B. dem Rind, ist das Schwein eine polyovulatorische Art, bei welcher pro Brunstzyklus bis zu 25 Follikel ovulieren. In beiden Spezies vermutet man, dass neben den schon bekannten Gonadotropinen auch die Wachstumsfaktoren, eine heterogene Gruppe von Proteinen, eine bedeutende Rolle bei der Follikelentwicklung spielen.

Ziel der Arbeit war es, im Schwein die mRNA Expression und Lokalisation verschiedener Wachstumsfaktoren in Follikeln der Endwachstumsphase zu charakterisieren, um so die Prozesse der Rekrutierung und Selektion besser zu verstehen. Zudem sollten einige Faktoren im Schweine- und Rinderovar vergleichend betrachtet werden, um eventuelle Unterschiede in der Regulation zwischen poly- und monoovulatorischen Tieren zu erkennen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Brunstzyklus der Sau

#### 2.1.1 Aufbau des Ovar

Ein Ovar besteht aus zwei Bereichen, der inneren Markzone oder auch Zona vasculosa und der äußeren Rindenzone, Zona parenchymatosa. Über den Hilus ovarii treten Arterien in das Ovar ein und bilden in der gut durchbluteten Markzone am Übergang zur Rindenzone ein dichtes Netzwerk um letztere über Blutgefäße zu versorgen. Die Rindenzone liegt der Markzone bindegewebig auf. In ihr liegen die Follikel und Gelbkörper umgeben von fibrozytenähnlichen Stromazellen. Die Stromazellen der Rindenzone sind sehr stoffwechselaktiv, haben eine hohe Regenerationsfähigkeit und Mitoserate und können auch phagozytotisch aktiv sein. Sie sind an sämtlichen Umbauvorgängen, welchen das Ovar während des Ovarialzyklus unterworfen ist, beteiligt. Das Stromagewebe ist von einem feinen Kapillargeflecht durchzogen, das der Versorgung der Keimzellen dient und an der Umwandlung des Follikel in den Gelbkörper beteiligt ist. Auch das Kapillarnetz verändert sich mit den zyklischen Umbauvorgängen entsprechend.

#### 2.1.2 Follikulogenese und Ovulation

In den Ovarien der Sau ist bei der Geburt bereits ein vollständiger Pool von etwa 500.000 Follikeln angelegt (Black and Erickson 1968). Ein Follikel besteht aus der strukturellen und funktionellen Einheit von Eizelle und Follikelepithel. Bis zur Ovulation verharrt die Oozyte in der Prophase I der Meiose. Nur etwa 1% der Follikel gelangen überhaupt zur Ovulation, der Rest des Pools bildet sich zurück (Atresie). Der während der fetalen Entwicklung erworbene Follikelpool besteht zunächst hauptsächlich aus Primordialfollikeln, welche aus der im Durchschnitt 40µm großen Eizelle und 1-2 Schichten abgeplatteter, undifferenzierter Follikelzellen aufgebaut sind (Morbeck *et al.* 1992; Christenson *et al.* 1985). Während bei der Oogenese Differenzierung, Wachstum und Reifung im Vordergrund stehen, hat das Follikelepithel die Aufgabe, die sich entwickelnde Oozyte zu beherbergen und zu ernähren, während es ebenfalls wächst und sich differenziert. Schon vor Einsetzen der Pubertät verlassen einige Follikel den angelegten Pool und beginnen zu wachsen. Bis zur Ovulation durchlaufen die Follikel

verschiedene Entwicklungsstadien, die sich durch die Größe der Eizelle und die Entwicklung der Follikelhüllen unterscheiden.

Primärfollikel: Die Eizelle nimmt geringgradig an Größe zu, der Follikel erreicht einen Durchmesser von etwa 0,12mm. Die Follikelepithelzellen bilden bis zu 3 Schichten (Christenson *et al.* 1985) und nehmen eine isoprismatische Form an.

Sekundärfollikel: Um die weiter wachsende Eizelle kommt es zur Bildung der Zona pellucida, einer glykoproteinreichen Grenzsicht, deren Aufgabe die Regulation der Nährstoffaufnahme der Eizelle ist. Des weiteren verhindert sie das Eindringen mehrerer oder nicht artspezifischer Spermien. Kennzeichnend für den Sekundärfollikel ist die Bildung eines 3-20-schichtigen, hochprismatischen Follikelepithels um die Eizelle durch mitotische Teilung (Christenson *et al.* 1985). Außerdem differenzieren sich die dem Follikel außen anliegenden Stromazellen zur Theka follicularis und lagern sich dem Follikel ringförmig an. Die Theka follicularis stellt eine dünne, bindegewebige Schicht mit eigener Blutversorgung dar. Sie wird von den Follikelepithelzellen durch eine Basalmembran getrennt, welche gleichzeitig auch eine Barriere für Blutgefäße ist. Der Sekundärfollikel erreicht einen Durchmesser von bis zu 0,4mm (Morbeck *et al.* 1992).

Tertiärfollikel: Charakteristisch für den Tertiär- oder auch antralen Follikel ist die Ausweitung der Interzellularspalten der Follikelepithelzellen, welche letztendlich zum Antrum follicularis zusammenfließen. Diese Follikelhöhle wird durch von den Follikelepithelzellen gebildete Flüssigkeit ausgefüllt. Das Follikelepithel differenziert sich in die der Follikelwand zugeordneten Granulosazellen (9-30 Schichten) und dem die Eizelle einschließenden Cumulus oophorus (Morbeck *et al.* 1992). Die innerste Schicht des Cumulus oophorus ist eine einschichtige Lage aus prismatischen Follikelzellen, die man als Corona radiata bezeichnet. Diese liegt der Zona pellucida direkt an und dient der Ernährung der Oozyte. Auch die Granulosazellen (GC) haben eine ernährende Funktion für die Oozyte. Letztere hat ihren Enddurchmesser von etwa 140 µm erreicht. Die Theka follicularis differenziert sich in diesem Stadium in einen äußeren und inneren Bereich. In der Theka interna (TI) wandeln sich die Stromazellen in epitheloide Zellen, die in der Lage sind Steroidhormone zu produzieren und von einem dichten Kapillarnetz umgeben sind. Die äußerste Schicht des Follikels wird von den spindelförmigen Stromazellen der Theka externa (TE) gebildet. Da die Follikelhöhle und Granulosazellen durch die Basalmembran keine eigene Blutgefäße enthalten, müssen die Nährstoffe über Diffusion aus der Theka interna zur Eizelle gelangen. Die Entwicklung vom aktivierten Primärfollikel bis zum Tertiärfollikel mit 3,3mm Durchmesser dauert im Durchschnitt 98 Tage (Morbeck *et al.* 1992). Mit zunehmender Follikelgröße beschleunigt sich das Wachstum der Follikel.

Graafsche Follikel: Im Endstadium der Follikelbildung ist der Follikel ausgereift und steht kurz vor der Ovulation. Er erreicht dabei im Durchschnitt eine Größe von 8-10mm (Hunter *et al.* 2004). Die von Zona pellucida und Cumulus oophorus umgebene Eizelle verliert die Bindung zur Follikelwand und schwimmt frei in der Follikelflüssigkeit (FF). Die GC lösen sich zum Teil ebenfalls von der Follikelwand ab. Die Oozyte vollendet die erste meiotische Teilung, bei der das genetische Material gleichmäßig auf zwei Kerne, das Zytoplasma jedoch ungleichmäßig verteilt wird. So entsteht eine sekundäre Oozyte und ein kleineres funktionsunfähiges Polkörperchen. Bei der darauf folgenden Meiose II entsteht eine haploide befruchtungsfähige Eizelle und wiederum ein Polkörperchen. Die zweite meiotische Teilung wird erst während der Befruchtung abgeschlossen.

Ovulation: Der Prozess der Ovulation besteht aus dem Aufreißen der Follikelwand am Stigma folliculare und einer Muskelfaserkontraktion in der TE, wodurch die Eizelle zusammen mit der FF in den Eileiter gespült wird. Der Ruptur der Follikelwand geht eine Verengung der Kapillaren der TI im Bereich der Stigma und damit eine verminderte Durchblutung, bis hin zur völligen Degeneration der Blutgefäße voraus. Gleichzeitig wird die Follikelwand auch noch enzymatisch, u.a. durch Kollagenasen abgebaut. Die Vorgänge der Ovulation werden vorwiegend endokrin gesteuert, z.B. über das luteinisierende Hormon (LH) und Prostaglandine.

### **2.1.3 Corpus luteum und Luteolyse**

An der Stelle der ovulierten Follikel bilden sich Corpora lutea (CL), deren Hauptaufgabe es ist, den Organismus über die Sekretion von Progesteron auf eine Gravidität vorzubereiten und, bei erfolgter Befruchtung der Eizelle, die Gravidität über den nötigen Zeitraum von etwa 115 Tagen aufrecht zu erhalten. Nach der Ovulation kollabiert der Follikel, die Granulosaschichten legen sich in Falten und die Basalmembran wird durchlässig für Blutgefäße. Sehr schnell bildet sich ein dichtes Kapillarnetz in der zusammengefallenen Follikelhöhle und es kommt zur Transformation von GC und TI in große bzw. kleine Lutealzellen.

Kommt es nicht zu einer Befruchtung und Einnistung der Eizellen, so ist es für die Einleitung eines neuen Zyklus wichtig, dass sich die CL zurückbilden. Dies wird durch die Sekretion von PGF<sub>2</sub> $\alpha$  in der Uterusschleimhaut ausgelöst. Die funktionelle Luteolyse bedingt den rapiden Abfall der Progesteronsynthese, die strukturelle Luteolyse umfasst den Abbau der CL bis hin zu bindegewebigen Narben.

### 2.1.4 Endokrine Regulation des Zyklus

Der Zyklus der Sau dauert im Durchschnitt 21 Tage lang. Er beginnt mit Tag 0 zum Zeitpunkt der Ovulation und wird in die Lutealphase (etwa Tag 1 bis 14) und in die Follikularphase (Tag 15-21) eingeteilt. Die Anzahl und Größe der tertiären Follikel und deren Atresierate variiert im Laufe des Zyklus beträchtlich. Nach der Ovulation findet man kleine Follikel ( $\leq 3\text{mm}$ ) und mittlere Follikel (4-6mm) auf den Ovarien, deren Anzahl während der Lutealphase auf bis zu 100 Stück ansteigt (Knox 2005). Bis Tag 5 sind 6% der Follikel atretisch, während der Anteil an Tag 7 auf 50% steigt. Von Tag 7-14 der Lutealphase reicht die Spanne der atretischen Follikel  $>2\text{mm}$  von 12-73% (Guthrie and Cooper 1996). Die absterbenden Follikel werden kontinuierlich von nachwachsenden ersetzt, so dass ständig ein Pool von verschieden großer Follikel vorhanden ist. Keiner der Follikel jedoch erreicht in der Lutealphase einen preovulatorischen Durchmesser. Der Grund könnte eine stärkere Sekretion von Östradiol des CL neben der Progesteronsekretion sein, welches die für das Follikelwachstum und -ausreifung wichtigen Hormone Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) auf basale Werte senkt (Driancourt 2001). Mit Einsetzen der Luteolyse und Beginn der Follikularphase erscheinen Follikel  $>6,5\text{mm}$  auf dem Ovar, deren Anzahl bis zum Östrus zunimmt. Aufgrund zahlreicher Studien (Coleman *et al.* 1984; Clark *et al.* 1975) nimmt man an, dass die Rekrutierung eines Follikelpools von ca. 50 kleinen und mittleren Follikel, welche im Verlauf der Follikularphase zur Ovulation gelangen könnten, zwischen Tag 14 und 16 abläuft. Während der Follikularphase kommt es zu einem radikalen Abfall der Follikelmenge auf etwa 20 Follikel, die atretischen Follikel werden aufgrund eines unbekanntes Mechanismus nicht mehr ersetzt (Guthrie *et al.* 1995). Der Zeitpunkt der Selektion, d.h. der Auswahl der Follikel, die der Atresie entgehen und ovulieren, ist nicht genau bekannt, die Meinungen variieren zwischen Tag 18 (Hunter *et al.* 1976) und Tag 20 (Grant *et al.* 1989).

### Gonadotropine und ihre Rezeptoren

Der Ablauf von Follikelwachstum, Ovulation, Gelbkörperbildung und Luteolyse wird durch ein kompliziertes neuroendokrines System gesteuert, der Hypothalamus-Adenohypophysen-Ovarien-Achse. Im Hypothalamus wird das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) gebildet, welches über seine Rezeptoren an der Adenohypophyse die Synthese und Ausschüttung der beiden Gonadotropinen FSH und LH bewirkt. Diese haben am Ovar mannigfaltige Wirkungen, insbesondere stimulieren sie die Synthese von

Steroiden (Gestagene, Östrogene und Androgene). Ohne jegliche Einwirkung von Gonadotropinen wird das Wachstum von Follikeln ab 1mm Größe gestoppt, von dieser Größe an wird der Follikel Gonadotropin-abhängig (Driancourt *et al.* 1995). Der basale Spiegel an Gonadotropinen während der Lutealphase reicht aber aus, um Follikel auf bis zu 6mm Durchmesser anwachsen zu lassen. Bei der Bindung von FSH und LH an ihre Rezeptoren (FSHR, LHR) werden in Zusammenarbeit mit ATP Adenylatzyklen aktiviert. Es kommt zur Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das einen Effekt als Mediator hat (Richards and Hedin 1988). Die Wirkung von Gonadotropinen auf Follikel und Gelbkörper hängt nicht nur von der Serum-Konzentration ab, sondern wird auch über die Anzahl der Rezeptoren in der Zielzelle bestimmt (Richards 1980). Insbesondere FSH interagieren meist im Synergismus mit intragonadalen Faktoren bei der Regulierung der Follikelentwicklung (Döcke 1994).

Nach Döcke (1994), fördert FSH die Eireifung, bewirkt die Proliferation der GC, die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen und die Induktion von LH Rezeptoren (LHR) und der durch LH stimulierbaren Adenylatzyklase. FSH ist außerdem mit das wichtigste Hormon zur Kontrolle des Follikelwachstums (Picton *et al.* 1999). Insbesondere um den Zeitpunkt der Luteolyse herum bewirkt FSH wahrscheinlich die Rekrutierung eines gesunden Follikelpools und eine zunehmende Anzahl von mittelgroßen Follikeln zu Beginn und im weiteren Verlauf der Follikularphase (Knox 2005). Man vermutet das FSH anti-apoptotische Wirkung auf kleine und mittlere Follikel hat (Takekida *et al.* 2003). FSH wirkt über spezifische Membran-gebundene Rezeptoren mit hoher Affinität (Richards and Hedin 1988). FSH Rezeptoren (FSHR) sind im Schweinefollikel nur in den GC lokalisiert (Liu *et al.* 1998).

LH bewirkt die Synthese von Androgenen und deren Freisetzung, die Follikelausreifung, Ovulation und die Bildung, Erhaltung und Progesteronsekretion des CL (Döcke 1994). LH wird während des Zyklus pulsatil abgegeben (Flowers *et al.* 1991). Fehlt die pulsatile Abgabe, z.B. nach Gabe eines GnRH-Antagonisten, so wird kein Follikel größer als 2mm, trotz messbarer LH-Konzentrationen (Driancourt *et al.* 1995). LH scheint das Wachstum von 1-3mm großen Follikeln zu unterdrücken und deren Atresierate zu steigern. Im Gegenzug mindert es die Atresie in 3-6mm großen Follikeln und erhöht die Anzahl der großen Follikel (Guthrie *et al.* 1990). Obligatorisch für die Ovulation sowie für die CL-Bildung ist der LH-Gipfel. Dieser entsteht durch die gleichzeitige Zunahme der Frequenz und der Amplitude der LH-Pulse. Voraussetzung für den LH-Gipfel ist wiederum das positive Östrogen-Feedback, das durch die präovulatorisch stark ansteigende Östrogenproduktion der reifenden Follikel ausgelöst wird. Im Ovar leitet der LH-Gipfel die letzte Mitosewelle der GC und die Ablösung des Cumulus oophorus ein. Im Durchschnitt

vergehen zwischen LH-Gipfel und Ovulation 30-37 h (Madej *et al.* 2005). Die LHR besitzen ähnliche Eigenschaften wie die FSHR, sind jedoch in GC und TI lokalisiert (Liu *et al.*, 1998). Die Ausbildung und Anzahl der LHR wird sowohl über LH selber, als auch über FSH und Östrogene bedingt und gesteigert (Jia and Hsueh 1984; Jia *et al.* 1985; Kessel *et al.* 1985).

### **Steroidhormone und Aromatase**

Steroide wirken sowohl lokal am Ovar als auch über endokrine Wege regulatorisch auf den Hypothalamus und die Adenohypophyse. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil der Hypothalamus-Adenohypophysen-Ovarien-Achse und essentiell für die Auslösung der Ovulation oder die CL Funktion.

Progesteron (P4) wird hauptsächlich im CL produziert und ist auch gleichzeitig das wichtigste Hormon des CL. P4 gehört zu den Gestagenen, seine Funktion besteht in der Vorbereitung des Uterus auf die Gravidität und deren Aufrechterhaltung. P4 hat eine gonadotropin-hemmende Wirkung, wobei vorwiegend die Pulsfrequenz verringert wird. Seine inhibierende Funktion ist somit auf den LH-Gipfel gerichtet, so dass eine Ovulation nur stattfinden kann, wenn kein CL mit Progesteron-Sekretion vorhanden ist (Döcke 1994).

Während der Follikelreifung dient P4 außerdem als Substrat für die Konversion in Androgene (Guthrie *et al.*, 94). Ab Tag 12 des Zyklus beginnt die P4 Konzentration im Blutplasma abzusinken und erreicht ab Tag 14/15 einen basalen Spiegel (Flowers *et al.* 1991). Nach dem Einsetzen des Östrus steigt der Spiegel im Plasma wieder an. In der FF sind bis zu 1000-fach höhere Konzentrationen messbar, hier steigt der P4-Gehalt im Laufe der Follikelentwicklung an, fällt nach dem Östrus aber wieder kurz ab (Eiler and Nalbandov 1977).

Östradiol-17 $\beta$  (E2) wird hauptsächlich von den Ovarien sezerniert und sichert die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsmerkmale. Ein präovulatorischer Anstieg der folliculären E2 Sekretion findet in allen Säugetieren statt und ist notwendig für viele Aspekte der ovariellen und reproduktiven Funktion. E2 ist eines der wichtigsten Hormone für die Follikelentwicklung (Richards 1979) und wirkt u.a antiapoptotisch auf GC und stimulierend auf die LHR Synthese (Schams and Berisha 2002). Wachstum der Follikel und ansteigende E2 Produktion verlaufen im Schwein übereinstimmend (Guthrie *et al.* 1993). Die Östradiolsynthese wird durch FSH stimuliert (Slomczynska *et al.* 2001; Tonetta and diZerega 1989), aber auch LH scheint eine Rolle bei der Ausbildung des präovulatorischen Östradiol-Gipfels zu spielen (Picton *et al.* 1999). Für die Bildung von E2

ist das Enzym P450 Aromatase (P450 Aro) verantwortlich, ein Mitglied der Cytochrom P450 Familie. P450 Aro ist ein auf 3 Genen codiertes gewebespezifisches Isozym, welches erst im Komplex mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase aktiv ist (Corbin *et al.* 2003). In seiner aktivierten Form konvertiert es Testosteron zu E2. Im Gegensatz zu anderen Vertebraten wie Mensch und Rind, wo die P450 Aro exklusiv in den GC vorkommt, wird beim Schwein auch in der TI E2 synthetisiert (Garrett and Guthrie 1997; Guthrie *et al.* 1994). Sowohl die Konzentration von E2 als auch von P450 Aro steigen im Laufe des preovulatorischen Follikelwachstums an, um nach dem LH-Gipfel wieder stark abzufallen (Guthrie *et al.* 1994)

### **Prostaglandine**

Prostaglandine, welche unter dem Überbegriff Eicosanoide eingeordnet werden, sind in vielen Vorgängen im Reproduktionssystem involviert (Döcke 1994).

Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) und Prostaglandin E<sub>2</sub> spielen eine wichtige Rolle bei der Ovulation der Graafschen Follikel. Durch PGF<sub>2α</sub> Einwirkung scheinen u.a. Plasminogen Aktivator und Kollagenasen aktiviert zu werden (Strickland and Beers 1976; Espey 1980). Durch Unterdrückung der PGF<sub>2α</sub> Synthese mit Indomethacin konnte der physiologische Konzentrationsanstieg in der FF 10-12h vor der Ovulation und damit auch die Ovulation selbst verhindert werden (Ainsworth *et al.* 1975; Tsang *et al.* 1979). Exogen zugeführtes PGF<sub>2α</sub> kann diese Blockade wieder aufheben (Tsang *et al.* 1988). PGF<sub>2α</sub> kommt sowohl in der TI als auch in den GC vor (Ainsworth *et al.* 1984). Die Synthese bzw. Aktivität von PGF<sub>2α</sub> wird insbesondere von LH stimuliert (Evans *et al.* 1983; Tsang *et al.* 1988). Vielfach nachgewiesen ist die essentielle Bedeutung von PGF<sub>2α</sub> für die Luteolyse. Während der Gelbkörperphase hemmt Progesteron die Ausschüttung von PGF<sub>2α</sub> und fördert somit die Anreicherung von dessen Vorstufen. Das nach Beginn der Luteolyse vermehrt sezernierte Östrogen fördert die Synthese und Ausschüttung, so dass es zu einer erhöhten Pulsfrequenz und gleichzeitig vergrößerten Amplitude der PGF<sub>2α</sub> Abgabe kommt (Döcke 1994). Im CL des Schweines sind erst ab Zyklustag 11 genügend PGF<sub>2α</sub> Rezeptoren vorhanden um die Luteolyse einzuleiten. Mit Einsetzen der PGF<sub>2α</sub> Sekretion kommt es zu einem Abfall der LHR im Uterus und der Konzentration von Progesteron im Plasma. Bildungsorte von PGF<sub>2α</sub> sind sowohl der CL selbst als auch die Uterusschleimhaut (Barb *et al.* 1984; Bazer *et al.* 1982).

## **2.2 Lokale (autokrine/parakrine) Regulation und Wachstumsfaktoren**

In den letzten Jahren ist deutlich geworden, dass außer den endokrinen Faktoren auch lokal produzierte Faktoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine) eine wichtige Rolle im weiblichen Reproduktionszyklus spielen können. Im Gegensatz zu den hauptsächlich endokrin wirkenden Hormonen, benutzen die Wachstumsfaktoren eher lokale Wege. Dazu zählt die autokrine Wirkung, also auf die gleiche Zelle, als auch die parakrine Wirkung auf umliegende Zellen.

Viele dieser Wachstumsfaktoren wurden im Ovar, Ovidukt und im Uterus verschiedener Säugetierspezies gefunden. Sie haben vielfältige biologischen Wirkung und steuern unter anderem den in Follikeln und CL vorkommenden Prozess der Angiogenese.

### **2.2.1 Angiogenese**

Die Bildung neuer Blutgefäße ist essentiell für die Entwicklung und Erhaltung aller Gewebe und Organ-Systeme. Dieser Vorgang findet während den Prozessen der Vaskulogenese und Angiogenese statt. Vaskulogenese stellt dabei die de novo Entwicklung von vaskulären Endothelzellen aus Vorläuferzellen, den Angioblasten, während der embryonalen Entwicklung dar. Angiogenese hingegen ist ein Remodelierungs-Prozess, bei welchem neue Kapillaren aus bereits vorhandenen Blutgefäßen aussprossen (Risau 1997). Angiogenese findet sowohl innerhalb der Embryogenese als auch im adulten Organismus statt. Physiologisch kommt der Vorgang der Angiogenese im adulten Organismus aber nur noch selten, z.B. bei Wundheilungsprozessen vor. Eine Ausnahme stellt der weibliche Reproduktionstrakt dar, in welchem die Angiogenese regelmäßig während der Follikelentwicklung, der CL-Anbildung und der Plazentabildung während der Trächtigkeit stattfindet. Diese Perioden der Blutgefäßbildung sind relativ kurz und streng reguliert. In pathologischen Prozessen wie z.B. Tumorstadium hat die Angiogenese dagegen einen unkontrollierten Charakter (Klagsbrun and D'Amore 1991). In den meisten Fällen sprossen neue Kapillaren aus bestehenden Kapillaren oder Venolen aus, seltener aus größeren Gefäßen mit mehreren Schichten glatter Muskulatur. Der Prozess der Angiogenese umfasst vier Abläufe, nämlich Exozytose, Chemotaxis, Zellteilung und Bildung einer extrazellulären Matrix (Findlay 1986). Angiogenese wird durch verschiedene angiogene Faktoren stimuliert. Den ersten Schritt auf solch einen Stimulus stellt die Degradation der Basalmembran eines existierenden Gefäßes durch Proteasen, z.B. Mitglieder der Matrix Metalloproteine (MMP) Familie, dar. Durch die Permeabilisierung der Basalmembran und damit Destabilisierung

des Blutgefäßes können Endothelzellen (EC) aus dem Gefäß in Richtung des angiogenetischen Stimulus wandern und proliferieren. Dabei scheint insbesondere die Adhäsion zwischen EC und der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle zu spielen. Die auswandernden EC setzen sich zu Röhren mit Lumen zusammen und werden abschließend von einer Basalmembran umgeben. Um die neuen Blutgefäße zu stabilisieren müssen sich mesenchymale Zellen in glatte Muskulatur ähnliche Perizyten differenzieren und an der Außenseite der Gefäße anlagern (Findlay 1986; Klagsbrun and Moses 1999). Die Angiogenese spielt eine wesentliche Rolle für die Ovar-Funktion. So ist die Entwicklung der Follikel vom Primordialstadium bis zum Graafschen Follikel von qualitativen und quantitativen Veränderungen des mikrovaskulären Bett begleitet. Während Primordial- und Primärfollikel von einzelnen Kapillarschlingen im Stroma umgeben sind, wird der Sekundärfollikel von einer eigenen Arterie versorgt, die sich im Bereich der TE in 3-4 Arteriolen verzweigt. Beim Übertritt in die TI bildet sich aus den Arteriolen ein dichtes Netzwerk von Kapillaren, das sich rund um die avaskuläre Granulosaschicht verteilt. Somit ist der steigende Bedarf an Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren im wachsenden Follikel gesichert. Mit zunehmenden Wachstum des Follikels verdichtet sich das Kapillarnetz weiter, der Durchmesser der Blutgefäße nimmt zu (Plendl 2000). Wahrscheinlich spielt die vaskuläre Versorgung auch beim Selektionsprozess eine Rolle, da dominante Follikel stärker vaskularisiert sind als nicht selektierte antrale Follikel (Reynolds and Redmer 1998), was eine besser Versorgung mit Gonadotropinen bedeutet (McNatty *et al.* 1981). Auch beim Aufbau des CL ist der Vorgang der Angiogenese essentiell. Nach der Ovulation kommt es zur Einsprossung der Kapillaren aus der TI in die avaskuläre Granulosaschichten und zur Bildung eines dichten Gefäßnetzwerkes, so dass nach Aufbau des CL jede Lutealzelle zumindest mit einer Kapillare in Kontakt steht (Gaytan *et al.* 1999). Mehr als 50% der proliferierenden Zellen während des CL Wachstums sind EC (Reynolds *et al.* 1994), was eine 4- bis 20-fach höhere Rate als in hoch malignen Tumoren bedeutet (Stouffer *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass ein reduzierter ovarieller Blutfluss eine kritische Rolle bei der luteolytischen Regression spielt und auch EC wichtig im Prozess der Luteolyse sind (Girsh *et al.* 1995). Durch diese zyklische wiederkehrenden Vorgänge ist das weibliche Reproduktionssystem ein einzigartiges Modell, um die Regulation der Angiogenese während Wachstum und Differenzierung normaler erwachsener Gewebe zu studieren. Angiogenese wird durch eine Vielzahl von pro- und antiangiogenetischen Faktoren und Zytokinen reguliert, von denen viele keine Endothelzell-spezifische Wirkung haben sondern pleiotrop auf mehrere Zellarten wirken (Tamanini and De Ambrogi 2004). Wahrscheinlich ist z.B. die Ausbildung des Kapillarnetz in der TI das Resultat eines

Zusammenspiel verschiedener Substanzen, deren Anteile während der verschiedenen Follikelentwicklungsstadien variieren und dementsprechend unterschiedliche Impulse für die Angiogenese geben (Grasselli *et al.* 2003). Um die normale und anormale Ovarfunktion zu verstehen und zu kontrollieren sind Faktoren, die für die selektive Vaskularisation der Follikel und des CL bedeutend sind, von großem wissenschaftlichen Interesse und stellen somit einen wesentlichen Bestandteil der vorliegenden Arbeit dar.

### **2.2.2 Wachstumsfaktoren**

Der Begriff Wachstumsfaktoren umfasst eine Gruppe von Polypeptiden und Proteinen, welche über die Aktivierung spezifischer Rezeptoren regulatorisch auf bestimmte Zell- oder Gewebetypen wirken. Als erstes Mitglied der Wachstumsfaktoren wurde 1954 der „Nerve Growth Factor identifiziert und beschrieben (Levi-Montalcini 1987). Durch Beeinflussung von Ionenstrom, Glucosetransport und Zirkulation der Aminosäuren (AS) üben die Wachstumsfaktoren Wirkung auf ihre Zielzelle aus. Außerdem greifen sie steuernd in die Protein-, RNA-, und DNA-Synthese ein und nehmen somit Einfluss auf die Differenzierung und Zellteilung (Weimann and Kiess 1991). Maßgebliche letztere Eigenschaft hat zu der Bezeichnung „Wachstumsfaktor“ geführt. Wachstumsfaktoren beeinflussen und steuern eine große Anzahl zellulärer Funktionen, z.B. bewirken sie Effekte auf die Bildung der extrazellulären Matrix, Zellmotilität, Zellviabilität, Sekretion anderer Zytokine und die Expression und Stabilisierung von Differenzierungscharakteristika. Dabei können die meisten Faktoren sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken und besitzen untereinander synergistische als auch antagonistische Eigenschaften.

### 2.2.2.1 Fibroblasten Wachstumsfaktor Familie (FGF)

Die FGF-Familie umfasst mittlerweile 22 Liganden und vier Rezeptoren.

Den Mitgliedern der FGF-Familie ist eine starke Affinität zu Heparin und Heparan Sulfat Proteoglykanen (HSPGs) gemeinsam (Burgess and Maciag 1989). Übereinstimmendes Merkmal zwischen den Mitgliedern ist nicht ihre biologische Aktivität, sondern ihr struktureller Aufbau, bestehend aus einem hoch homologen zentralen Kern von 140 AS (Ago *et al.* 1991). FGFs wirken pleiotrop auf eine Vielzahl von Zellen und Gewebetypen (Gospodarowicz 1990) und induzieren Mitose, Angiogenese und Chemotaxis. FGF-1 oder auch acidic FGF (aFGF) und FGF-2 (basic FGF, bFGF) sind die Prototypen der Familie und wohl am stärksten im Prozess der Angiogenese involviert, unter anderem auch im Ovar (Berisha *et al.* 2004; Friesel and Maciag 1995; Schams *et al.* 1994). FGF-2 existiert in verschiedenen Isoformen welche ein Molekulargewicht von 18kDa, 21,5kDa, 22kDa und 24kDa aufweisen (Bikfalvi *et al.* 1998). Die 18kDa Form wird zur Zelloberfläche transportiert, während die größeren Formen überwiegend Zellkern-assoziiert vorkommen (Florkiewicz *et al.* 1991). FGF-1 und FGF-2 besitzen beide keine Signal Peptide für den klassischen sekretorischen Transport über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in den extrazellulären Raum (Jaye *et al.* 1986). Die Isoformen von FGF-2 mit hohem Molekulargewicht sind über eine Kern-Lokalisations-Sequenz hauptsächlich mit dem Zellkern assoziiert und wirken über einen Mechanismus, der unabhängig von membrangebundenen Rezeptoren ist, auf das Zellwachstum (Auguste *et al.* 2003). Ihre Rolle in der Angiogenese ist noch nicht genau bekannt, allerdings zeigen sie einen inhibitorischen Effekt auf die Migration, aber einen positiven Einfluss auf das Wachstum von EC (Piotrowicz *et al.* 1999). Dagegen sind die FGF-2 18kDa Form und auch FGF-1 im extrazellulären Raum lokalisiert (DiMario *et al.* 1989). FGF-1 Abgabe aus der Zelle kann durch Stresssituationen wie Hitzeschock Behandlung oder Hypoxia stimuliert werden und ist auf die Bildung eines Komplexes z.B. mit Mitgliedern der S100 Familie der  $Ca^{2+}$  bindenden Proteine und Kupfer angewiesen (Landriscina *et al.* 2001). FGF-2 Transport scheint von bestimmten Membranproteinen abhängig zu sein, beide Faktoren könnten entweder über Plasmamembran-lokalisierte Transporter oder durch sogenanntes membrane shedding oder blebbing, d.h. die Bildung von Exovesikeln, in den extrazellulären Raum befördert werden (Nickel 2005). FGF-7 besitzt eine Signal-Sequenz und wird über den klassischen sekretorischen Weg sekretiert (Aaronson *et al.* 1991). Da dieser 28 kDa große, in Fibroblasten synthetisierte Faktor ausschließlich auf Epithelzellen wirkt, wird er auch als Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) bezeichnet (Rubin *et al.* 1989). Die biologische Aktivität von FGF-1 und FGF-2 umfasst viele proangiogenetische

Wirkungen, z.B. die Beeinflussung der Proliferation und Migration von EC, der Produktion von Proteasen wie MMPs oder Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und der Förderung der Expression von Rezeptoren, welche die Zelladhäsion regulieren. FGF-1 zeichnet sich durch eine Schutzfunktion für EC und glatte Muskelzellen und dementsprechend durch eine Anti-Apoptotische Wirkung auf Blutgefäße aus (Carmeliet 2000; Cuevas *et al.* 2000). FGF-2 kann indirekt durch die Aktivierung des Vaskulären Endothelzellen Wachstumsfaktor (VEGF) und seiner Rezeptoren Angiogenese induzieren und scheint auch synergistisch mit VEGF zu wirken (Presta *et al.* 2005). Neben der Wirkung auf EC reguliert FGF-2 auch eine Reihe von Funktionen im Ovar, wie z.B. die Mitose, Steroidogenese, Differenzierung und Apoptose von Granulosazellen und die Einleitung der Follikulogenese (Nilsson *et al.* 2001). FGF-7 agiert als ein Epithelzell-spezifisches Mitogen und vermittelt Mesenchymal-Epithelzell Interaktionen in vielen Geweben, u.a. dem Ovar, Endometrium und der Plazenta. Man nimmt an, dass FGF-7 im Ovar insbesondere die Wirkung von endokrinen Hormonen wie Estrogenen und LH vermittelt und die Proliferation von Granulosazellen bewirkt (Parrott and Skinner 1998). Durch Stimulierung von Epithelzellen zur Synthese und Abgabe von Proteasen und VEGF nimmt FGF-7 indirekt auf die Angiogenese Einfluss. In vitro hat FGF-7 aber auch die Proliferation und Migration von aus Kapillaren stammenden EC bewirkt und eine schützende Funktion gegen vaskuläre Permeabilität gezeigt (Gillis *et al.* 1999). Der Mechanismus der direkten Wirkung auf EC ist noch nicht bekannt.

Die Wirkung der FGFs auf die Zielzellen wird von Zelloberflächen-gebundenen Tyrosin Kinase Rezeptoren übertragen. Es sind vier verschiedenen Rezeptoren mit hoher Affinität für FGFs bekannt, FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 und FGFR-4, welche eine 55% bis 72%ige Proteinhomologie teilen (Johnson and Williams 1993). Sie setzen sich zusammen aus einer extrazellulären Ligand-bindenden Domäne, einer einzelnen transmembranen Domäne und einer intrazellulären Tyrosin Kinase Domäne. Der extrazelluläre Bereich besteht aus zwei oder drei Immunglobulin ähnlichen Domänen. Durch alternatives Splicing der dritten Immunglobulin ähnlichen Domäne von FGFR-1, FGFR-2 und FGFR-3 entstehen eine Vielzahl weiterer Varianten. Je nachdem ob sie auf Exon 7, 8 oder 9 der dritten Domäne codiert sind, werden sie durch den Anhang -IIIa, -IIIb oder -IIIc unterschieden. Sie zeigen unterschiedliche Charakteristika bei der Liganden Bindung. So binden alle Rezeptorvarianten FGF-1, FGF-2 wird von allen außer FGFR-2IIIb und FGFR-3IIIb gebunden, während FGF-7 nur von FGFR-2IIIb gebunden wird (Eswarakumar *et al.* 2005). Auch die Zielzellen variieren, so ist die Isoform FGFR-2IIIb nur in epithelialen Zellen, FGFR-2IIIc dagegen nur in mesenchymalen Zellen exprimiert (Orr-Urtreger *et al.* 1993). FGFR-1 ist der am stärksten exprimierte Rezeptor in EC *in vitro*, FGFR-2 wird nur

in geringeren Mengen exprimiert (Javerzat *et al.* 2002). Studien an dominant-negativen Mäusen der wichtigsten Isoformen FGFR-1IIIc, FGFR-2IIIb und FGFR-2IIIc ergaben schwere Entwicklungsstörungen, die zur embryonalen Lethalität oder Tod direkt nach der Geburt führten (Eswarakumar *et al.* 2005). Als Co-Rezeptoren fungieren membran-gebundene oder heparinolytisch gelöste HSPGs, welche sich mit FGFs und FGFR verbinden und so die Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor verstärken. Proteolytisch gelöste HSPGs wirken dagegen inhibitorisch (Auguste *et al.* 2003). Eine weitere Funktion der HSPGs ist die Bindung von FGFs in der Extrazellulären Matrix (ECM), wodurch Reservoirs entstehen, aus welchen durch enzymatischer Abspaltung oder durch FGF-Bindungs-Proteinen reguliert in großen Mengen FGFs abgegeben werden können (Powers *et al.* 2000). Hypoxia steigert die Menge der HSPGs an der Zelloberfläche von Endothelzellen, wodurch mehr FGFs gebunden werden und deren Effekt auf die Blutgefäße gesteigert werden kann (Li *et al.* 2002). Heparin verhindert durch Bindung an FGFs Degradation oder andere Schäden und steigert so indirekt ihre biologische Aktivität (Powers *et al.* 2000).

#### **2.2.2.2 Vaskuläre Endothelzellen Wachstumsfaktor Familie (VEGF)**

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Forschungsarbeiten eine Schlüsselrolle von Mitgliedern der VEGF-Familie in der Regulation von physiologischer und pathologischer Angiogenese nachgewiesen. Die VEGF-Familie besteht aus verschiedenen Mitgliedern, VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF) und zwei VEGF-ähnlichen Proteinen (Ferrara and Davis-Smyth 1997). Hauptsächlich wirken diese Faktoren auf EC, aber sie können auch an VEGF-Rezeptoren auf hämopoetischen Stammzellen, Monozyten, Osteoblasten und Neuronen binden (Ferrara *et al.* 2003). VEGF kommt die größte Bedeutung in der Angiogenese zu. Mäuse ohne VEGF (VEGF<sup>-/-</sup>) oder nur einem VEGF Allel (VEGF<sup>+/-</sup>) starben während der embryonalen Entwicklung auf Grund gestörter Vaskulogenese und Angiogenese. Eine Überexpression von VEGF führte ebenfalls zum Tod der Feten, erzeugt durch Hypervaskularisierung und damit übermäßigen Gewebewachstums (Stouffer *et al.* 2001). Während VEGF-B wahrscheinlich hauptsächlich in der Entwicklung der Herzkranzgefäße und Durchblutung des Herzens und bei der inflammatorischen Angiogenese eine Rolle spielt, sind VEGF-C und VEGF-D mit für die Bildung des lymphatischen Systems verantwortlich (Tammela *et al.* 2005). Von VEGF sind bislang mehrere molekulare Isoformen bekannt, welche durch alternatives Splicing des Gens entstehen und sich in der Anzahl ihrer AS unterscheiden. Im Menschen entsprechen diese Isoformen VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-183, VEGF-189

und VEGF-206 (Ferrara *et al.* 2003). Die im Schwein und Rind bekannten Isoformen enthalten jeweils eine AS weniger, also VEGF-120, VEGF-144, VEGF-164, VEGF-188 und VEGF-205 (Kaczmarek *et al.* 2005). VEGF-120, VEGF-164 und VEGF-188 sind die Hauptformen, welche von den meisten Zelltypen sekretiert werden (Robinson and Stringer 2001). Alle drei Splicingisoformen wurden im bovinen Ovar nachgewiesen (Berisha *et al.*, 00). Nach Untersuchungen an Knockout (KO) Mäusen, scheint VEGF-164 der wichtigste Vertreter zu sein (Tammela *et al.* 2005). VEGF-120 und VEGF-164 sind diffusionsfähig und können so relativ frei in andere Gewebe gelangen. Etwa die Hälfte des sekretierten VEGF-164 bindet aber an HSPGs, welche in der ECM bzw. an der Zelloberfläche vorkommen (Houck *et al.* 1992). VEGF-188 wird komplett von HSPGs in der ECM sequestriert, so dass die HSPGs ein Depot von VEGF bereithalten, welches bei Bedarf durch Proteolyse mobilisiert werden kann (Ferrara *et al.* 2003). Die biologischen Funktionen von VEGF umfassen die Induzierung der Proliferation, Migration und Röhrenbildung von EC (Ferrara *et al.* 2003). Des weiteren erhöht VEGF die Permeabilität des Endotheliums (Bates *et al.* 2002) und wirkt Vasodilatatorisch durch die Stimulierung der endothelialen NO-Synthase und einem nachfolgendem Anstieg der Stickstoffmonoxid Produktion (Kroll and Waltenberger 1998; Hood *et al.* 1998). Auch ein antiapoptotischer Effekt auf EC in neu geformten, aber noch nicht ausgereiften Blutgefäßen wurde nachgewiesen. Dabei scheint die Ummantelung der neuen Blutgefäße mit Perizyten den kritischen Punkt darzustellen, ab dem die Blutgefäße nicht mehr auf den Schutz von VEGF angewiesen sind. (Benjamin *et al.* 1999; Gerber *et al.* 1999). Die Genexpression von VEGF wird insbesondere durch den Sauerstoffgehalt der Zellen beeinflusst. Hypoxia bewirkt über den Hypoxia-induzierten-Faktor (HIF-1) eine Aufregulierung von VEGF (Dor *et al.* 2001; Semenza 2002). Auch andere Wachstumsfaktoren, wie z.B. der Insulin ähnliche Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) oder FGF-7, als auch LH, regulieren die VEGF Expression auf (Ferrara *et al.* 2003; Schams *et al.* 2001).

Als Rezeptoren fungieren zwei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren mit hoher Affinität für VEGF, VEGFR-1 oder auch Flt-1 (fms-like tyrosine kinase receptor) und VEGFR-2, auch als Flk-1 (fetal liver kinase-1) oder KDR (kinase insert domain-containing receptor) bezeichnet. Beide Rezeptoren teilen 85% Sequenzhomologie miteinander (Matthews *et al.* 1991). Sie bestehen aus sieben extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer einzelnen transmembranen Region und einer intrazellulären Tyrosin Kinase Domäne. Von VEGFR-1 existiert zusätzlich noch eine alternative splicing Form, welche löslich ist (soluble VEGFR-1) und eine inhibierende Wirkung auf die VEGF Aktivität hat (Kendall and Thomas 1993). Der erste entdeckte Rezeptor war VEGFR-1, welcher die höchste Affinität für VEGF besitzt und hauptsächlich in embryonalen und adulten EC vorkommt (Robinson and

Stringer 2001). Sein Vorkommen sowohl in ruhenden als auch proliferierenden EC lässt auf eine Rolle für die Erhaltung von EC schließen (Fong *et al.* 1995). Bislang konnte kein direkter Einfluss über VEGFR-1 auf die Proliferation, Migration oder den Zytoskelettaufbau der EC beobachtet werden (Robinson and Stringer 2001). In anderen Zellarten sind für VEGFR-1 mehrere Funktionen nachgewiesen, wie z.B. die Induktion von Gewebefaktoren wie Urokinase Plasminogen Aktivator, Chemotaxis von Monozyten und die Steigerung der Expression von MMPs in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen (Robinson and Stringer 2001). VEGFR-2 hat zwar eine geringere Bindungs-Affinität für VEGF, ist aber hauptsächlich für die Transmitterfunktion von VEGF-Signalen in die EC verantwortlich (Tammela *et al.* 2005) und damit Hauptmediator für Mitogene-, Angiogene- und permeabilitäts auslösende Effekte von VEGF. Durch Dimerisation und Ligand-abhängige Tyrosin Phosphorylisation von VEGFR-2 in intakten Zellen werden mitogene, chemotaktische und antiapoptotische Signale ausgelöst (Ferrara *et al.* 2003). Im Gegensatz zu VEGFR-1 ist VEGFR-2 in adulten ruhenden vaskulären EC herunterreguliert und nur in angiogen aktiven EC wieder aufreguliert (Tammela *et al.* 2005). In vivo werden beide Rezeptoren durch Hypoxia aufreguliert (Tuder *et al.* 1995; Li *et al.* 1996). Stimulierung durch VEGF selber bewirkt ebenfalls ein erhöhte Expression des VEGFR-2 Gens und steigende intrazelluläre VEGFR-2 Konzentrationen (Shen *et al.* 1998). Neben den Tyrosin Kinase Rezeptoren interagiert VEGF auch mit einer Familie von Co-Rezeptoren, den Neuropilinen. Neuropilin-1 (Nrp-1) und Neuropilin-2 (Nrp-2) spielen eine Rolle in immunologischen Abläufen und bei der neuronalen Entwicklung, sind aber auch in die Angiogenese involviert (Bagri and Tessier-Lavigne 2002; Klagsbrun *et al.* 2002). Nrp-1 scheint keine eigene intrazelluläre Signalübertragung durchführen zu können, kann aber durch Verbindung mit VEGF-164 einen Komplex mit VEGFR-2 bilden und somit die Bindung von VEGF-164 zu VEGFR-2 steigern (Soker *et al.* 2002). VEGF-120 kann nicht an Nrp-1 binden, was ein Grund für die geringere mitogene Aktivität dieses Liganden sein könnte (Ferrara *et al.* 2003).

### 2.2.2.3 Angiopoietin-Tie System

In der Familie der Angiopoietine (Angp) sind vier Liganden bekannt, Angp-1, Angp-2, Angp-3 und Angp-4, wobei man über die Funktion von Angp-3 und Angp-4 sehr wenig weiß. Die Angiopoietine wirken wie VEGF hauptsächlich auf vaskuläre Endothelzellen und scheinen zudem mit die wichtigsten Partner von VEGF im Prozess der Angiogenese zu sein. Angp-1 und Angp-2 weisen im Aufbau ihrer AS fast 60 % Homologie auf (Maisonpierre *et al.* 1997). Beide Liganden werden in EC und glatten Muskelzellen der

Blutgefäße exprimiert (Witzenbichler *et al.* 1998). Angp-1 ist im adulten Gewebe weit verbreitet, während Angp-2 hauptsächlich in den Ovarien, der Plazenta und dem Uterus z.B. in der Maus, im Rind oder dem Affen exprimiert wird (Tanaka *et al.* 2004; Maisonpierre *et al.* 1997; Hazzard *et al.* 2000; Hayashi *et al.* 2003). Sie bestehen aus einer C-terminalen Fibrinogen ähnlichen Domäne, welche für die Rezeptorbindung zuständig ist, einer zentralen coiled-coil Domäne, welche Fibrinogen ähnliche Domänen dimerisiert, und einer kurzen N-terminalen Region. Letztere bildet ringförmige Strukturen, mit welchen sie Dimere zu variablen Multimere versammeln kann (Davis *et al.* 2003). Es müssen mindestens Angp-1 Tetramere gebildet werden, damit ihr Rezeptor aktiviert werden kann, wogegen Dimere und Monomere als Antagonisten agieren (Davis *et al.* 2003). Da diese Multimerebildung von Angp-2 fast identisch ist, könnte dies ein Grund für seine sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkung sein (Davis *et al.* 2003). Angp-1 bewirkt eine Stabilisierung vorhandener Blutgefäße, indem es sie resistent gegen Permeabilität macht (Thurston *et al.* 1999). Während VEGF die Bildung unreifer Blutgefäße induziert und damit deren Anzahl erhöht (Adamis *et al.* 1994), führt Angp-1 zu einer Zunahme der Gefäßgröße (Thurston *et al.* 1999). In Angp-1 KO Mäusen waren die primär gebildeten Blutgefäße nicht weiter entwickelt, es bildeten sich insbesondere im Herzen keine getrennten Gefäßnetze mit komplexen Aufzweigungen, zudem fand eine unzureichende Perizytenrekrutierung und Basalmembranbildung statt. Dies war darauf zurückzuführen, dass keine ausreichenden Interaktionen zwischen EC und umliegenden Zellen wie z.B. Perizyten stattfinden konnten (Suri *et al.* 1996). Man nimmt an, dass Angp-1 weniger direkt auf die Blutgefäß Remodellierung wirkt, sondern die Interaktionen zwischen EC und umliegenden Zellen optimiert und diese für andere Signale aus der Umgebung empfänglich macht (Yancopoulos *et al.* 2000). Es gibt zwar auch Hinweise darauf, dass Angp-1 auch direkte Wirkung auf die Neovaskularisierung haben könnte (Suri *et al.* 1998; Papapetropoulos *et al.* 1999; Koblizek *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000), aber diese Funktion ist noch nicht ausreichend ausgeleuchtet, so dass die Gefäß stabilisierende Wirkung als Hauptmerkmal von Angp-1 anzusehen ist. Die Wirkung von Angp-2 scheint konträr zu Angp-1 zu sein. Überexpression von Angp-2 im embryonalen Endothel führte zu gleichen Defekten wie bei Angp-1 KO Mäusen, was auf eine antagonistische Wirkung während der embryonalen Entwicklung schließen lässt (Maisonpierre *et al.* 1997). Auch ist Angp-2 in EC von Blutgefäßen zu finden, welche sich im Stadium der aktiven Remodellierung wie Aussprossung oder Regression befinden. Angp-2 scheint also wichtig für die Destabilisierung von Gefäßen zu sein und somit bei der Initiierung der Angiogenese oder Regression von Blutgefäßen (Yancopoulos *et al.* 2000). Seine zunehmende Expression in Endothelzellen von Tumorgeweben, die

Fähigkeit chemotaktisch auf EC zu wirken und die Bildung von Tubulus-ähnlichen EC Strukturen zu stimulieren weist auf eine Funktion von Angp-2 auf die Angiogenese in adultem Gewebe hin (Mochizuki *et al.* 2002). Wichtig bei der Funktion der Angiopoietine scheint die Ratio Angp-2/Angp-1 im Verhältnis zur VEGF Expression zu sein (Goede *et al.* 1998; Wulff *et al.* 2000). Ein Anstieg der Ratio bei gleichzeitig hoher VEGF-Expression führt zur Destabilisierung von Blutgefäßen und Angiogenese, während eine hohe Ratio bei niedriger VEGF-Expression Blutgefäßregression bewirkt. Niedrige Angp-2/Angp-1 Ratio mit niedriger VEGF Expression resultiert in einer Stabilisierung der Blutgefäße (Hayashi *et al.* 2003).

Zu der Familie der Angiopoietine gehören zwei Rezeptoren, die Tie Rezeptoren (Witzenbichler *et al.* 1998). Während noch unbekannt ist, welche Liganden an Tie-1 binden, hat Tie-2 eine hohe Affinität sowohl für Angp-1 als auch Angp-2 (Teichert-Kuliszewska *et al.* 2001). Tie-2 wird in EC und frühen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Maisonpierre *et al.* 1997). Während Tie-2 in EC ein sehr komplexes System bildet, welches eventuell Co-Rezeptoren mit einschließt und nur durch Multimere aktiviert werden kann, scheint er in Fibroblasten als konventioneller Rezeptor Typ exprimiert und durch simple Dimere aktiviert zu werden (Davis *et al.* 2003). Dies könnte erklären, warum Angp-2 in EC überwiegend antagonistisch wirkt, während er in anderen Zelllinien meist eine aktivierende Wirkung auf Tie-2 hat (Maisonpierre *et al.* 1997; Teichert-Kuliszewska *et al.* 2001). Angp-1 dagegen bewirkt in EC und anderen Zellen eine rapide Autophosphorylierung von Tie-2 (Davis *et al.* 1996). KO Mäuse der jeweiligen Rezeptoren zeigten beide einen lethalen Phänotyp durch schwere Defekte in den embryonalen Blutgefäßen (Sato *et al.* 1995; Dumont *et al.* 1994). Die Entwicklungsstörungen der Tie-2 knockout Embryonen waren ähnlich, aber stärker ausgeprägt als bei Angp-1 defizitären Embryonen (Suri *et al.* 1996). Im Menschen führte eine aktivierende Mutation von Tie-2 zu einer unproportional hohen Anzahl von EC im Vergleich zu glatten Muskelzellen (Vikkula *et al.* 1996), was die Bedeutung von einem intakten Tie-2 System für die Kommunikation von EC mit umliegenden Zellen belegt. In adulten Gewebe wurde ein starkes Expressionssignal von Tie-2 mRNA in Lunge, Herz, Plazenta, in neu gebildeten Blutgefäßen im Ovar und in Granulationsgewebe von Hautwunden entdeckt, also Geweben mit einer hohen Proliferationsrate des vaskulären Endotheliums (Korhonen *et al.* 1992).

#### 2.2.2.4 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NO-Synthasen)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Regulator in vielen physiologischen Systemen. Es stellt ein pluripotentes Molekül dar, welches ein weites Spektrum an Effekten auf verschiedene Gewebe ausübt und insbesondere auch das Reproduktionssystem reguliert (Rosselli *et al.* 1998). Diese freien Radikale werden bei der Katalysierung von L-Arginin in L-Citrullin durch die NO-Synthetase (NOS) gebildet (Lowenstein *et al.* 1994). Essentiell für den Ablauf der Reaktion sind weitere Redox Co-Substrate, wie z.B. Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH), Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadenindinucleotid (FAD) (Dixit and Parvizi 2001). Von der NO-Synthetase existieren drei Isoformen, neuronales NOS (nNOS), endotheliales NOS (eNOS) und induzierbares NOS (iNOS), welche 50-60% Homologie aufweisen (Wang and Marsden 1995). Diese Enzyme unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht und –struktur, in der AS Sequenz, durch ihre regulatorischen Mechanismen und ihre Aktivität (Nathan and Xie 1994). nNOS und eNOS, auch als konstitutive NOS bezeichnet, benötigen beide Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )/Calmodulin für ihre Aktivierung (Snyder *et al.* 1996; Griffith and Stuehr 1995). iNOS ist  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig und wird hauptsächlich als Antwort auf inflammatorische Reize exprimiert (Morris, Jr. and Billiar 1994). nNOS wurde erstmals in Nervengewebe identifiziert und ist ein wichtiger Neurotransmitter und Neuromodulator im zentralen und peripheren Nervensystem (McCann *et al.* 1996), während eNOS aus EC isoliert wurde und eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Blutgefäßspannung spielt (Janssens *et al.* 1992).

NO selber hat eine extrem kurze Halbwertszeit von ~4 s und wird sehr schnell zu Nitrat via Nitrit oxidiert (Griffith and Stuehr 1995). Es reagiert sehr stark mit Superoxid Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) unter Bildung von Peroxinitrit ( $\text{OONO}^-$ ), welches zytotoxische Eigenschaften besitzt (Gryglewski *et al.* 1986). Andererseits ist es fähig, freie Radikale, insbesondere  $\text{O}_2^-$ , zu entfernen und so Zellschäden zu verhindern (Cooke and Tsao 1993). Die Reaktion von NO mit Thiolgruppen von Proteinen resultiert in der Formation von stabilen und biologisch aktiven S-Nitrosyl Derivaten, welche beständiger als NO selber sind (Stamler *et al.* 1992). NO ist in der Lage eine Reihe von Enzymen zu aktivieren, wie z.B. die lösliche Guanylat Cyclase, was zu einer erhöhten Konzentration an zyklischer Guanylmonophosphatase (cGMP) führt. Der Anstieg an cGMP stimuliert wichtige Signalübertragungswege, wie die  $\text{Ca}^{2+}$  Eisen Kanäle, welcher die Relaxation der glatten Muskulatur regulieren, oder verschiedene Protein Kinasen und Phosphatasen. Es wurde auch nachgewiesen, dass NO die mitogen aktivierte Protein Kinase Kaskade (MAPK) aktiviert (Lander *et al.* 1996). Diese ist mit der wichtigste Übertragungsmechanismus für Wachstumsfaktoren und

Zytokine, welche in zellulärer Proliferation und Differenzierung involviert sind. Die Rolle von NO in der Angiogenese ist noch nicht völlig geklärt. Erhöhte NO-Konzentrationen resultierten in EC Proliferation (Ziche *et al.* 1993) und Migration (Murohara *et al.* 1999) und scheinen Angiogenese *in vitro* und *in vivo* über den cGMP-Signalweg zu fördern (Babaei *et al.* 1998; Ziche *et al.* 1994). Zudem vermutet man, dass NO die angiogenen Aktivitäten verschiedener Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$ , FGF-2 und VEGF vermittelt (Babaei *et al.* 1998; Inoue *et al.* 1995; Papapetropoulos *et al.* 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Zugabe von NO-Inhibitoren die normalerweise durch VEGF ausgelöste EC Proliferation, Migration und Tubulusformation in EC-Kulturen unterbunden wurde (Babaei *et al.* 2003). Auch ist die durch Angp-1 induzierte Bildung von Kapillarähnlichen Strukturen *in vitro* und Neovaskularisation *in vivo* von NO abhängig (Babaei *et al.* 2003). Eine wichtige Funktion von NO ist die Kontrolle des basalen vaskulären Tonus und der Mikrozirkulation (Moncada *et al.* 1991). NO wird auch im Ovar synthetisiert und es wird vermutet, dass es eine Rolle in der Steroidogenese, Ovulation und Luteolyse spielt (Dixit and Parvizi 2001). Es senkt unter anderem die E2 Synthese durch Bindung an die P450 Aromatase und direkte Inhibierung deren Aktivität (Snyder *et al.* 1996; Bonello *et al.* 1996). Eine weitere Rolle scheint NO in der Erhöhung des ovariellen Blutflusses, welche nach dem LH-Gipfel einsetzt, zu spielen (Mitsube *et al.* 2002).

eNOS und iNOS wurden in verschiedenen Kompartimenten des Ovars entdeckt und von Gonadotropinen reguliert (Zackrisson *et al.* 1996; Jablonka-Shariff and Olson 1997). Studien an KO Mäusen bewiesen ein Funktion von eNOS auf die Follikelentwicklung. Die Ovarien von eNOS defizienten Mäusen enthielten weniger antrale Follikel und CL, zudem war die Reifung der Oozyten gestört und diese auch verstärkt apoptotisch (Jablonka-Shariff *et al.* 1999). Die signifikant erhöhten E2 Konzentrationen im späten Proöstrus bei diesen Mäusen weist darüber hinaus auf eine Rolle von eNOS produziertem NO auf die lokale Regulation von E2 hin (Jablonka-Shariff *et al.* 1999). iNOS KO Mäuse zeigten nur geringe Abweichungen, so dass eNOS eine primäre Rolle im ovariellen Zyklus zugeordnet wird.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Labortechnik

Axioskop	Zeiss Mikroskop, München
Bioanalyser 2100	Agilent Technologies, Waldbronn
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Chemilumineszenz Detektions Film	Lumi-Film, Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, UK
Chromatograph Papier	Whatmann, 3030704, Whatman, Maidstone, UK
Elektrophoresegeräte	GPS 200/400 LKB, Pharmacia, Freiburg GNA 100 LKB, Pharmacia, Freiburg Agagel, mini, Biometra, Göttingen Agagel, Midi, Biometra, Göttingen Xcell II mini Cell, Novex, San Diego, USA Standard Power Pack, Biometra, Göttingen
Einwegküvetten	Uvette, Eppendorf, Hamburg
Einbettungsform	10x20mm, Plano, Wetzlar
Einbettungsschlitten	Histosette II tissue, Simport, Canada
FastPrep	FP 120, BIO 101 Thermo Savant, Q Biogene, Heidelberg
FastPrep Schraubgefäße	Q Biogene, Heidelberg
Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno-Platte Maxisorb F 96 Nunc GmbH
Mikrotiterplattendispensor	Manifold-8-Chagonel, SLT Labinstruments Crailsheim
Mikrotiterplattenwaschgerät	SLT 96.PW, SLT Labinstruments, Crailsheim
Mikrowellenofen	Panasonic NN 6275B, UK
Nunc Immunoplatte	Nunc GmbH, 475094, Wiesbaden
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Standardtips, Eppendorf, Hamburg Diamond D 10 Tips, Gilson, Hamburg

	Sarsted, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	0,2 ml Micro-Tubes, Abgene House, UK 0,5 ml Biozym, 710912, Oldendorf 1,5-2,0 ml, Eppendorf, Hamburg 15 ml Cell Star, 188.271, Greiner, Frickenhausen 50 ml Cell Star, 227.261, Greiner, Frickenhausen
Tuberkulinspritzen	305620 Becton Dickinson, Heidelberg
RNA Nano Chips	Agilent Technologies, Waldbronn
Schüttelgeräte	Mixer Vortex-Genie, Bender & Hobein, München Mixer Vortex-Genie, 2 Model G-560E, USA Duomax 1030, Heidolph, Schwabach
Objektträger	SuperFrost®Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Plattenphotometer	SLT Spectra, SLT, Crailsheim
Thermocycler	Personal Cycler, Biometra, Göttingen Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus, USA Rotor-Gene 3000, Corbett Research,AUS
Wärmeschrank	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Video-Dokumentationssystem	Image Master VDS, Pharmacia, 80-6247-01, Freiburg VDS Film, 80-6249-67, Amersham Pharmacia Biotech
Waagen	Sartorius Universal, 04100 OD 2.2, Göttingen Sartorius, BP 1200, Göttingen
Wärmeblock	Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Osterode Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5415 R Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5804 Eppendorf, Hamburg

Sigma 3K30, Deisenhofen  
Multifuge 3S-R; Kendro, Hanau

### 3.2 Biochemika

Agarose	Amresco 710-50G, Ohio, USA
Bicinchoninsäure Lösung	Sigma, 100K5302, St. Louis, USA
BSA	Fraktion V, RIA Grade, Sigma, A-7888, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, 8122, Darmstadt
Butanol, Tert.	Merk, S35584213, Darmstadt
Chloroform	Merck, 2445, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Aldrich, 15.922-0, Steinheim
DAB Tabletten	Sigma, D4293, Deisenhofen
DMSO	Serva, 20385, Heidelberg
dNTP (je 25 µmol)	Roche, Mannheim
ECL Plus Western Blotting	Amersham Bioscience, RPN2124, UK Detection Reagents
EDTA (Triplex III)	Merck, 8418, Darmstadt
Entwickler	Kodak D-19, 5027065, Chalon-Sur-Saone, Frankreich
Essigsäure (100%)	Merck, 1.00063, Darmstadt
Ethanol (Absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid Tabletten	Oncor-Appligene S4070, Heidelberg
Eindeckharz	Eukitt, Kindler, Freiburg
Formaldehyd (37%)	Merck, 1.04094, Darmstadt
Glycin	Serva, 14201, Heidelberg
Glycerin (87%)	Merck, 1.04094, Darmstadt
Glycerin reinst	USB, 16374, Cleveland, USA
HCl (5 M)	Combi Titrisol, Merck, Darmstadt
Hexamere (pdN <sub>6</sub> )	Pharmacia, 27-2166-01, Freiburg
5'-PO <sub>4</sub> Na-Salz	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Urea	Merck, 818356
Iso-2-Propanol	Merck, 9634, Darmstadt
Kathon	pH 5,0, Rohm & Haas Ltd, 62368, UK

Kupfersulfat 4%	Sigma, 80K5004, St. Louis, USA
Medium 199	Sigma, M-2520, Deisenhof
Mayer's Hämalan	C.I. N °: 75290, Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, 1.06009, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, 6979.2, Karlsruhe
NaCl	Merck, 6404, Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	Merck, 6391, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, 6329, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, 6580, Darmstadt
NaOH (5 M)	Combi Titrisol, Merck, 9913, Darmstadt
NuPage™ MOPS SDS	Invitrogen, La0041, Carlsbad, USA
Running Buffer	
NuPage™ SDS	Novex
Paraffin	Vogel-Histo-Comp, Vogel, Gießen
PCR-H <sub>2</sub> O	Water Molecular Biology Grade, 0032 006.302, Eppendorf, Hamburg
Pikrinsäure	Merck, 1.00621, Darmstadt
Saccharose	Merck, 2402, Darmstadt
SDS Ultra pure	Roth, 2326.2, Karlsruhe
Trisaminomethanhydrochlorid	Merck, 9304, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl) -aminomethan	Riedel-de Haën, 33742, Seelze
Tween-20	Merck, S2479480812, Darmstadt

### 3.3 Kits

RNA-Extraktion	NucleoSpin RNA II, Machery-Nagel, Düren
RNA 6000	Nano reagents&supplies AgilentTechnologies,Waldbronn
qPCR	Ligt Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit, Roche, Mannheim
PCR-Produkt Aufreinigung	Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega

### 3.4 Antikörper

Kaninchen Anti-Human VEGFR-1 AK	Alpha Diagnostic, FLT-1 11-A, XSC0899A, San Antonio, USA
VEGF-164 Antiserum	Eigenproduktion H21 30.09.93
VEGF-164 Protein, bovine, rekombinant	D. Gospodarowicz, 28.10.97, Ciron, Oakland, USA
Kaninchen Anti-Bovine FGF-2 AK	Eigenproduktion, Kaninchen #14, 2.12.92
Ziege Anti-Kaninchen AK	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA
Peroxidase markierter Anti-Kaninchen IgG	Sigma, A-0545, Deisenhof
Kaninchen Anti-Progesteron AK	K. Okuda, OK-1 03.12.1997, Japan
Kaninchen Anti-Östradiol-17 $\beta$ AK	Eigenproduktion E2/2Pool1 23.11.1977
PGF2 $\alpha$ AK	R. Claus, AS S5, Ka III, E. 20.09.1987, Hohenheim

### 3.5 Enzyme

Reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transkriptase Rnase H (-) Point Mutant, Promega, Mannheim
Taq-Polymerase	Taq DNA-Polymerase, Roche, Mannheim

### 3.6 Marker

100 bp-Größenmarker	New England Biolabs, N3231S, Frankfurt
---------------------	--

### 3.7 Hormone

Progesteron	Sigma, P 0130 (Taufkirchen)
Östradiol-17 $\beta$	Serva, 31100, Heidelberg
PGF2 $\alpha$	Sigma, P-0424, Deisenhof
Peroxidase-markiertes Progesteron	Sigma, P3659, Taufkirchen
Peroxidase-markiertes Östradiol-17 $\beta$	Eigenproduktion 17 $\beta$ /2Pool1 26.07.1995
Peroxidase-markiertes PGF2 $\alpha$	Eigenproduktion 29.10.1997

### 3.8 Puffer und Lösungen

Coating-Puffer	4,29g/l $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ 2,93g/l $\text{NaHCO}_3$ pH 9,6
Assay-Puffer	7,12g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 8,5g/l $\text{NaCl}$ pH 7,2 1,0g/l BSA (0,1%)
Substratlösung A	1g/l $\text{H}_2\text{O}_2$ -Harnstoff 18g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10,3g Zitronensäure $\times 1 \text{ H}_2\text{O}$ 0,1ml Kathon pH 5,0 lichtempfindlich
Substratlösung B	300mg TMB (Tetramethylbenzidin) 40ml DMSO (Dimethylsulfoxid) 960ml $\text{H}_2\text{O}$ 10,3g Zitronensäure $\times 1 \text{ H}_2\text{O}$ pH 2,4 lichtempfindlich
Bromphenolblau/Glycerin-Lösung	15 $\mu\text{l}$ Bromphenolblaulösung 85 $\mu\text{l}$ Reinstwasser 100 $\mu\text{l}$ Glycerin reinst
Agarose-Gel 1,5 %	0,45g Agarose 30ml 1x TAE-Puffer 1,5 $\mu\text{l}$ Ethidiumbromidlösung
Ethidiumbromidlösung	10mg EtBr/ml $\text{H}_2\text{O}$
Ringer-Lösung	
RNA- $\text{H}_2\text{O}$	1L Reinstwasser 1ml DEPC über Nacht inkubieren 20min bei 121°C autoklavieren
50xTAE-Puffer	2M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 1M Essigsäure 90mm EDTA
Tris-Puffer	50mm Tris, pH 7,3 mit HCl einstellen

TBS I	20mm TrisBase 150mm NaCl 2ml 25% HCl auf 1L mit Reinstwasser auffüllen, pH 7,4-7,5 einstellen
TBS II	2,5% BSA 0,05% Tween 20 TBS I
TBS III	20% FKS TBS I
TBS V	0,5% BSA 0,05% Tween 20 TBS I
Transferpuffer	14,42g Glycin 3,028g Tris Base 200ml Methanol auf 1L mit Reinstwasser auffüllen
Bouinlösung	0,9% gesättigte, wässrige Pikrinsäure 9,5% Formalin 4,8% Essigsäure (100%)
PBS	0,24g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 8,0g/L NaCl 0,2g/L KCl 1,44g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

### 3.9 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Primer wurden von der MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Forward (for) und Reverse (rev) sind in 5' → 3' Richtung angegeben. Die Primersequenzen wurden von Mitarbeitern des Institutes entworfen oder der Literatur entnommen und sind entsprechend gekennzeichnet.

Tab. 1 Primersequenzen für die PCR, mit PCR-Produktlänge und Referenz/Acc.-Nr.

Bezeichnung	Sequenz	Produktlänge	Referenz/Acc.-Nr.
FGF-1	for CCAGGAAATTACAAGAAGCCC rev GTTTTCTCCAACCTTTCCA	264 bp	X60317
FGF-2	for TCAAAGGAGTGTGTGCGAAC rev CAGGGCCACATACCAACTG	161 bp	AJ577089
FGF-7	for CTGCCAAGTTTGCTCTACAG rev TCCAAGTCCAGGGTCTGAT	291 bp	AJ245447
FGFR-1IIIc	for ACTGCTGGAGTTAATACCACCG rev GCAGAGTGATGGGAGAGTCC	125 bp	AJ577088
FGFR-2IIIb	for TGGAGAATGAATACGGGTCC rev TCGGTCACAATTGAACAGAGC	298 bp	AJ 439895
FGFR-2IIIc	for CACCACGCCAAGAGATTG rev ATGGAGAGTGAAGGATATCCC	113 bp	AJ439896
VEGF-120	for CCGTCCCATTGAGACCCTG rev CGGCTTGTCACAATTTTTCTTGTC	280 bp	Lopes et al. (2003)
VEGF-164	for CCGTCCCATTGAGACCCTG rev GCCACAGGGATTTTCTTGTC	278 bp	Lopes et al. (2003)
VEGF-188	for CCGTCCCATTGAGACCCTG rev TGCCCTTTCCCTTTCCTC	296 bp	Lopes et al. (2003)
VEGFR-1	for AGAGCGACGTGTGGTCTAC rev ACAACAGGACGGCAAAGACT	270 bp	Gabler et al. (1999)
VEGFR-2	for AGACTGGTTCTGGCCCAAC rev GAAGCCTTCTGGCTGTCC	379 bp	Gabler et al. (1999)
Angpt-1	for CTT TCC TTT GCC TTC CTC G rev CTC TCT GCA GAG CGT TTG TG	197 bp	AF233227
Angpt-2	for AAT TCA GTT CTC CAA AAG CAG rev TCC ACC CGT TTC CAT GTC	237 bp	NM_213803
Tie-1	for AAG TTC TGT GCA AAT TGG GG rev TCA CTC AGG TAC TGC ATG CC	250 bp	AJ867846
Tie-2	for AGC TCT GAG CCT TAC TTT GGG rev TGC ACG CAG AGC TCA TAT TC	158 bp	AF251494
LHR	for GGAAATGGATTTGAAGAAATACAA rev GTGCTTTCACATTGTTTGAAAAG	376 bp	M29525
FSHR	for AAG CTT GTC GCC CTC ATG rev CAT TGT CTT CTG CCA GAG AGG	178 bp	AF025377
P450 Aro	for CATCATGCTGGACACCTCTAAC rev ATGTCTCTTTCACCAACAACAGTC	476 bp	U92245
iNOS	for TGATGGCACCATCATAGGG rev GTATTTGGGGTGTTCATGG	190 bp	SSU59390
eNOS	for GAGAGAGTTTCGCGGCAG rev AGAAGTGGGGGTATGCC	234 bp	SSU59924
Ubiquitin	For AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT Rev GCTCCACCTCCAGGGTGAT	198 bp	Z118245

### 3.10 Gewinnung und Präparierung des Probenmaterials

Bei der Untersuchung der mRNA Expression wurde von zwei verschiedenen Experimentansätzen ausgegangen: in Experiment 1 sollte hauptsächlich der Nachweis erbracht werden, dass die ausgewählten Faktoren im Follikel des Schweins exprimiert werden. Zudem sollte die Expression im Follikel im Vergleich zu ovariellen Stromagewebe und CL gestellt werden. Hierfür reichte es aus, den Follikel zusammenhängend aus TI und GC zu untersuchen und eine grobe Einteilung in verschiedene Größen vorzunehmen, um eine eventuelle Regulierung zu erkennen. Im Experiment 2 lag das Ziel darin, die Faktoren in den beiden Follikelkompartimenten TI und GC getrennt nachzuweisen um so eine vielleicht vorhandene unterschiedliche Regulierung zu erkennen. Hierfür war es nun auch wichtig, eine möglichst exakte Einteilung der Follikel in den Zeitraum der Follikularphase vorzunehmen, also etwa Tag 14-21 des Zyklus.

#### 3.10.1 Experiment 1

Ovarien von geschlechtsreifen Sauen wurden am Schlachthof (Landshut) 15–20min nach der Schlachtung der Tiere entnommen und direkt auf Eis gelagert. Am Institut wurden die Ovarien nach morphologischen Merkmalen der CL und Follikel (Leiser *et al.* 1988) in verschiedene Zyklusstadien unterteilt. Es wurden nur solche Ovarien ausgewählt, welche CL aufwiesen die zum Zyklusstadium der vorhandenen Follikel passten. Von Ovarien im spätlutealen als auch im folliculären Funktionsstadium wurden jeweils etwa zwei Follikel die gesund aussahen (helle Follikelflüssigkeit, gute Vaskularisierung der Theka Schichten) vorsichtig aus dem Gewebe geschnitten und ihre Größe mittels Schieblehre bestimmt. Mit Hilfe von feinen Pinzetten wurde unter dem Stereomikroskop die Theka interna von sämtlichen Stromagewebe befreit und FF mit einer Tuberkulinspritze aus der Follikelhöhle aspiriert. Die FF wurde bis zur weiteren Untersuchung bei –20°C gelagert. Zudem wurden CL verschiedener Zyklusstadien (n=6) und Stromagewebe (n=5) aus den Ovarien gewonnen. Die Proben wurden direkt nach der Präparation in flüssigen Stickstoff gegeben und bei –80°C gelagert.

#### 3.10.2 Experiment 2

Die Probengewinnung verlief wie in Experiment 2, mit dem Unterschied, dass die Follikel nach Entfernen des Stromagewebes aufgeschnitten und die GC mit einem kleinen Spatel vorsichtig von der TI geschabt wurden. Letztere wurde anschließend gründlich mit

Ringerlösung ab gespült. In einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge wurden die GC 10min bei 2100rpm abzentrifugiert und die Ringerlösung abpipetiert. Das Zellpellet und die TI wurden getrennt in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80°C gelagert.

### 3.11 Enzymimmuntest (EIA)

Konzentrationen von Progesteron, E2 und PGF2 $\alpha$  wurden direkt in der Follikelflüssigkeit mit Hilfe eines Enzym-Immun-Assays (EIA) mit Doppelantikörpertechnik bestimmt (Prakash *et al.* 1987; Meyer *et al.* 1990; Meyer *et al.* 1989).

Die Grundvorgehensweise wird hier mit Progesteron beschrieben, nur bei unterschiedlicher Verfahrensweise wird der Unterschied erwähnt.

Zunächst werden Mikrotiterplatten mit in Coating-Puffer gelösten Anti-Kaninchen IgG aus dem Schaf beschichtet (1 $\mu$ g IgG/Well). Darauf folgt die Zugabe von BSA haltigen Assay-Puffer, welcher dazu dient, die noch freien unspezifischen Bindungsstellen im Well abzusättigen. Nach dem Abkippen des Puffers werden die Platten zwei mal mit 400 $\mu$ l 0,05% Tween-80/Well gewaschen und gut ausgeklopft. Für jeden Testansatz wird eine Standardkurve mit nichtmarkiertem Progesteron und neun verschiedenen Konzentrationen von 0,05 bis 25ng/ml; E2 0,1-50pg/50 $\mu$ l, PGF2 $\alpha$  7– 7000pg/ml; hergestellt. Mit Meerrettichperoxidase (HRP=horse radish peroxidase) konjugiertes Progesteron (Progesteron-6 $\beta$ -hydroxyhemisuccinat-Meerrettichperoxidase, Östradiol-6-carboxy-methyl-oxim-Meerrettichperoxidase, PGF2 $\alpha$ -Meerrettich-peroxidase) und Anti-Progesteron IgG aus dem Kaninchen (Antikörper gegen Progesteron-7 $\alpha$ -Carboxyethylthioether-BSA, bzw. E2 gegen 6-Keto-17 $\beta$ -Östradiol-6-carboxymethyloxim-BSA) werden jeweils mit (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub> auf eine Endverdünnung von 1:4500 eingestellt. Follikelflüssigkeit wurde in Erwartung höherer Progesteron Konzentrationen 1:40 mit Assay-Puffer verdünnt, für die E2 Messung 1:100. Im Testansatz wird auf jedes Well 220 $\mu$ l Reagenz gegeben, welches aus 20 $\mu$ l Probe bzw. Standard, 100 $\mu$ l Enzym und 100 $\mu$ l des zweiten Antikörper besteht. Der zweite Antikörper bindet an dem Schaf IgG und kann an seinen beiden freien Ästen wiederum Progesteron binden, wobei das Progesteron der Probe in Konkurrenz zu dem HRP-konjugiertem Progesteron steht. Um unspezifische Bindungen des Progesterons ausschließen zu können, wird Assay-Puffer ohne Anti-Progesteron IgG anstelle der Probe eingesetzt. Die Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4°C im Dunkeln unter leichtem schütteln inkubiert, am nächsten Morgen abgekippt und vier mal mit 400 $\mu$ l 0,05% Tween-80/Well gewaschen. Durch Zugabe von 150 $\mu$ l einer Mischung aus Substratlösung A und B auf jedes Well wird die Farbreaktion gestartet. Die

Platten werden 40min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und dabei leicht geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wird 50µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jede Plattenvertiefung pipettiert.

Durch die Reaktion des Enzyms und Umsetzung des Substrates erscheint das Reagenz gelb. Je weniger Progesteron, in der Probe war, um so mehr Enzym-konjugiertes Progesteron konnte binden und um so stärker ist die Farbreaktion am Ende des Progesteronassays. Die Extinktion der gelben Farbe wird mit dem Photometer bestimmt und Computergestützt ausgewertet.

### **3.12 Gewinnung der RNA**

Bei der Arbeit mit RNA muss man beachten, dass sie durch RNAsen schnell abgebaut wird und somit eine relativ kurze Halbwertszeit hat. RNAsen sind in der Umwelt weit verbreitet und kommen insbesondere auf den Händen vor, weshalb das Tragen von Einmal-Handschuhen zum Schutz vor Kontamination unverzichtbar ist. Im Wasser vorkommende RNAsen werden durch den Zusatz von 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) abgebaut, Pinzetten vor Gebrauch mit Waschkohol abgeflammt. Alle Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen werden bei 121°C autoklaviert.

Bei der Extrahierung der RNA wurde das NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel verwendet, welches die RNA über einen Filter aufreinigt und einen Schritt zur DNA-Verdauung mittels DNase beinhaltet. Die Gewebeproben des Experimentes 1 und die Theka interna-Proben des Experimentes 2 wurden zunächst mit dem FastPrep 25s bei einer Geschwindigkeit von 6,0m/s homogenisiert. Dazu wurden 6 bis 13mg schwere, tiefgefrorene Gewebestücke mit einem sterilen Skalpell entnommen und in mit 300mg inerten Matrix-Kügelchen, 350µl RA 1 Lysepuffer und 3,5µl β-Mercaptoethanol beschickte FastPrep Schraubgefäße gegeben. Die Granulosazellpellets wurden hingegen direkt mit der gleichen Menge an RA 1 und β-Mercaptoethanol lysiert. Die strikt nach dem mitgelieferten Protokoll gewonnene RNA wurde in 42µl RNA-H<sub>2</sub>O gelöst, direkt auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.13 Überprüfung der Quantität und Qualität der RNA**

#### **3.13.1 Biophotometer**

Mittels UV-Messung bei 260nm im Biophotometer wird die RNA-Ausbeute bestimmt. Dabei wird die RNA je nach erwarteter Ausbeute 1:10 bis 1:50 verdünnt und jede Probe dreimal gemessen. Von diesen Verdünnungstriplikaten wird der Mittelwert berechnet um

so die genaue Konzentration der Stammlösung zu erhalten und spätere Verdünnungsfehler zu minimieren.

Die Reinheit der RNA wird durch Messungen bei 230nm (Phenol) und 280nm (Proteine) überprüft. Das Verhältnis von RNA zu Protein, also 260/280nm lag zwischen 1,6 und 1,8, was einer hohen Reinheit der isolierten RNA entspricht.

Die RNA wird einer weiteren Qualitätsprüfung im Bioanalyser unterzogen.

### 3.13.2 Bioanalyser

Das Funktionsprinzip des Bioanalyzers ist die elektrophoretische Trennung der RNA Proben und anschließende Erkennung über laserinduzierte Fluoreszenzstrahlung. Dazu wird die RNA auf einen speziellen Chip gegeben, welcher eine bestimmte Anzahl von Mikrokanälen besitzt. In diesen werden die RNA Fragmente ihrer Größe nach separiert.

Über die Bioanalyser Software wird ein Elektropherogram und eine Abbildung in Gelform erstellt und das Verhältnis von 18S und 28S rRNA, als auch die RNA Konzentration der Proben aufgezeigt. Als Referenzwert für die Analyse fungiert der RNA 6000 ladder Standard, welcher sechs RNA Fragmente folgender Größe beinhaltet: 0,2kb, 0,5kb, 1kb, 4kb und 6kb. Die unbekanntenen Proben werden von der Software mit dem Standard verglichen und so die Konzentration der RNA und die rRNA Höchstwerte der Proben berechnet.

Wichtige Merkmale für einen erfolgreichen Standard Lauf sind die Abbildung von sechs RNA Gipfeln und einem Marker Gipfel. Außerdem sollten zwei ausgeprägte ribosomale Gipfel, die mit den 18S und 28S Gipfeln eukaryotischer RNA vergleichbar sind, und eine relative flache Grundlinie zwischen den 5S und 18S Gipfeln zu sehen sein. Für den erfolgreichen Lauf der gesamt RNA sind zwei ribosomale Gipfel und ein Marker Gipfel und eine flache Grundlinie vor, zwischen und nach den Gipfeln aussagekräftig.

Die Qualität der RNA wird einmal über die RNA Integrity Number (RIN) dargestellt, welche von der Software berechnet wird und Werte von 1 bis 10 beinhaltet. Ein RIN-Wert von 1 würde eine stark degradierte RNA, ein Wert von 10 eine hoch intakte RNA bedeuten. Ein weiterer Qualitätsindikator ist das Verhältnis von der Menge der 28S rRNA zur 18S rRNA, hierbei wäre der beste Wert 2. Das Verfahren an sich wurde strikt nach dem Protokoll des Agilent Bioanalyzers durchgeführt, es wurden RNA Konzentrationen von mindestens 40ng/ml bis zu 300ng/ml eingesetzt.

### 3.14 Reverse Transkription (RT)

RNA hat den Nachteil, dass sie durch RNAsen schnell abgebaut wird und von der Taq-Polymerase schlecht als Matrize erkannt wird. Daher werden mit Hilfe der reverse Transkriptase, ein in RNA-Viren vorkommendes Enzym, aus einzelsträngiger RNA komplementäre cDNA-Stränge hergestellt (cDNA, complementary DNA). cDNA ist wesentlich stabiler als RNA, kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden und z.B. für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) genutzt werden. Die reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transkriptase RNase H minus, Point Mutant, Promega) benötigt hierzu Desoxyribonukleosid Triphosphate (dNTP), Magnesium-Ionen ( $\text{MgCl}_2$  im 5x M-MLV Puffer) und nichtspezifische Primer (Random Hexamere). Da Gesamt-RNA eingesetzt wird, die sowohl mRNA, als auch rRNA enthält, und da die reverse Transkriptase beide Formen in cDNA umschreibt, enthält auch die erhaltene cDNA alle Sequenzen aus mRNA und rRNA. Diese Transkription von RNA in cDNA erfolgt optimalerweise im Verhältnis 1:1.

Es wurden  $1\mu\text{g}$  RNA in  $25\mu\text{l}$  RNA-Wasser für 5min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt.

Tab.2 Mastermix für einen  $60\mu\text{l}$  RT-Ansatz

	1x Volumen [ $1\mu\text{l}$ ]
RNA- $\text{H}_2\text{O}$	16
5x M-MLV Puffer	12
Random Hexamere ( $50\mu\text{M}$ )	3
dNTP ( $10\text{mM}$ )	3
M-MLV RT-RNase (H <sup>-</sup> ) $200\text{U}/\mu\text{l}$	1

Je  $35\mu\text{l}$  des Mastermix werden zu  $25\mu\text{l}$  RNA gegeben (Gesamt-Reaktionsvolumen von  $60\mu\text{l}$ ), vermischt und anschließend 5min bei  $30^{\circ}\text{C}$ , gefolgt von 45min bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Abschließend werden die Proben 2min bei  $90^{\circ}\text{C}$  denaturiert, um den DNA-RNA-Strang zu trennen und die temperaturempfindlichen RT-Enzyme, sowie die RNA-Matrize zu zerstören. Die erhaltene cDNA hat eine Konzentration von  $16,66\text{ng}/\mu\text{l}$  und wird bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.15.1 Block-PCR

Die PCR dient dazu, einen bestimmten DNA-Bereich, der zwischen zwei spezifischen Primern liegt, zu amplifizieren. Man geht davon aus, dass sowohl die RT, als auch die PCR quantitativ erfolgt, d.h. die cDNA bzw. das PCR-Produkt also optimalerweise im Verhältnis 1:1 zur Vorlage umgeschrieben bzw. amplifiziert wird. Daher kann man aufgrund der Menge des PCR-Produktes Rückschlüsse ziehen auf die Menge der in der Zelle vorliegenden mRNA, die für das entsprechende Produkt kodiert. In der PCR nimmt das PCR-Produkt idealerweise um  $2^n$  mit  $n$  = Zykluszahl, also exponentiell, zu.

Die Amplifikation des Ziel-Gens wird von einer Thermostabilen DNA-Polymerase ausgeführt und beinhaltet drei Schritte, welche innerhalb eines sogenannten Zyklus ablaufen.

Denaturierung: Zu Beginn eines jeden Zyklus wird die DNA bei  $94^\circ\text{C}$  denaturiert, um die doppelsträngige DNA zu trennen. Der erste Zyklus einer PCR beginnt mit einem langen Denaturierungsschritt von 2min um sicherzustellen, dass beide Stränge der Proben DNA vollständig getrennt sind.

Annealing: Nach der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch abgekühlt, so dass es den Primern möglich ist, sich an die komplementäre Einzelstrangmatrize der Proben DNA anzulagern. Die Annealing Temperatur ist für jeden Primer spezifisch und muss für jedes PCR-Produkt optimiert werden.

Elongation: Die optimale Temperatur für die Taq-Polymerase zur Anbindung an die Einzelstrang-DNA und Synthetisierung eines neuen, zur Proben DNA komplementären Stranges, liegt bei  $72^\circ\text{C}$ .

Durch Einbau von Nukleotiden am 3' Ende des Primers entsteht aus jedem ursprünglichen Einzelstrang der Probe eine doppelsträngige DNA, welche im nachfolgenden Zyklus ebenfalls als Matrize dient.

Tab.3 Reaktionsmischung für Block-PCR

	1x Volumen [µl]
PCR-H <sub>2</sub> O	18,9
10x Puffer ( mit MgCL <sub>2</sub> )	2,5
dNTP (10mM)	0,5
forward Primer (20µM)	0,5
reverse Primer (20µM)	0,5
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1
cDNA	2

Die Proben werden gemischt, kurz abzentrifugiert und in den vorgeheizten Blockzykler gestellt.

Tab.4 Allgemeinen Parameter der Block-PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]	Zyklen
Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	45	Primer spezifisch
Annealing	Primer spezifisch	45	
Elongation	72	45	
Elongation	72	120	1
Pause	5	Nicht limitiert	

### 3.15.2 Gradienten PCR

Das Prinzip und der Ablauf der Gradienten PCR entspricht dem der konventionellen Block PCR. Der Unterschied besteht darin, dass die Reaktion in speziellen Geräten abläuft, die es möglich machen, die Annealing-Temperatur für die Probenvertiefungen in einer Reihe individuell einzustellen. Diese Methode ist besonders geeignet um die optimale, spezifische Annealing-Temperatur eines Primers zu bestimmen. Dafür wird eine PCR mit mehreren Ansätzen der gleichen Probe durchgeführt. Alle Ansätze werden gleich behandelt, nur die Annealing-Temperatur wird variiert. In einem Agarose-Gel (siehe weiter unten), kann dann Aufgrund der Banden Intensität und –integrität die PCR Effizienz beurteilt und die optimalen PCR Bedingungen des Primers bestimmt werden.

### 3.15.3 Quantitative Reverse Transkription real-time PCR (qRT-PCR)

Neue PCR Varianten, wie z.B. der Rotor-Gene oder Light-Cycler mit modernen Anfärbungstechniken und Detektionssystemen, ermöglichen die zeitgleiche Sichtbarmachung der ablaufenden PCR-Reaktion und gleichzeitig die Quantifizierung des DNA-Gehaltes der Probe noch im Reaktionsgefäß. Das Grundprinzip im Rotor-Gene-PCR ist das gleiche wie bei der Block-PCR: Durch die Denaturierung bei 95°C über 10min werden die cDNA-Einzelstränge getrennt. Es folgt die Amplifikationsphase, in der das Annealing der Primer und die Elongation des Produktes stattfindet. Die Amplifikation wird über mehrere Zyklen wiederholt, bis die Plateauphase erreicht ist, in welcher die Reaktionsbedingungen keine weitere Amplifizierung mehr erlaubt. Der Unterschied besteht im Wesentlichen in der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Im Rotor-Gene wird SYBR-GREEN eingesetzt, ein Farbstoff, welcher sich in die minor-grooves der doppelsträngigen DNA einlagert und Licht im Wellenlängenbereich von 560 nm abstrahlt, wenn er mit 497nm angeregt wurde. Mit jedem Zyklus wird die Menge an DNA durch die Polymerase verdoppelt und somit am Ende des Elongation-Schrittes ein immer stärkeres Lichtsignal gemessen. Dieser Vorgang kann am Computerbildschirm mit Hilfe von einer Analyse Software für jede Probe einzeln beobachtet werden, selbst wenn der Reaktionsvorgang noch nicht abgeschlossen ist.

Abb.1 zeigt eine charakteristische Amplifikationskurve, welche von der Rotor-Gene Software berechnet wurde und die in vier Phasen eingeteilt werden kann. Während der Phase 1 findet eine exponentielle Amplifikation statt, das Fluoreszenzsignal liegt aber unter einem von der Software berechnetem und korrigiertem Hintergrundrauschen. Phase 2 ist die exponentielle Amplifikationsphase, Phase 3 die lineare Amplifikationsphase, in welcher die PCR an Effizienz verliert und Phase 4 die Plateauphase.

Nach Beendigung des Laufes wird mittels der „comparative quantitation“ Methode des Rotor-Gene Analyse Software V5.0 der sogenannte „Crossing Point“ (CP) berechnet. Der CP einer Probe beschreibt diejenige Zyklenzahl, an der die zweite Ableitung der sigmoidalen Fluoreszenzkurve ihr Maximum hat, d.h. dort, wo die positive Beschleunigung des Fluoreszenzanstiegs am höchsten ist (2. Phase). Je mehr DNA also in der Probe war, desto schneller wird ein Fluoreszenzsignal erreicht das über dem Hintergrundrauschen liegt, umso niedriger ist der CP-Wert im Vergleich zur Probe mit weniger DNA Gehalt.

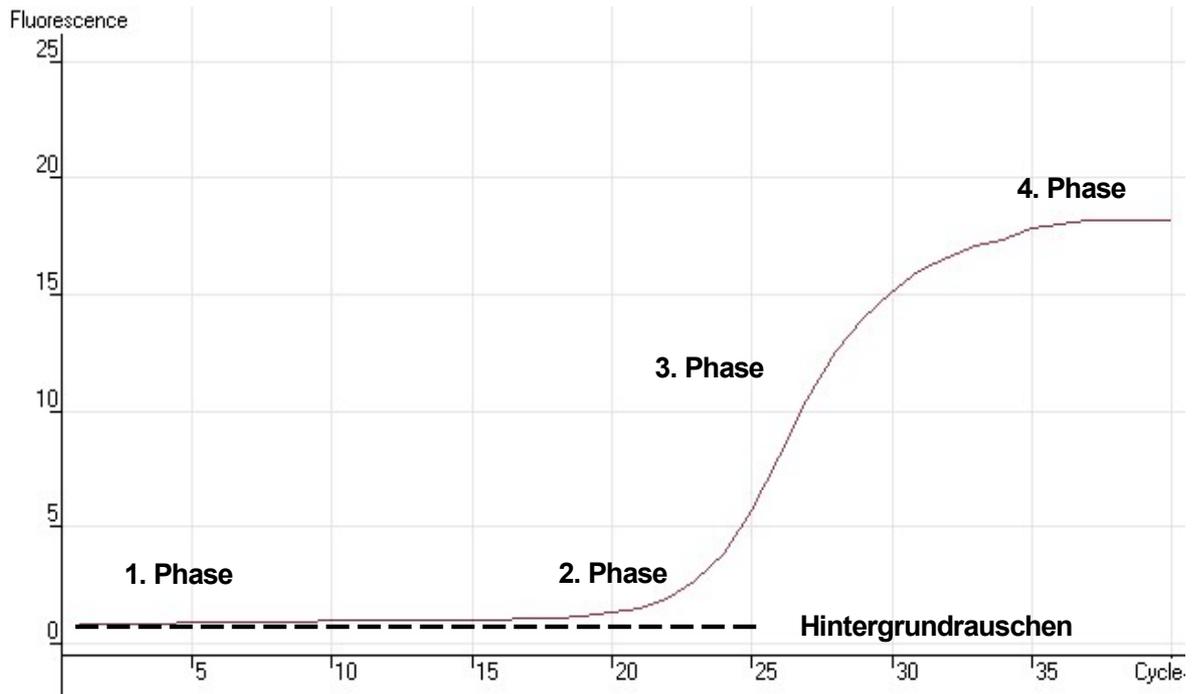


Abb.1 Sigmoidale Amplifikationskurve eines qRT-PCR Durchgang; 1. Phase; Hintergrundfluoreszenz („Grundrauschen“), 2. Phase; exponentielle Amplifikationsphase, 3. Phase; linearer Bereich der exponentiellen Anstiegsphase, 4. Phase; Plateauphase

An die Amplifikationsphase schließt sich eine Schmelzphase an, in welcher die Temperatur in kleinen Schritten von 60°C bis 99°C erhöht wird, bei gleichzeitiger kontinuierlicher Messung des Fluoreszenzsignals. So entsteht eine Schmelzkurve, die einen plötzlichen Abfall in der Signalintensität bei der Schmelztemperatur und damit die Auftrennung des spezifischen PCR-Produktes zeigt und auch als Peak (Abb.2) dargestellt werden kann. Der produkt spezifische Schmelzpunkt ist abhängig vom Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen im Produkt (G/C-Gehalt).

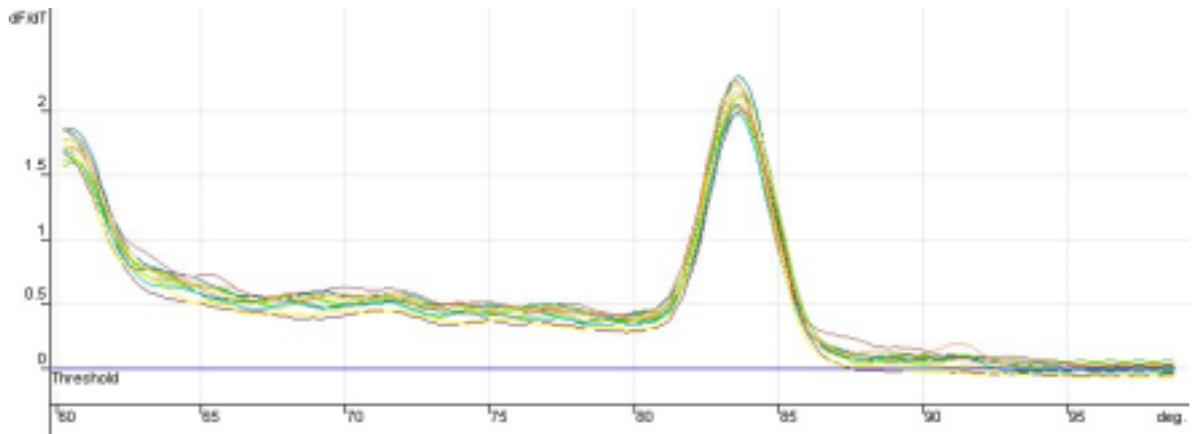


Abb.2 Eine typische Schmelzkurve, deren Schmelzpunkt, hier etwa bei 84 °C, dem eines spezifischen Produktes entspricht.

Für den Ansatz der PCR wird der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit verwendet.

Tab.5 Zusammensetzung des LightCycler FastStart Mastermix

	<b>1x Volumen [1µl]</b>
cDNA	1
PCR-H <sub>2</sub> O	6,4
MgCL <sub>3</sub> (3mM)	1,2
forward Primer (20µM)	0,2
Reverse Primer (20µM)	0,2
LightCyCLer FastStart Mix	1

Zu 9µl des Mastermix werden dann 1µl cDNA hinzupipettiert und die geschlossenen Rotor-Gene Reaktionsgefäße werden in das Karussell eingesetzt. Man gibt die Primer spezifischen Einstellungen für den PCR-Lauf in den Computer ein und startet den Rotor-Gene.

Tab.6 Die grundsätzlichen Einstellungen für den Rotor-Gene.

	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]	Zyklen
Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	10	40-45 Produkt-spezifisch
Annealing	Primer-spezifisch	10	
Elongation	72	15	
Schmelzphase	66-99	0,5°C/s	1
Pause	40	60	1

Tab.7 PCR-Produkt spezifische Angaben zu Annealing-Temperatur und Schmelzpunkt der untersuchten Faktoren

Primer	Annealing-Temperatur [°C]	Schmelzpunkt [°C]
VEGF-120	62	91,55
VEGF-164	62	91,48
VEGF-188	62	91,55
VEGFR-2	65	88,08
VEGFR-1	62	92,94
FGF-1	61	91,28
FGF-2	60	83,66
FGF-7	58	86,3
FGFR-1IIIc	62	86,79
FGFR-2IIIb	62	93,53
FGFR-2IIIc	58	83
eNOS	60	92,45
iNOS	60	92,65
P450 Aro	62	86,46
LHR	62	88,38
FSHR	62	84,36
Angp-1	60	88
Angp-2	58	87,5
Tie-1	64	91,35
Tie-2	60	84,23
Ubiquitin	60	91

Die PCR mit dem Rotor-Gene hat gegenüber der Block-PCR eine Reihe von Vorteilen: Durch die Verwendung von Materialien mit geringer Wärmekapazität können im Rotor-Gene Aufheiz- und Abkühlraten von bis zu 20°C pro Sekunde erreicht werden. Durch einen Ventilator wird die Temperatur homogen im Gerät und damit gleichmäßig auf die Reaktionsgefäße verteilt. Hierdurch ist eine exaktere Amplifikation des gewünschten Produktes möglich. Außerdem können durch das geringe Reaktionsvolumen von 10µl und das effektive Heiz- und Kühlsystem die Elongationszeiten so kurz gehalten werden, das lange PCR-Produkte, wie sie bei Vorhandensein von genomischer DNA entstehen können, gar nicht erst amplifiziert werden. Zudem ist der Zeitaufwand wesentlich geringer. Die Möglichkeit von methodischen Fehlern wird durch weniger Zwischenschritte von der cDNA bis zu den Rohdaten geringer. Durch die sehr sensitive Methode können auch sehr geringe Mengen von DNA amplifiziert und somit auch sehr kleine Unterschiede festgestellt werden. Um sicher zu gehen, dass die Unterschiede bei den Crossing Points auch wirklich durch unterschiedliche Mengen an RNA in den Proben zustande kommen und nicht andere Faktoren die Differenzen zwischen den Proben bewirken, wird ein sogenanntes Housekeeping-Gen (HKG) als Referenz-Gen verwendet. HKG sind Gene, von den angenommen wird, dass sie in den verschiedenen Geweben nicht reguliert sind, z.B. 18s, welches in der Nukleinsäuren-Synthese involviert ist oder GAPDH, welches in der Glykolyse eine Rolle spielt. In Experiment 1 und Experiment 2 wurde das HKG Ubiquitin im Rotor-Gene untersucht. Die mRNA-Expression von Ubiquitin zeigte nach diesen Daten keine signifikante Regulierung in den verschiedenen Geweben des Ovars und Entwicklungsstadien der Follikel. Deshalb wurde Ubiquitin als Referenz-Gen ausgewählt und alle Daten der Proben-Gene gegen Ubiquitin normalisiert. Der normalisierte CP Wert wird als  $\Delta CP$  bezeichnet. Die Formel für die Normalisierung lautet folgend:

$$\Delta CP = CP_{Zx} - CP_{Ubiqu\ x}$$

$\Delta CP$  = normalisierter Crossing Point

$CP_{Zx}$  = Crossing Point des Zielgens der Probe x

$CP_{Ubiqu\ x}$  = Crossing Point von Ubiquitin der Probe x

Um die Unterschiede der mRNA Expression zwischen den einzelnen Gruppen für den jeweilig untersuchten Faktor in Zahlen zu fassen, wurde der Mittelwert der  $\Delta CP$  für jede Gruppe ermittelt. Da das PCR-Produkt idealerweise in jedem Zyklus verdoppelt wird, ergibt sich ein  $2^n$ -facher Unterschied in der Menge der exprimierten mRNA, n ist dabei die

Differenz zwischen den Mittelwert der  $\Delta CP$  Werte. Damit die Stärke der mRNA-Expression an den Graphen schnell ablesbar ist, wurden die Werte als 40-  $\Delta CP$  bzw bei Ubiquitin als 40-CP dargestellt.

### 3.15.4 Primer-Design und Optimierung

Theoretisch geht man davon aus, dass sich das PCR-Produkt mit jedem Amplifikationszyklus verdoppelt. Allerdings sind die Reaktionsbedingungen abhängig vom untersuchten Gewebe und dem eingesetzten Primer selten optimal, so dass man die PCR an verschiedenen Bereichen noch optimieren kann. So können Annealing-Temperatur,  $MgCl_2$ -Konzentration, dNTP- und auch Primer-Konzentration individuell variiert werden. Aus Praktikabilitäts- und Kostengründen hat es sich als günstig erwiesen, die PCR-Bedingungen primär über ein gutes Primer-Design zu optimieren. Ein Primer sollte möglichst folgende Eigenschaften enthalten: die Länge des PCR-Produktes sollte sich zwischen 100-250 bp befinden, die Primerlänge zwischen 18-22 bp, der G/C-Gehalt bei 40-60%, die Schmelztemperatur der Primerpaare sollte um die 60°C liegen, mit nicht mehr als 0,5°C Unterschied zwischen forward und reverse Primer. Die Komplementarität der Primer muss niedrig gehalten werden (Primer-Primer-Annealing), zudem die Möglichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen (Self-Annealing) verhindert werden. Ist die Gen-Sequenz für die Spezies des gesuchten Primers noch nicht bekannt, so werden verschiedene cDNA Sequenzen anderer Spezies verglichen und der Primer in Bereiche mit einer hohen Homologie der verschiedenen Sequenzen gelegt. Wir verwendeten kommerziell synthetisierte oligonukleotid Primer ( MWG, Ebersberg, Munich).

### 3.15.5 Analyse des PCR-Produktes

#### Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung

Elektrophorese wird verwendet um Makromoleküle, wie z.B. Nukleinsäuren, ihrer Größe, elektrischen Ladung oder Konformation nach zu trennen. Nukleinsäuren besitzen eine negative Ladung und werden innerhalb eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode gezogen. Dazu werden PCR-Produkte in taschenförmige Aussparungen eines Gels gegeben und wandern durch das Gel in Richtung des Plus-Pols. Das Gel befindet sich in einer Gelkammer, in der es mit einem Elektrophorese-Puffer bedeckt wird, welcher den gleichmäßigen Lauf und einen konstanten pH-Wert bewirkt. Einer der Bestandteile des Gels ist Agarose, einem aus Algen extrahiertem Polysaccharid. Agarosepulver wird dabei

in Konzentrationen von 0,5 bis 2% in Elektrophorese-Puffer aufgelöst. Je höher die Konzentration der Agarose, um so feinmaschiger wird das Agarosegel und umso kleinere DNA-Fragmente werden aufgetrennt. Es wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet, um festzustellen, ob die erhaltenen PCR Produkte aus der Block-PCR und qRT-PCR auch die erwarteten Fragmente darstellten und ob sie intakt waren. Dafür wurden 5µl Block-PCR Produkte mit 1µl Bromphenolblau-Glycerin gemischt und auf ein 1,8% Gel, das pro 10ml 0,5µl Ethidiumbromid enthält, aufgetragen. Von den qPCR-Produkten wurden 2µl mit 2µl Elektrophorese-Puffer und 2µl Bromphenolblau-Glycerin vermischt. Zur Überprüfung der Produktlänge lässt man außerdem 0,5µl eines 100bp Markers, vermischt mit 1µl Bromphenolblau und 1,5µl TAE-Puffer mitlaufen. Die Elektrophorese erfolgt bei 80V über etwa 45min. Anschließend wird das Gel aus der Gelkammer genommen und die Banden mit UV-Licht zum fluoreszieren gebracht und mit einem Videodokumentationssystem aufgenommen. Für etablierte Primerpaare reicht die Bestimmung des PCR-Produktes über die charakteristischen Schmelzkurve und die Länge der Fragmente im Agarose-Gel. Die Produkte neu erstellter Primerpaare, insbesondere wenn die Sequenz der untersuchten Spezies noch nicht bekannt war, wurden mit einem PCR-Produkt Aufreinigungssystem purifiziert und anschließend sequenziert (Medigenomix GmbH, München). Die Sequenz wird dann mit den entsprechenden Sequenzen vom Schwein oder anderen Spezies aus der EMBL-Datenbank verglichen und bei noch nicht vorhandener Sequenz in die Datenbank gestellt.

### 3.16 Westernblot

Die Methode des Western Blot ist ein immunologisches Verfahren zur Bestimmung eines Proteins in einem Proteingemisch. Durch die vorgeschaltete Gelelektrophorese und die Verwendung eines Molekulargewichtmarkers ist eine Aussage über das Molekulargewicht des detektierten Proteins möglich. In der SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulphate-Polyacryl-Amid Gelelektrophorese) wandern Proteinmoleküle im Gel in einem elektrischen Feld. Die individuelle Wanderungsgeschwindigkeit hängt vom Molekulargewicht, der Ladung der Proteine, der Form der Proteine und der Gelkonzentration ab.

Als Probenmaterial wurden am Schlachthof Ovarien von Sauen 20min nach dem Schlachten gewonnen und sofort auf Eis zum Institut transportiert. Es wurden drei Ovarien, die sich nach Beschaffenheit der Follikel und Gelbkörper in der Zyklusphase der späten Follikularphase befanden ausgewählt. Jeweils Stromagewebe und mehrere Follikel (7-9mm) wurden mit einer feinen Schere aus den Ovarien herauspräpariert und

die Follikel unter dem Stereomikroskop von jeglichem Stromagewebe befreit. Anschließend wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Proteingewinnung wurde 100mg Gewebe in 1ml PBS mit einer BSA mini-Tablette gegeben. Die BSA-Tablette enthält reversible und irreversible Proteasen Inhibitoren und schützt die Proteine so vor einem breiten Spektrum an Serin-, Cystein- und Metallo Proteasen. Die Mischung aus Gewebe und Puffer wurde mit Matrix-Kugeln im Fast Prep homogenisiert und danach eine weitere Stunde im Eisbad gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation bei 3500xg für 10min. Der Gesamtproteingehalt (GP) im gewonnen Überstand wurde mittels BCA-Test bestimmt. Dazu wurde BCA Farbreagenz aus Bicinchoninsäure und 4%igem Kupfersulfat und eine Standardkurve von  $0\mu\text{g}$  BSA/ml PBS als Blindwert bis  $1000\mu\text{g}$  BSA/ml PBS angesetzt. Je  $20\mu\text{l}$  Lösung für Standardpunkte, Blindwerte und Proteinlösungen wurden als Doppelwerte auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, mit je  $300\mu\text{l}$  BCA Farbreagenzlösung versetzt und 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Platte in einem SLT SPECTRA Plattenphotometer (SLT, Deutschland) bei der Wellenlänge 540nm vermessen. Die SLT Software EASY-FIT berechnet die Proteinkonzentration als Mittelwert der beiden Doppelansätze abhängig vom Blindwert und der BSA Standardkurve. Um den Einfluss der Protein-Eigenladung auf die Wanderungsgeschwindigkeit zu unterdrücken und zur Proteindenaturierung, wurden die Proteinproben 1:4 mit SDS-Probenpuffer gemischt und  $1\mu\text{l}$  Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Anschließend wurden die Proben 5min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Es wurde  $25\mu\text{g}$  GP aus Follikeln und  $10\mu\text{g}$  GP aus Stromagewebe eingesetzt.

Zur Auftrennung des Proteingemisches wurden die Proben und ein Marker auf ein kommerziell erhältliches 12% Bis-Tris Gel aufgetragen und dieses in eine Laufkammer eingespannt. Anschließend wurde die Kammer mit MES-Laufpuffer aufgefüllt. Zur Auftrennung der Proteine wurde 1h lang 190 V durch das Gel geleitet. Im nächsten Schritt wurden die so getrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Millipore, England) übertragen und fixiert. Dies geschieht elektrophoretisch mittels einer BIOMETRA Blot-Apparatur die mit Transferpuffer gefüllt wurde. Man erhält so eine Kopie des Gels auf der mechanisch stabileren Membran. Für den Übertragungsvorgang wurde ein Stapel aus 3 x Blotting Pad, Filterpapier, SDS-PAGE-Gel, Membran, Filterpapier und 3 x Blotting Pad in die Blot-Apparatur eingespannt. Die Blotting Pads und das Filterpapier wurden zuvor in Transferpuffer eingelegt, die Membran in Methanol. Die Übertragung erfolgte 50min bei 30V und Zimmertemperatur. Um die während des Blottens freigebliebenen Bindungsstellen der Membran und damit unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurde diese über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in PBS mit 0,05% Tween-20 und 1% Magermilchpulver (MM) inkubiert. Der Nachweis des Antigens erfolgte

durch das indirekte Detektionsverfahren. Der polyklonale FGF-2-AK aus dem Kaninchen (in unserem eigenen Labor hergestellt gegen rekombinantes bovines FGF-2) wurde in TBS-Tween 1%MM 1:40000 fach verdünnt. Die Membran wurde darin 75min lang am Rollbrettschüttler inkubiert. Es folgten ein Waschschritt über 5min mit TBS-Tween 1%MM und drei Waschschrte über 10min mit TBS-Tween. Anschließend wurde die Membran in TBS-Tween 1%MM mit Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) konjugierte Ziege-Anti-Kaninchen 2. AK (IgG; 1:2000fach verdünnt) für 45min inkubiert und die oben genannten Waschschrte wiederholt.

Die Sichtbarmachung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde mittels ECL (enhanced chemiluminescent detection reagents)-System durchgeführt. Die Membran wurde 1min am Rollbrettschüttler in der ECL-Lösung inkubiert und danach direkt in die Fotokassette eingespannt und im Fotolabor entwickelt. Die lumineszierenden Stellen auf der Membran erscheinen auf dem Film schwarz.

### **3.17 Immunhistochemie**

Immunhistochemisch wurden die Faktoren FGF-2, VEGF und VEGFR-1 untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von FGF-2 wurden von Prof. Amselgruber (Anatomie Hohenheim, Stuttgart) durchgeführt. Die Schnitte wurden nach dem gleichen Verfahren wie unten beschrieben behandelt, mit der Ausnahme, dass PBS-Puffer verwendet wurde und unspezifische Bindungen des 1. Antikörper durch eine einstündige Inkubation mit normalem Ziegen-Serum (10%) geblockt wurden. Der FGF-2 Primär-Antikörper (AK) war identisch mit dem beim Westernblot verwendeten AK und wurde in einer 1:9000 Endverdünung eingesetzt.

Untersuchungen zu VEGF und VEGFR-1 mittels indirektem Detektionsverfahren (HRP gekoppelter Zweitantikörper) wurden in unserem Institut vorgenommen. Dazu wurden aus am Schlachthof gewonnene Schweineovarien etwa 0,5x0,5 cm große Gewebstücke mit etwa 2-4mm großen Follikeln entnommen und 12 Stunden (h) in Bouin-Puffer fixiert. Dieser dient dazu, Verderbnisprozesse durch Inaktivierung von Schimmelpilzen, Bakterien und Enzymen zu unterbinden. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 96%, 100%, 100% EtOH und 100% tertiären Butanol im Verhältnis 1:1 für jeweils 2h) wurden die Stücke jeweils 10h in 40°C warmen tertiären Butanol und bei 58°C geschmolzenem Paraffin inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Von den ausgehärteten Blöcken wurden 5µm dicke Schnitte gefertigt, in warmen Wasser geglättet und auf Objektträger mit einer permanenten

positiven Ladung gezogen. Um die Schnitte auf die Bearbeitung mit Antikörpern und Farbstoffen vorzubereiten, wurden sie mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Nach der Blockierung endogener Peroxidasen (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30min) und dreifacher Waschung in TBS V Puffer, wurden durch Inkubation (30min) mit TBS III Puffer, welcher FKS enthält, unspezifische Bindungen des nachfolgenden 1.AK blockiert. Durch diese beiden Schritte sollen unspezifische Hintergrundfärbungen minimiert werden. Der polyklonale Kaninchen Anti-VEGF Primärantikörper (in unserem eigenen Labor hergestellt mit rekombinatem bovinem VEGF-164) wurde mit TBS II auf eine Endverdünnung von 1:750 verdünnt, der VEGFR-1 AK wurde mit TBS II 1:50 verdünnt, so dass eine Konzentration von 4µg/ml erreicht wurde. Die Schnitte wurden mit dem Primär-AK über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS V erfolgte die Zugabe des Enzym markierten Zweitantikörper (in TBS V), mit welchem die Schnitte 45min inkubiert wurden. Mittels des Chromogens DAB (3',3' diaminobenzidine hydrochloride, in 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde der immunologische Komplex sichtbar gemacht (Braunfärbung der Antigen-Antikörperkomplexe) und zur Kontraststeigerung mit Mayer's Hämaluan gefärbt. Zur dauerhaften Haltbarmachung wurden die Schnitte abschließend wieder entwässert, in Xylol gespült und mit Eukitt® eingedeckt. Negativ Kontrollen wurden mit normalem Kaninchen Serum anstelle des Primärantikörpers durchgeführt. Alle Schnitte wurden unter dem Axioskop begutachtet und mit einer Digital Kamera, Carl Zeiss Axio Cam MR (Axiovision® software, 3.0.6. SP3, Zeiss, München) aufgenommen.

### 3.18 Datenverarbeitung

Die statistische Auswertung der Rohdaten des EIA und der normalisierten Daten der qRT-PCR erfolgte mit der Sigma-Stat Statistiksoftware Version 3.0 für Windows (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA). Signifikante Unterschiede (P<0,05) zwischen den Gruppen wurden mittels ONE WAY ANOVA mit anschließendem Holm-Sidak-Test berechnet. Alle Datenangaben sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Steroidhormone, Prostaglandin F2 $\alpha$ und Follikelklassifizierung

#### 4.1.1 Experiment 1

Da mit den Proben des Experiment 1 hauptsächlich der Nachweis erbracht werden sollte, dass die mRNA der zu untersuchenden Faktoren überhaupt in Schweinefollikeln exprimiert wird und ob im Verhältnis dazu viel oder wenig mRNA in Stromagewebe und CL vorhanden ist, wurden die gewonnenen Follikel nach ihrem Durchmesser in verschiedene Gruppen (n=5-6) eingeteilt. Durch die Bestimmung von E2 in der FF konnten atretische Follikel ausgeschlossen werden, da die Werte durchweg hoch sind (Tab.8).

**Gruppe 1: 2-3mm**

**Gruppe 2: 4-5mm**

**Gruppe 3: 6-7mm**

**Gruppe 4: >8mm**

**Gruppe 5: Stroma**

**Gruppe 6: CL**

Tab.8 Experiment 1. Progesteron- und Östradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen (ng/ml) in der Follikelflüssigkeit (FF) der einzelnen Follikelklassen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

<b>Follikelklassen</b>	<b>2-3mm</b>	<b>4-5mm</b>	<b>6-7mm</b>	<b>&gt;8mm</b>
<b>P4 (ng/ml FF)</b>	113.5 $\pm$ 16,9	61.9 $\pm$ 4,8	71.6 $\pm$ 9,1	74.4 $\pm$ 6,8
<b>E2 (ng/ml FF)</b>	4.4 $\pm$ 1,2	158.7 $\pm$ 17,1	137.2 $\pm$ 16,1	119.4 $\pm$ 21,7

#### 4.1.2 Experiment 2

Da im Experiment 2 die Regulierung der Hormone und Wachstumsfaktoren während des Follikelendwachstums dargestellt werden sollte, mussten die Follikel einem bestimmten Zeitabschnitt der Follikularphase zugeordnet werden. Es wurden auf Grundlage der E2-, P4- und PGF2 $\alpha$ -Konzentration in der FF und der Follikelgröße für jeweils TI und GC vier Gruppen gebildet (n=5-6).

TI und GC	Gruppe 1: 2-3mm (~Tag 14-16)
TI und GC	Gruppe 2: 4-6mm (~Tag 16-18)
TI und GC	Gruppe 3: >7mm (~ Tag 18-20)
TI und GC	Gruppe 4: post LH-Peak (>8mm) (~ Tag 20-21)

Wie aus der Abb.3 ersichtlich zeigen die E2- und P4-Werte den charakteristischen Verlauf der Steroidhormone innerhalb des Follikelwachstumsphase des Schweinezyklus. Der Gehalt an P4 ist in den kleinen Follikeln noch Verhältnismäßig groß, sinkt dann im Laufe des Wachstums etwas ab und steigt mit zunehmender Reifung der Follikel wieder stark an. Der E2 Gehalt ist in den kleinen Follikeln niedrig und steigt tendenziell in den mittleren Follikeln langsam an, was in etwa Tag 14-16 und Tag 16-18 des Zyklus entspricht. In den >7mm großen Follikeln nimmt die E2 Konzentration signifikant zu (Tag 18-20) und sinkt nach dem LH-Gipfel (Tag 20-21) wieder auf Werte der kleinen Follikel. Da die genaue Zeitspanne in welcher sich die Follikel innerhalb der Follikularphase befanden nicht genau zu bestimmen ist, wurde eine überlappenden Zeitraum zwischen den Gruppen angegeben.

Mittels der PGF2 $\alpha$  Konzentration in der FF lässt sich relativ genau sagen, ob sich ein Follikel in der Phase nach dem LH-Gipfel befindet, da PGF2 $\alpha$  zu diesem Zeitpunkt stark synthetisiert wird. Die post LH Gruppe zeigt diesen charakteristischen Anstieg deutlich an, während die anderen Gruppen niedrige Werte bis maximal 1,7 ng/ml FF aufweisen (Abb.4).

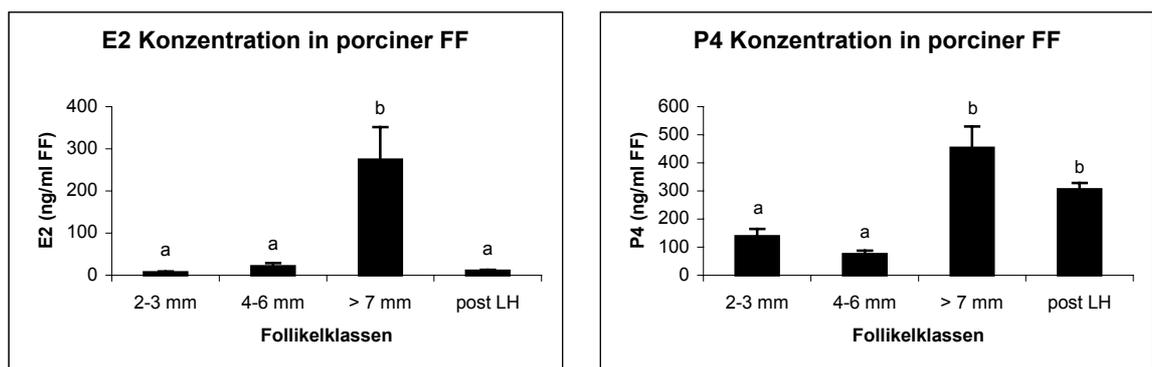


Abb.3 Experiment 2. Östradiol 17- $\beta$  (E2) und Progesteron (P4) Konzentration (ng/ml) in der Follikelflüssigkeit (FF) verschiedener Follikelgruppen während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

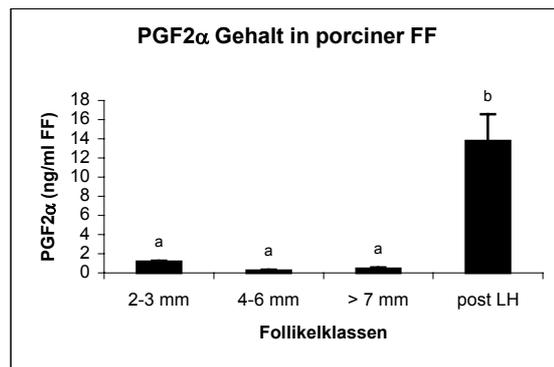


Abb.4 Experiment 2. Prostaglandin F $2\alpha$  Konzentration (ng/ml) in der Follikelflüssigkeit (FF) verschiedener Follikelgruppen während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Bioanalyser

Die Qualität der extrahierten RNA-Proben sowohl für Experiment 1 als auch Experiment 2 waren nach den Ergebnissen des Bioanalyzers von guter Qualität. Der RIN-Wert lag bei durchschnittlich 8,2, die ratio von 28S/18S bei 1,4. Die vom Bioanalyser erstellten Gelbilder zeigten dementsprechend jeweils eine dickere Bande der 28S rRNA und eine dünnere 18S RNA.

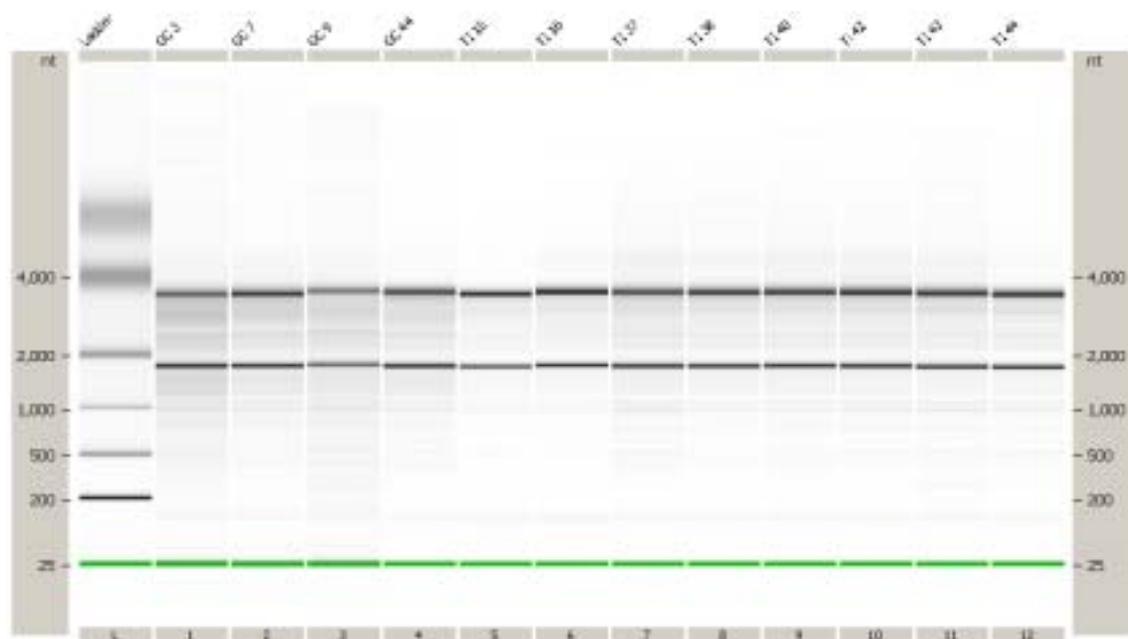


Abb.5 Beispiel eines Gelbildes, erstellt vom Bioanalyser. Ganz oben sind die Probenbezeichnungen aufgeführt. Die obere schwarze Bande stellt die 28S rRNA Bande dar, die untere Bande die 18S rRNA Bande. Ganz links in der ersten Reihe ist der RNA 6000 ladder Standard aufgetragen.

### 4.3 Housekeeping Gene Ubiquitin

Für die Normalisierung der Expressionsdaten aus der qRT-PCR wurde die mRNA Expression des Housekeeping Gens Ubiquitin herangezogen (Abb.6 und Abb.7). Die Crossing Points der einzelnen Proben und Gruppen zeigen zwar geringfügige Schwankungen, sind jedoch nicht signifikant reguliert. Auch zwischen den CP-Werten der Gruppen von Experiment 1 und 2 ist keine signifikante Regulierung zu finden.

#### Experiment 1

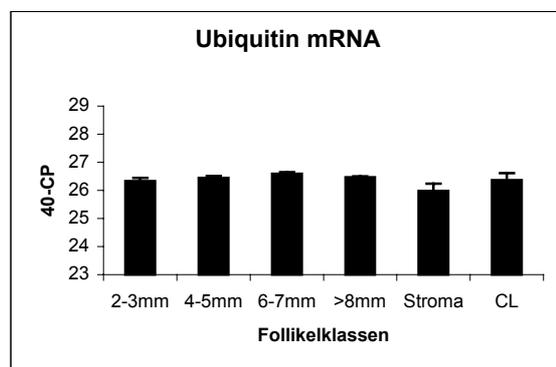


Abb.6 Experiment 1. Ubiquitin mRNA Expression (40-CP) in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

#### Experiment 2

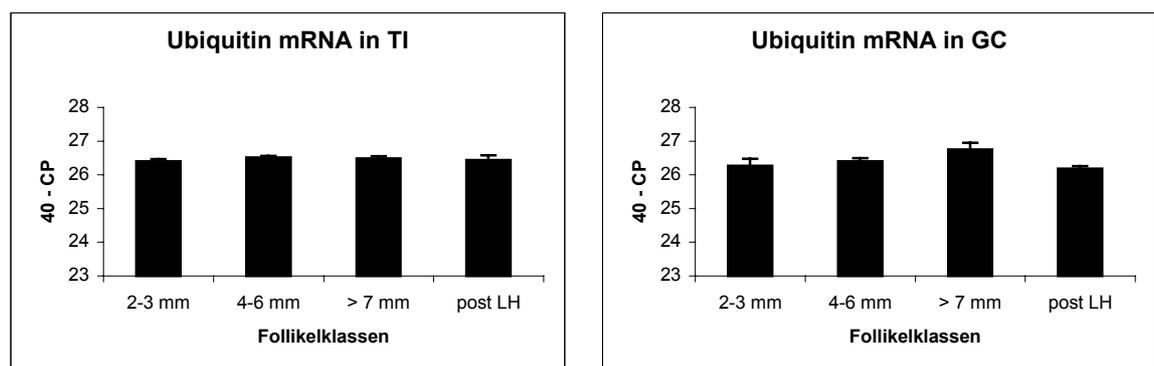


Abb.7 Experiment 2. Ubiquitin mRNA Expression (40-CP) in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

#### 4.4 Gonadotropinrezeptoren und Aromatase

##### mRNA Expression

##### Experiment 2

Sowohl in der TI als auch in den GC wird die P450 Aro mRNA der mittleren und großen Follikel gegenüber der kleinen Follikel signifikant aufreguliert. Nach dem LH-Gipfel fällt die Expression in der TI wieder signifikant ab, in den GC sogar um das 32-fache (Abb. 8).

Wie aus Abb.9 ersichtlich kommt es im Verlauf des Follikelwachstums in der TI in den Gruppen der mittleren und großen Follikel zu einer signifikanten Aufregulierung der LHR mRNA Expression. Nach dem LH-Gipfel fällt die exprimierte mRNA Menge wieder signifikant um das 16-fache ab. In den GC wird die LHR mRNA Expression mit jeder Größenzunahme der Follikel vor dem LH-Gipfel signifikant aufreguliert. Nach dem LH-Gipfel kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Abfall um das 2050-fache.

Die FSHR mRNA Expression in der TI wird in den mittleren und großen Follikeln signifikant abreguliert, um nach dem LH-Gipfel wieder signifikant anzusteigen. In den GC kommt es tendenziell zu einem ähnlichen Verlauf, aber ohne signifikante Unterschiede.

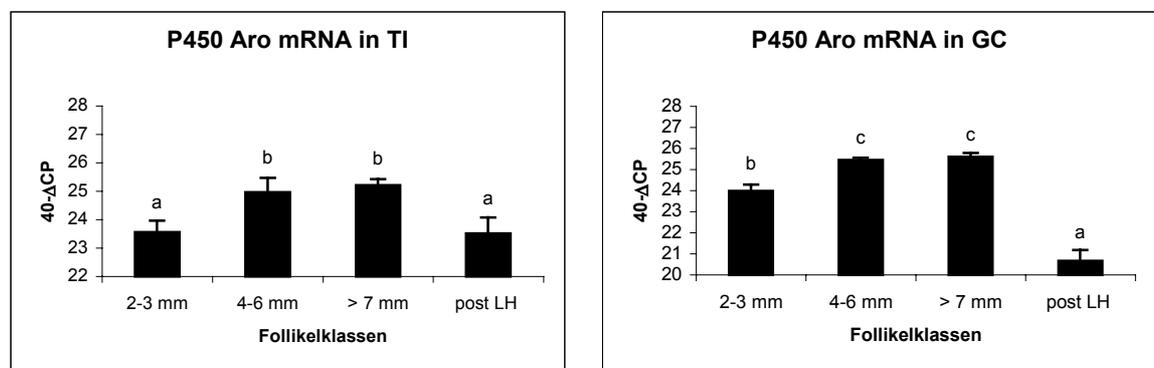


Abb.8 Experiment 2. mRNA-Expression (40-ΔCP) von P450 Aro in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

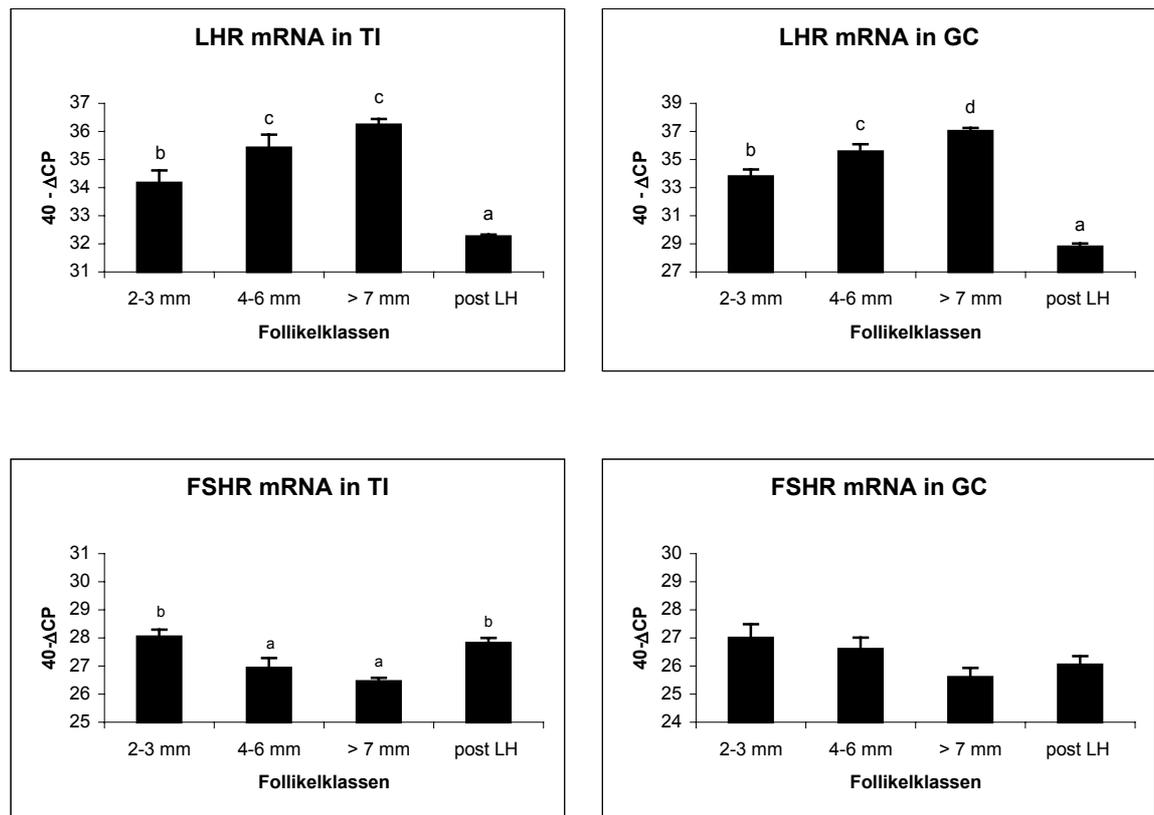


Abb.9 Experiment 2. mRNA-Expression (40-ΔCP) von LHR, und FSHR in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

## 4.5 Expression der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren

### 4.5.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie

#### 4.5.1.1 mRNA Expression

##### Experiment 1

Die FGF-1 mRNA Expression wird, wie aus Abb.10 ersichtlich, in den Follikeln der Größe 6-7mm aufreguliert und sinkt tendenziell in der Gruppe der >8mm großen Follikel wieder leicht ab. FGF-1 mRNA wird stark im Stroma und in der Gruppe der Gelbkörper exprimiert.

Die mRNA Expression von FGF-2 ist in den Follikelgruppen 6-7mm und >8mm gegenüber den kleinen Follikeln, als auch den Gelbkörpern signifikant aufreguliert. Die mRNA Expression im Stroma ist signifikant stärker als in den 4-5mm großen Follikeln.

FGF-7 mRNA Expression in der Follikelgruppe 4-5mm ist gegenüber allen anderen Gruppen bis zu 16-fach geringer.

Die Rezeptoren FGFR-1IIIc und FGFR-2IIIc sind nicht reguliert. FGFR-2IIIb ist innerhalb der Follikelentwicklung nur zwischen 4-5mm und 6-7mm großen Follikeln reguliert, wobei letztere die stärkere mRNA Expression aufweisen. Im Stroma ist die mRNA des FGFR-2IIIb am stärksten exprimiert.

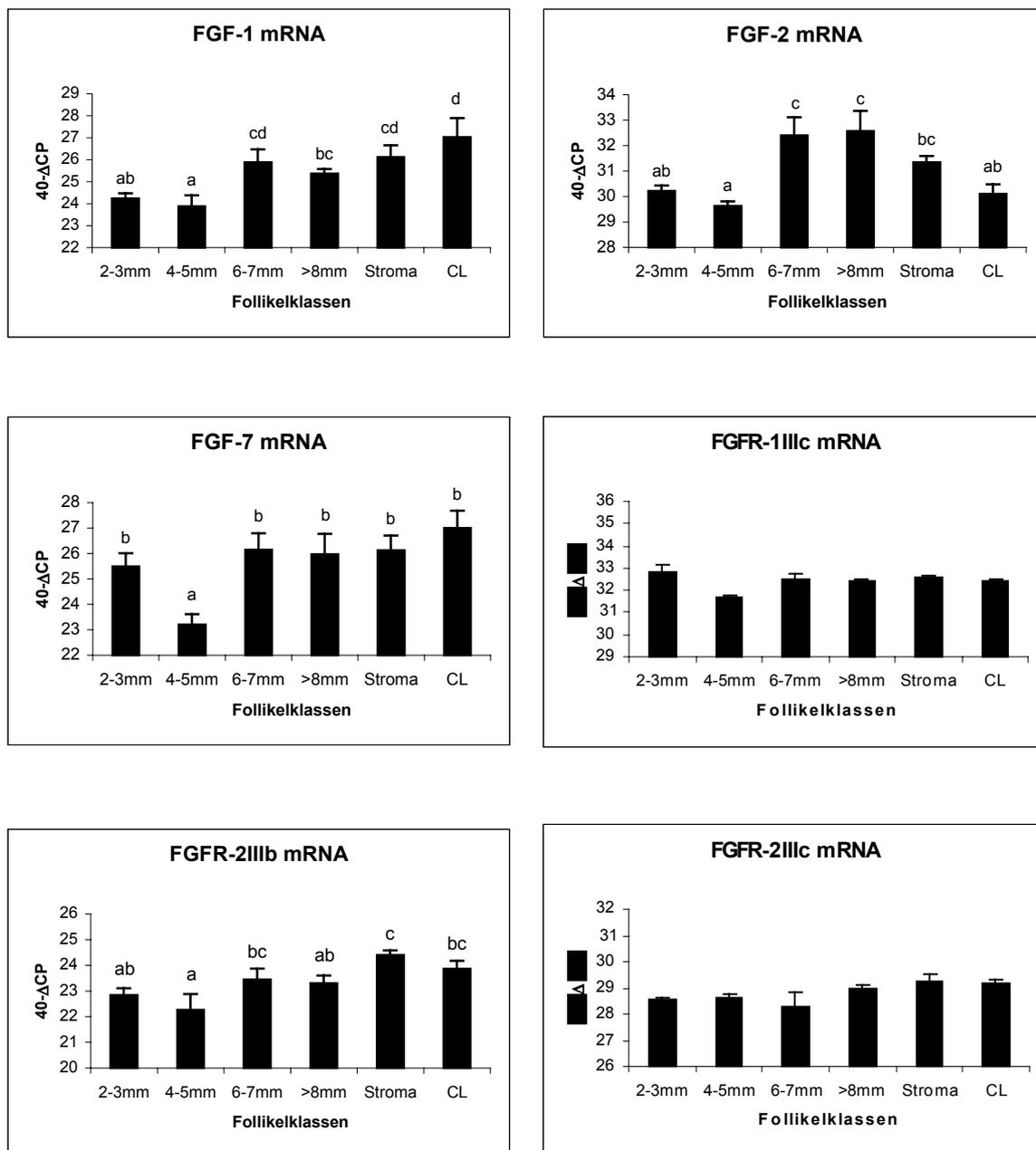


Abb.10 Experiment.1. Expression von FGF-1, FGF-2, FGF-7, FGFR-1IIIc, FGFR-2IIIb und FGFR-2IIIc mRNA (40-ΔCP) in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

## Experiment 2

Wie aus Abb.11 ersichtlich, ist in den unterschiedlichen Follikelkompartimente TI und GC eine signifikante Regulierung der FGF-1 mRNA Expression nur in der TI vorhanden. Erst nach dem LH-Gipfel kommt es hier zu einer Aufregulierung.

FGF-2 ist sowohl in der TI, als auch in den GC reguliert. In der TI ist die Gruppe der 4-6mm großen Follikel gegenüber den anderen Gruppen herunterreguliert. Die FGF-2 mRNA Expression in den GC nimmt während der Follikelentwicklung ab, um nach dem LH-Gipfel signifikant aufreguliert zu werden.

FGF-7 ist im Experiment 2. weder in der TI, noch in den GC reguliert (Abb.12).

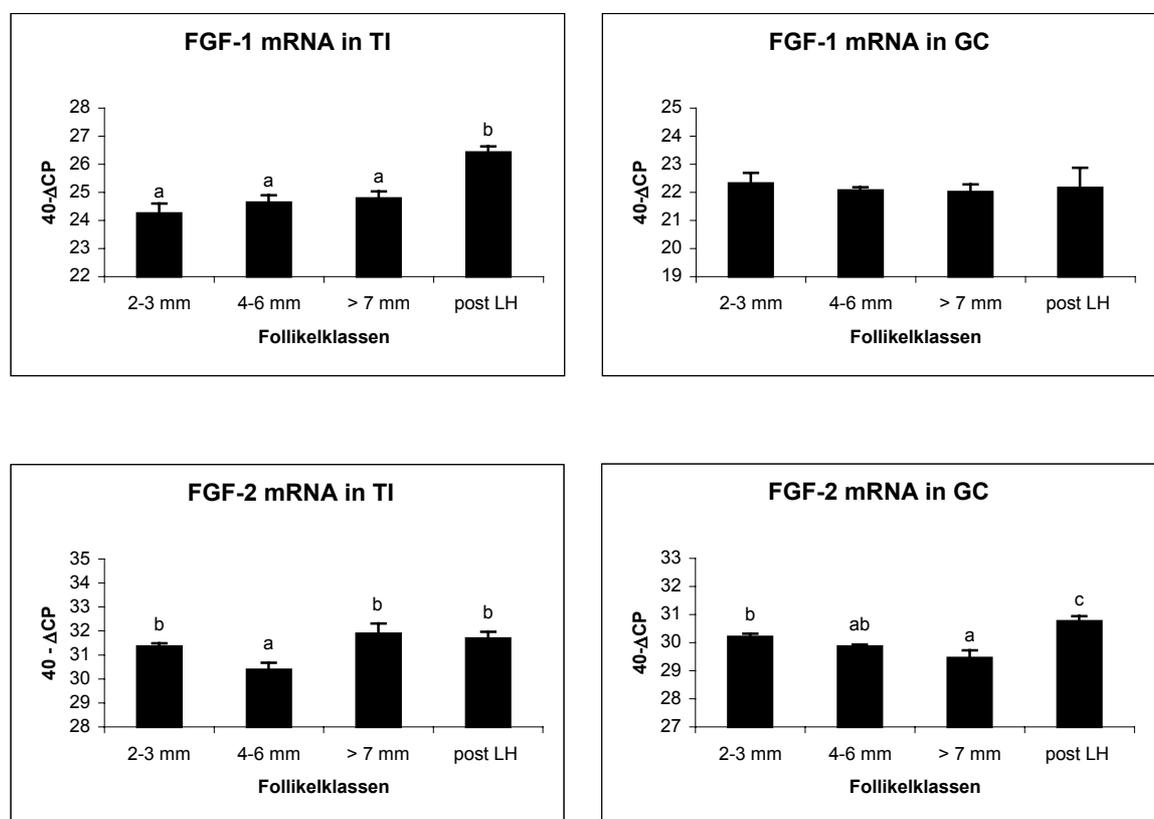


Abb.11 Experiment 2. mRNA-Expression (40-ΔCP) von FGF-1 und FGF-2 in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

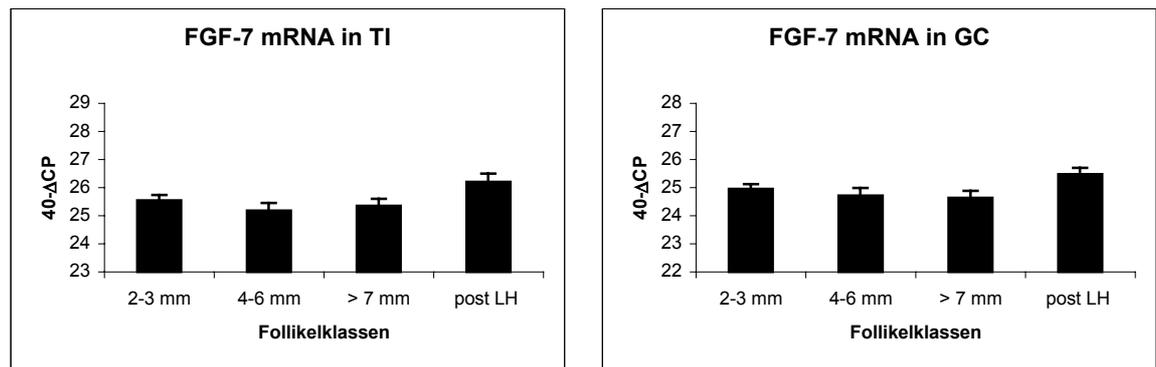


Abb.12 Experiment 2. mRNA-Expression (40- $\Delta$ CP) von FGF-7 in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Regulation der FGF Rezeptoren (Abb.13):

Die mRNA Expression von FGFR-1IIIc nimmt in beiden Kompartimenten im Laufe des Follikelwachstums ab und steigt nach dem LH-Gipfel wieder an. FGFR-2IIIb und FGFR-2IIIc sind in den GC während der Follikelentwicklung nicht signifikant reguliert. In der TI hingegen zeigt FGFR-2IIIb in den großen Follikeln >7mm und nach dem LH-Gipfel eine Aufregulierung.

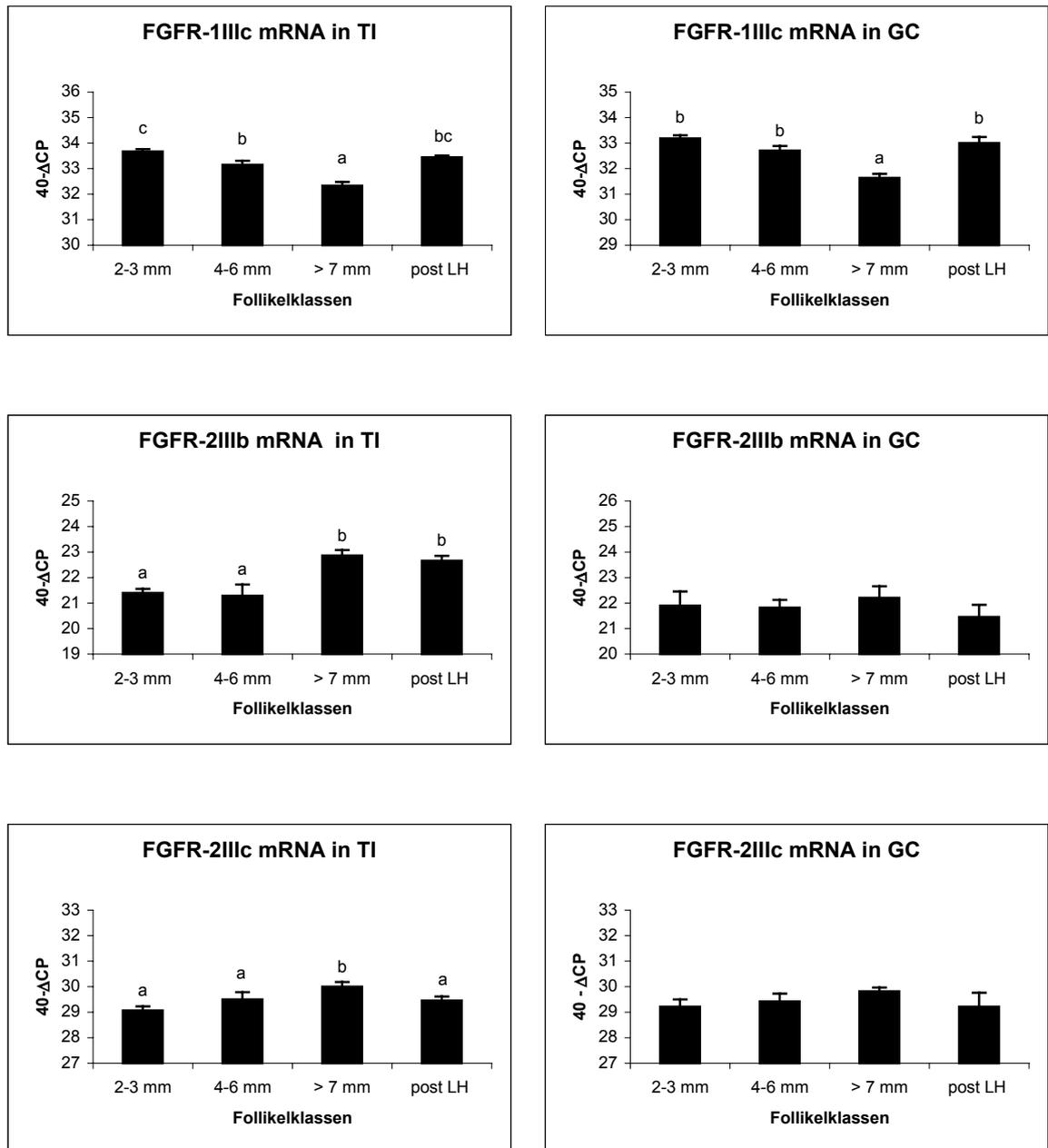


Abb.13. Experiment 2. mRNA-Expression ( $40-\Delta CP$ ) von FGFR-1IIIc, FGFR-2IIIb und FGFR-2IIIc in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.1.2 Immunhistochemie FGF-2

In dem Immunhistochemischen Schnitt (Abb. 14) ist eine deutliche Anfärbung der Kerne von Stromazellen zu erkennen. Keine Anfärbung hingegen der verschiedenen Kompartimenten des antralen Follikels, der Theka externa, TI und GC.

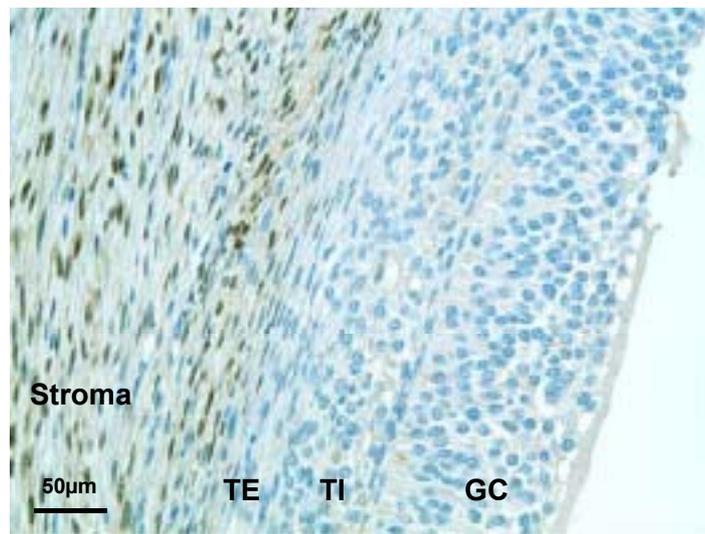


Abb.14 FGF-2 Immunreaktion im Ovar. Deutliche Braunfärbung der Stromazellen, keine Reaktion in der Theka externa (TE), Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) antraler Follikel.

#### 4.5.1.3 Westernblot FGF-2

Immunologisch konnte FGF-2 im Schweine Follikel und Stromagewebe detektiert werden (Abb.15). Man erkennt zwei Banden bei 18kDa und 22kDa in Stromaprobe 1,2 und 3 (S1,S2, S3). Die Follikelproben (F1, F2, F3) ergaben eine wesentlich schwächere Bande bei 18kDa, obwohl hier 25µg Gesamtprotein (GP) und bei den Stromaprobe nur 10µg GP eingesetzt wurden. Rechts sind die drei Standardproben, die jeweils 2ng, 4ng und 6ng FGF-2 Protein enthalten.

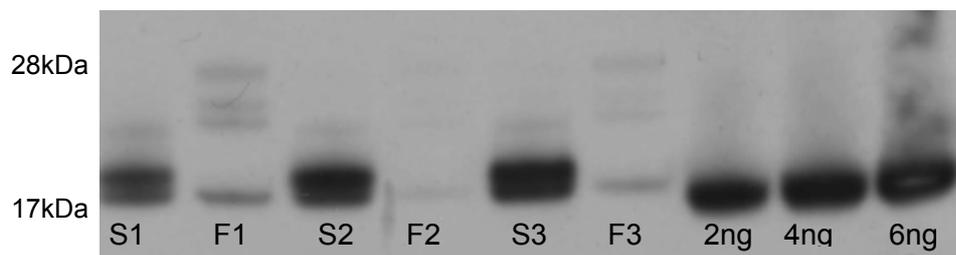


Abb.15 Proteinnachweis mit Westernblot von FGF-2 während der späten Follikularphase im Stroma (S1, S2, S3) und Follikeln (F1, F2, F3) von drei verschiedenen Sauen. Standardproben mit einem FGF-2 Protein Gehalt von 2 ng, 4ng, 6ng.

### 4.5.2 Vasculäre Endothelzellen Wachstumsfaktor Familie

#### 4.5.2.1 mRNA Expression

##### Experiment 1

Wie aus Abb. 16 ersichtlich, sind alle drei VEGF Splicingisoformen am niedrigsten im Stroma exprimiert. Die stärkste Expression von VEGF-120 mRNA ist in der Gruppe der Gelbkörper aus verschiedenen Zyklusstadien zu finden. Innerhalb der Follikelentwicklung wird VEGF-120 ab der Gruppe der 4-5mm großen Follikel signifikant gegenüber den 2-3mm großen Follikeln aufreguliert.

Die Verteilung der mRNA Expression von VEGF-164 im Ovar ist ähnlich der von VEGF-120. Auch hier ist der größte Gehalt an mRNA in der Gruppe der Gelbkörper zu finden. Innerhalb der Follikelentwicklung kommt es zu keiner signifikanten Änderung der mRNA Expression.

Die VEGF-188 mRNA Expression der großen Follikel (6-7mm, >8mm) ist leicht gegenüber der Gruppe der 4-5mm großen Follikel aufreguliert.

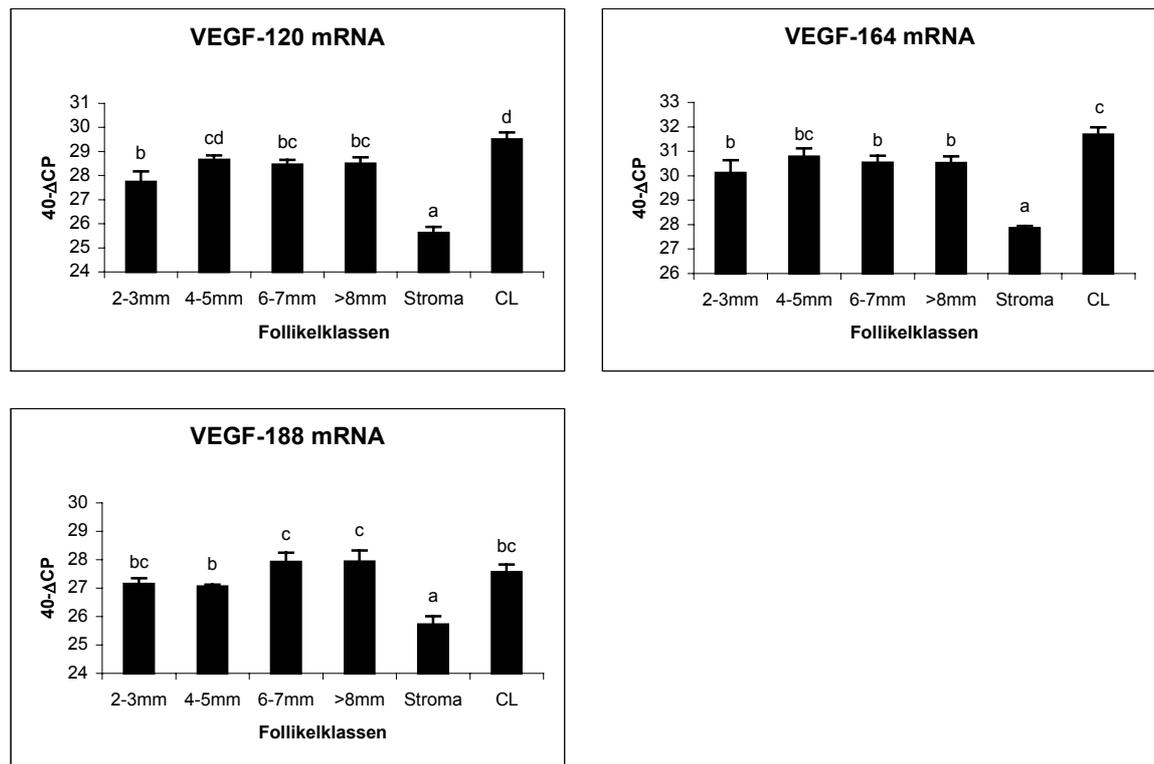


Abb.16 Experiment 1. mRNA-Expression (40- $\Delta$ CP) von VEGF-120, VEGF-164 und VEGF-188 in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### VEGF Rezeptoren Experiment 1 (Abb.17):

Die mRNA-Expression von VEGFR-1 ist tendenziell im Stroma geringer als in den anderen Gruppen und in den großen Follikeln erhöht.

VEGFR-2 zeigt ein ähnliches Schema, bei diesem Rezeptor konnte nur ein signifikant geringerer Gehalt an mRNA im Stroma gegenüber allen anderen Gruppen ermittelt werden.

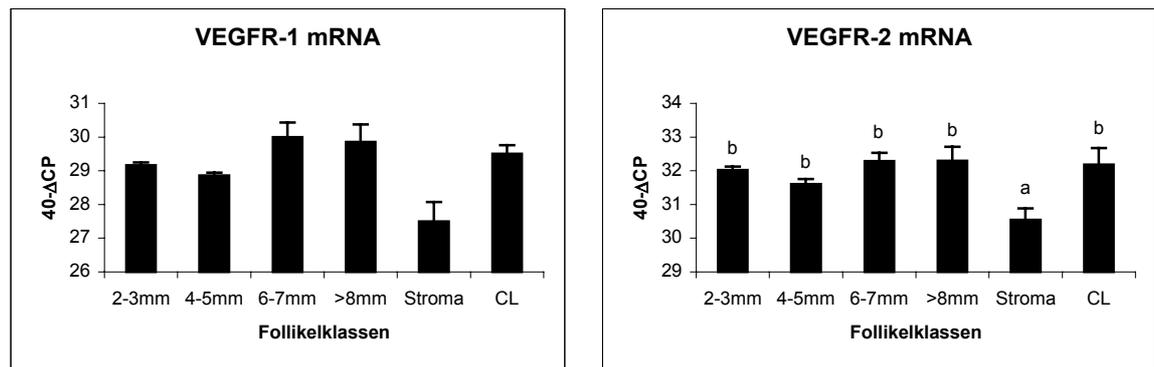


Abb.17 Experiment 1. mRNA-Expression (40-ΔCP) von VEGFR-1 und VEGFR-2 in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

### Experiment 2

Wie aus Abb.18 ersichtlich, wird während der Follikelentwicklung die mRNA Expression von VEGF-120 in den >7mm großen Follikeln im Verhältnis zu den 4-6mm großen Follikeln aufreguliert. Nach dem LH-Gipfel kommt es zu einem Abfall des mRNA-Gehaltes in beiden Follikelkompartimenten, in den GC nimmt die Menge um das 24-fache ab.

Die Regulierung der VEGF-164 mRNA verläuft in den TI und GC ähnlich wie für VEGF-120. Der Abfall der VEGF-164 mRNA Expression verläuft in den GC nach dem LH-Gipfel aber noch drastischer (42-fache Abregulierung gegenüber den >7mm großen Follikeln).

Auch VEGF-188 zeigt die gleiche mRNA-Regulierung in der GC wie die beiden anderen Liganden. In der TI ist VEGF-188 mRNA am stärksten in den kleinen Follikeln exprimiert, wird dann in den mittleren und großen Follikeln abreguliert. Nach dem LH-Gipfel kommt es noch mal zu einem leichten Abfall des VEGF-188 mRNA-Gehaltes.

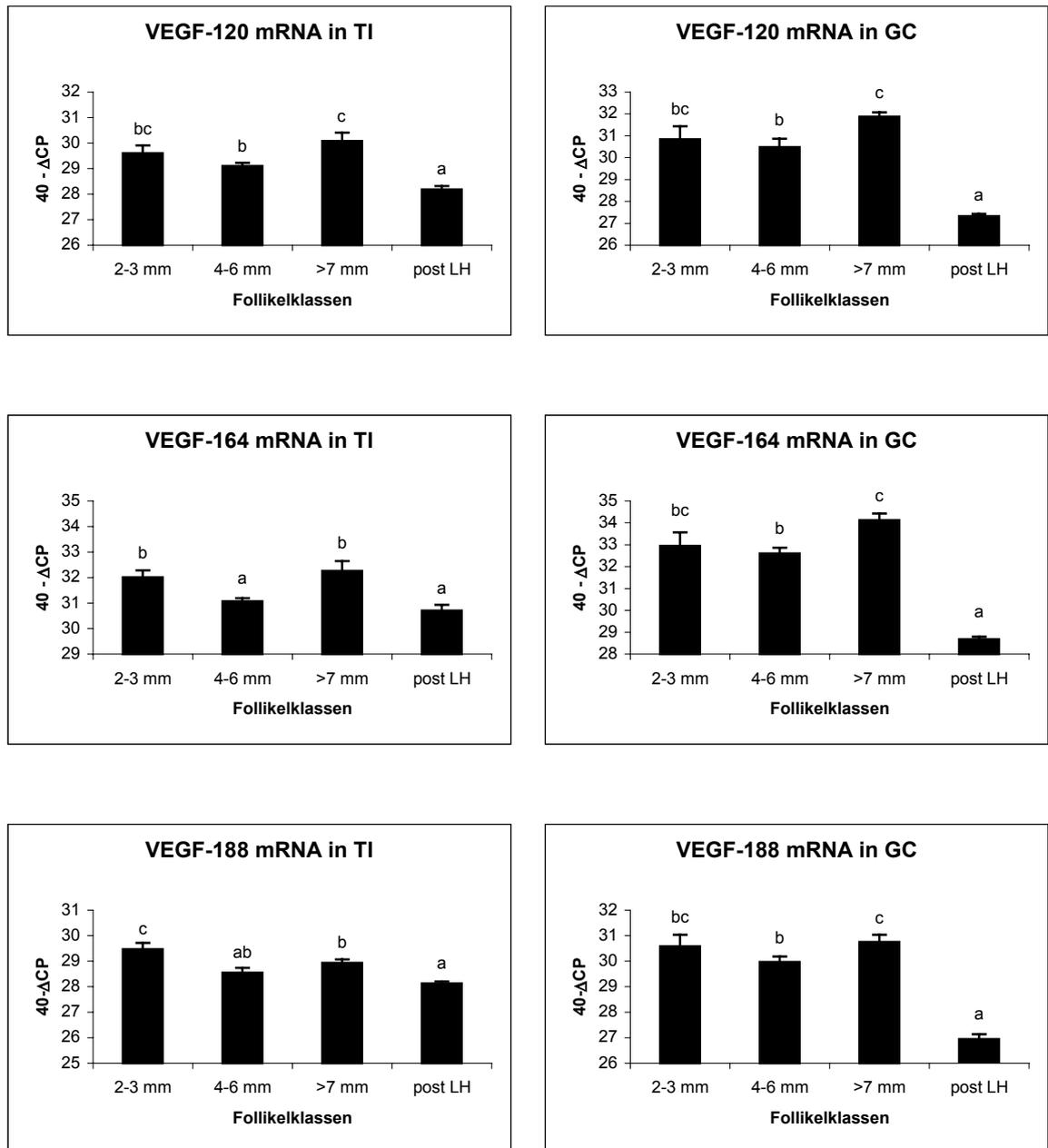


Abb.18 Experiment 2. VEGF-120, VEGF-164 und VEGF-188 mRNA-Expression ( $40-\Delta\text{CP}$ ) in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Regulation der VEGF Rezeptoren (Abb.19):

Die Expression von VEGFR-1 mRNA ist in der TI in keiner der Gruppen reguliert. In den GC kommt es dagegen nach dem LH-Gipfel zu einer Aufregulierung der mRNA Expression um das 8-fache. Innerhalb der TI wird die VEGFR-2 mRNA Expression während des Follikelwachstums nicht reguliert, erst nach dem LH-Gipfel kommt es zu einem Abfall der mRNA-Konzentration. In den GC hingegen wird die mRNA während des Follikelwachstums aufreguliert, um nach dem LH-Gipfel deutlich abzufallen.

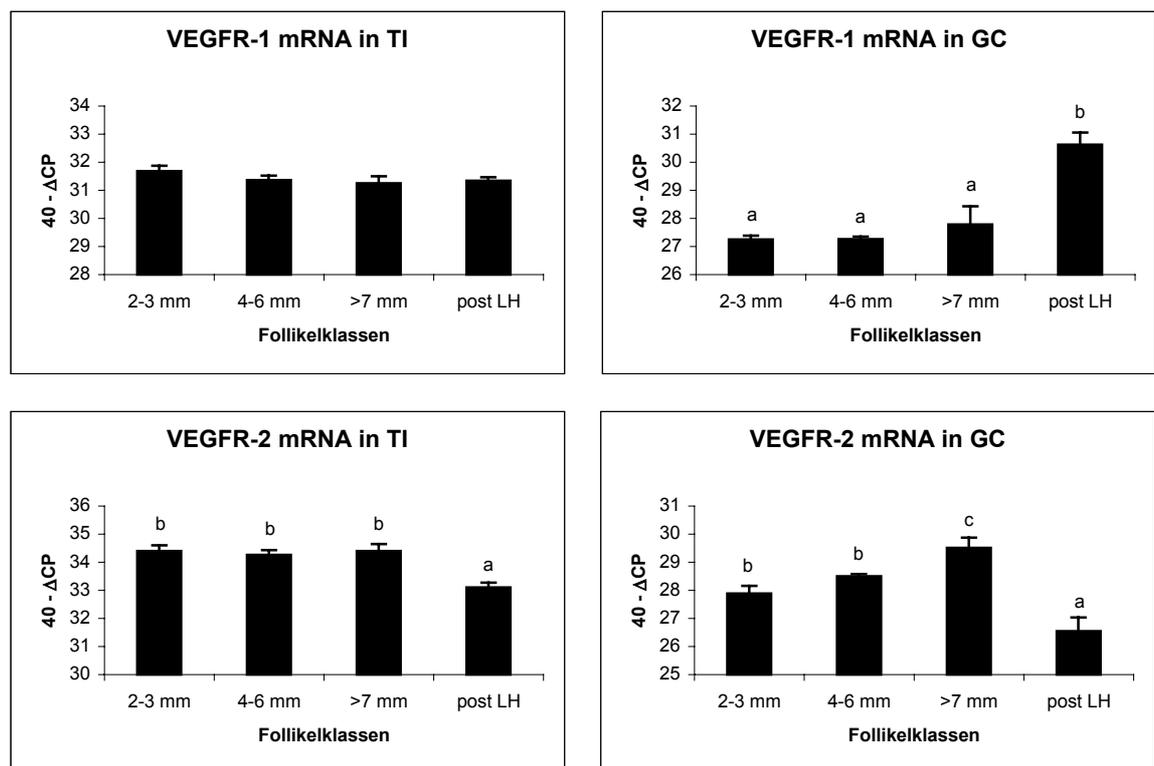


Abb.19 Experiment 2. VEGFR-1 und VEGFR-2 mRNA-Expression ( $40-\Delta\text{CP}$ ) in Theca interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.2.2 Immunhistochemie VEGF

In den Immunhistochemischen Gewebsschnitten des Ovar (Abb.20) ist eine deutliche Anfärbung insbesondere in den Follikeln zu erkennen. So ist das VEGF-Protein im Zytoplasma der Granulosazellen, insbesondere der basalen Granulosazellen, und auch vereinzelt in den Zellkernen vorhanden. In den Thekazellen ist das Zytoplasma ebenfalls angefärbt. Wenig oder gar nicht sind die Stromazellen gefärbt, stark dagegen das Zytoplasma der Lutealzellen. Auch die Eizelle und Follikelepithelzellen von Primärfollikeln und die Granulosazellen und Thekazellen von Sekundärfollikeln zeigen eine positive Reaktion.

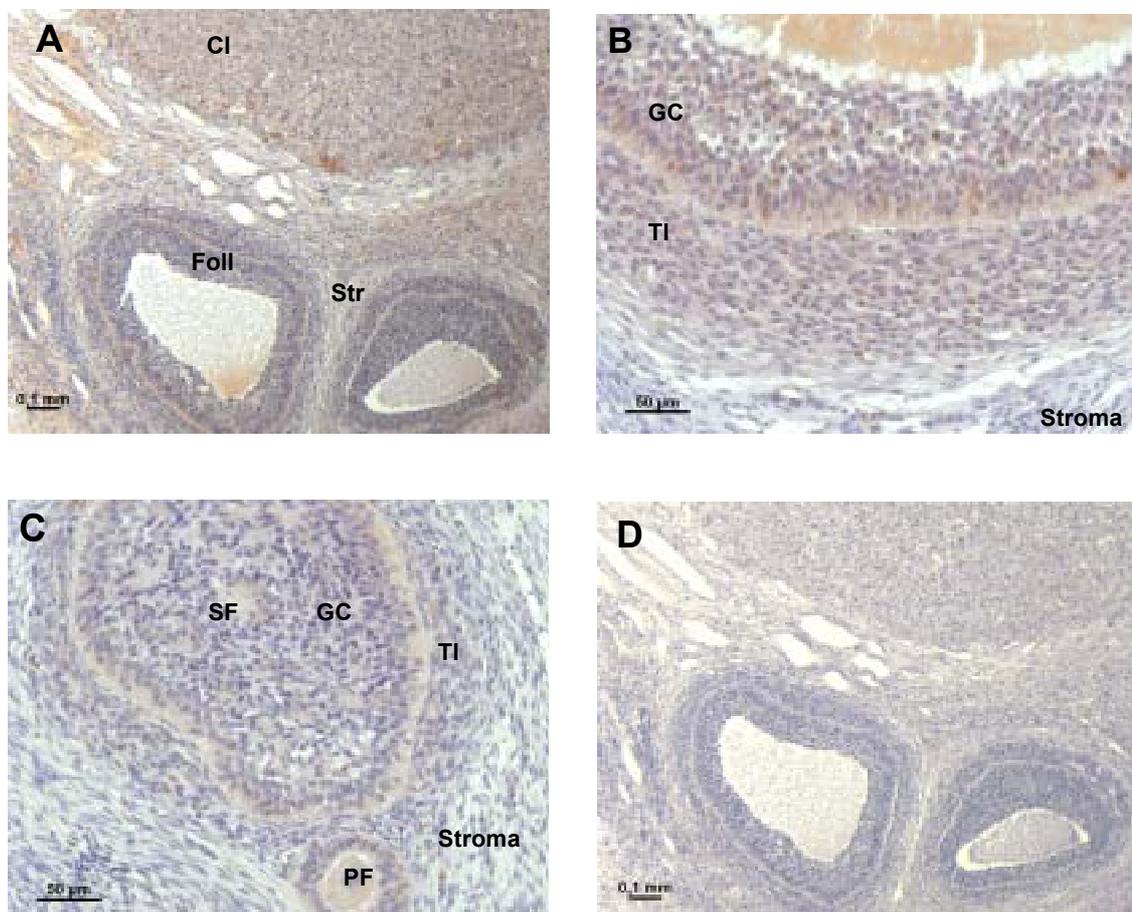


Abb.20 VEGF Immunreaktion im Ovar. **A)** Deutliche Braunfärbung des Gelbkörpers (CL) und der antralen Follikel (Foll). Leichte Hintergrundfärbung im Stroma (Str). **B)** Starke Anfärbung des Zytoplasmas und einzelner Zellkerne der Granulosazellen (GC), deutliche Reaktion auch in der Theka interna (TI), keine Anfärbungen der Stromazellen. **C)** Deutliche Braunfärbung der GC und TI eines Sekundärfollikels (SF) und der Eizelle und Follikelepithelzellen eines Primärfollikels (PF). Keine Anfärbung im Stroma. **D)** Negativ Kontrolle

#### 4.5.2.3 Immunhistochemie VEGFR-1

Eine Immunkomplexbildung und damit Nachweis des VEGFR-1 Proteins ist deutlich im Zytoplasma und auch einigen Kernen der Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße zu erkennen. Auch das Zytoplasma und vereinzelte Zellkerne der Theka interna Zellen sind deutlich braun angefärbt. Wenig oder gar nicht angefärbt sind die Granulosazellen und Stromazellen.

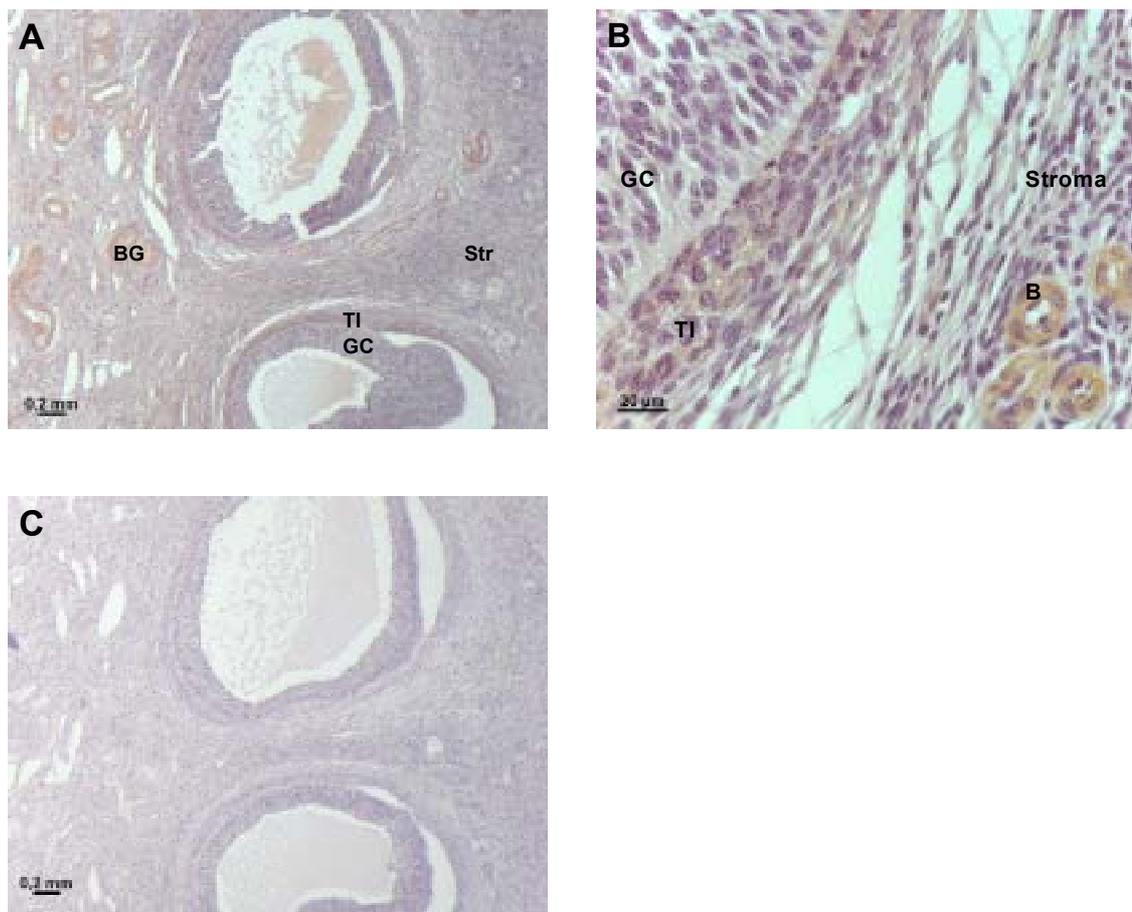


Abb.21 VEGFR-1 Immunreaktion im Ovar. **A)** Deutliche Braunfärbung der Endothelzellen der Blutgefäße (BG) und etwas weniger stark in der Theka interna (TI) der Follikel. Keine Reaktion in den Granulosazellen (GC) und dem Stroma (Str). **B)** Positive Reaktion in den glatten Muskelzellen und einigen Endothelzellen der BG, zudem im Zytoplasma der TI. **C)** Negativ Kontrolle

### 4.5.3 Angiopoietin-Tie-System

#### mRNA Expression

##### Experiment 1

Die Primer für Angp-1, Angp-2 und Tie-2 waren in unserem Institut für die Spezies Schwein bereits auf dem Rotor-Gene optimiert, so dass die Produktspezifität über die Schmelztemperatur und Produktlänge im Agarosegel bestimmt wurde. Für den Rezeptor Tie-1 waren bislang nur bovine cDNA-Sequenzen bekannt. Mit einem Primer für die bovine Sequenz (Accession No.X71423) bekamen wir auch bei Proben aus Schweinegewebe eine klare Bande auf dem Agarosegel. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, zur Sequenzierung eingeschickt und ergab eine um 94,4% homologe Sequenz zum Rind. Die Sequenz wurde unter der Accession No. AJ867846 in der EMBL-Datenbank veröffentlicht.

Wie in Abb.22 ersichtlich ist die Angp-1 mRNA Expression der Gruppe der 4-5mm großen Follikel innerhalb der Follikelgruppen gegenüber den 6-7mm und >8mm großen Follikeln aufreguliert. Im Stroma ist bis zu 33-fach weniger Angp-1 mRNA exprimiert als in Follikeln und CL. Die Expression von Angp-2 mRNA ist in der Gruppe der kleinsten Follikel gegenüber den 4-5mm großen Follikeln und dem Stroma aufreguliert.

Die mRNA Expression der Rezeptoren Tie-1 und Tie-2 ist zwischen keiner der Gruppen signifikant reguliert (Abb.23).

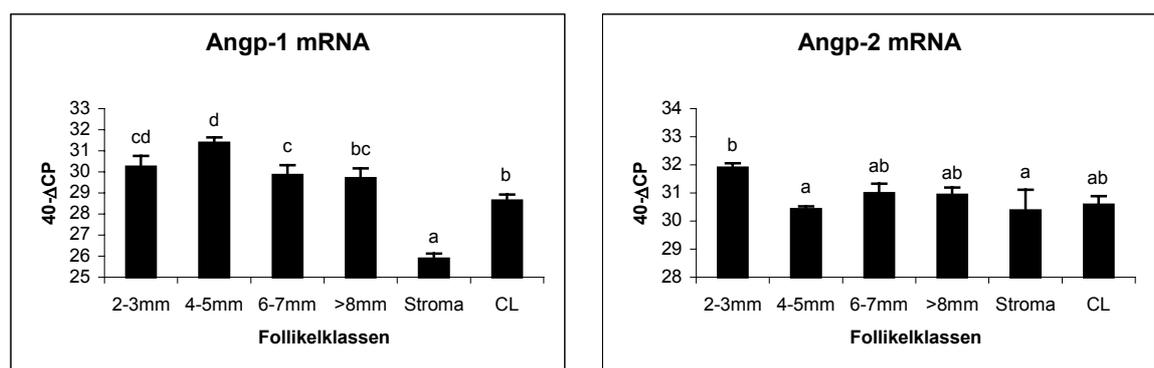


Abb.22 Experiment 1. Angp-1 und Angp-2 mRNA (40-ΔCP) Expression in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

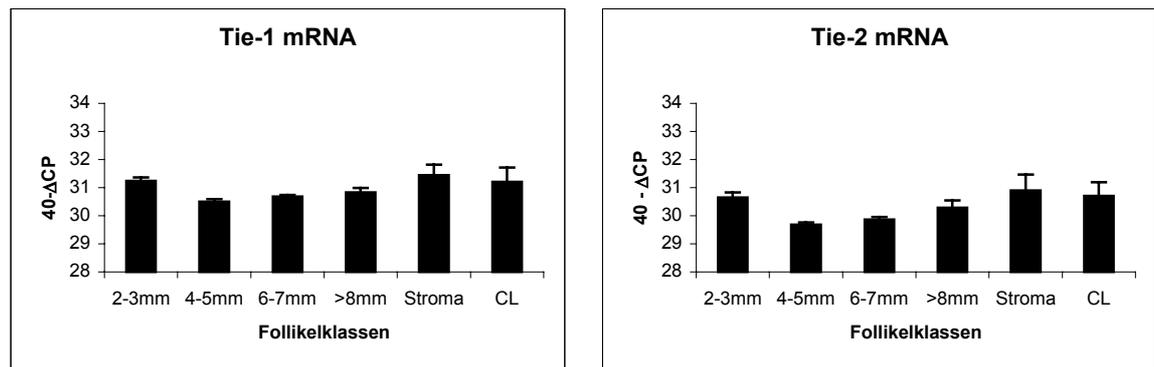


Abb.23 Experiment 1. Tie-1 und Tie-2 mRNA (40-ΔCP) Expression in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

### Experiment 2

Innerhalb der Follikelentwicklung wird die mRNA Expression von Angp-1 in der TI bis zum LH-Gipfel aufreguliert, um nach dem LH-Gipfel wieder abzufallen. In den GC ist die mRNA Expression der mittleren und großen Follikel signifikant stärker als in den kleinen Follikeln. Nach dem LH-Gipfel kommt es auch hier zu einer Abregulierung der Angpt-1 mRNA Expression (Abb.24).

Während der Follikelentwicklung nimmt die mRNA Expression von Angp-2 ab. Vor und nach dem LH-Gipfel ist die mRNA Expression in den großen Follikeln nicht mehr reguliert. In den GC der kleinen und mittleren Follikel ist die mRNA Expression von Angpt-2 etwa gleich stark, wird dann in den großen Follikeln herunterreguliert (Abb.25).

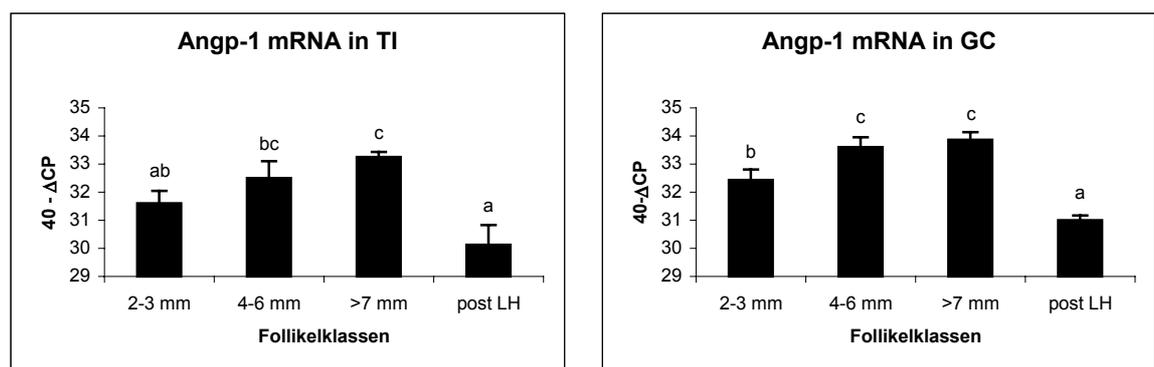


Abb.24 Experiment 2. Angp-1 mRNA Expression (40-ΔCP) in Theca interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

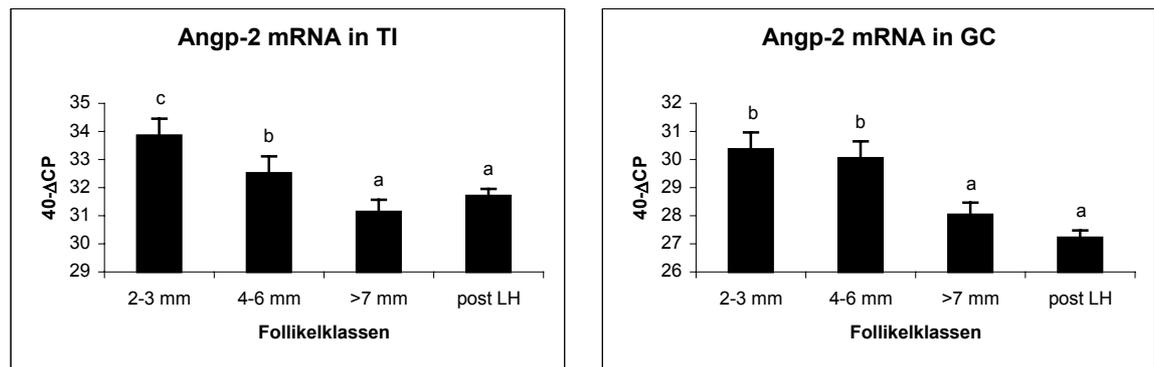


Abb.25 Experiment 2. Angp-2 mRNA Expression (40-ΔCP) in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Aus den 40-ΔCP Werten der Angp-1 und Angp-2 mRNA Expression wurde die Ratio von Angp-2/Angp-1 für jede Gruppe berechnet (Abb.26). In der TI verschiebt sich die Ratio im Laufe des Follikelwachstums. Von einer hohen Ratio in den 2-3mm großen Follikeln, über eine exakt gleichstarke Ratio beider Faktoren in den 4-6mm großen Follikeln hin zu einer niedrigen Ratio in den >7mm großen Follikeln. Nach dem LH-Gipfel verschiebt sich die Expression wieder zu einer hohen Ratio.

In den GC überwiegt in allen Follikelstadien eine niedrige Ratio, die insbesondere in den >7mm großen Follikeln am ausgeprägtesten ist.

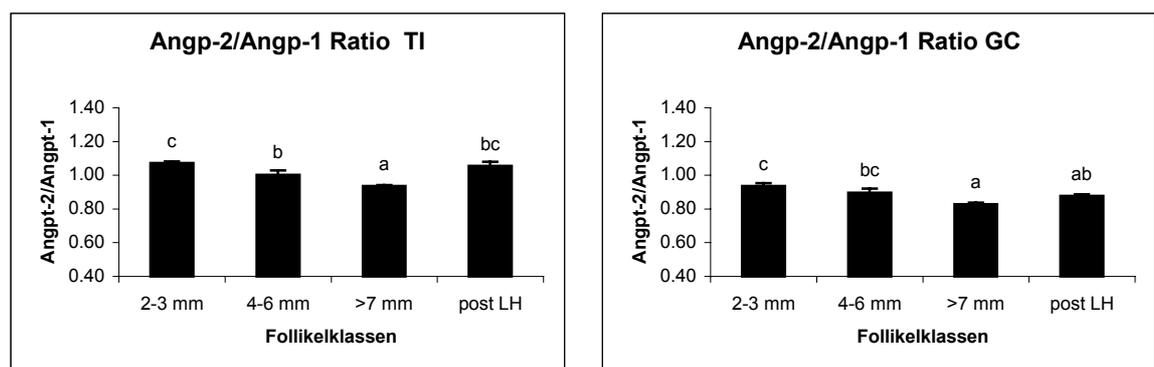


Abb.26 Experiment 2. Angp-2/Angp-1 Ratio in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums.

Die Expression der Tie-1 mRNA wird weder in der TI noch in den GC reguliert. Tie-2 mRNA wird in den GC nach dem LH-Gipfel um das 18-fache aufreguliert. In der TI findet man das gleiche Schema, mit einer leichten Aufregulierung nach dem LH-Gipfel (Abb.27).

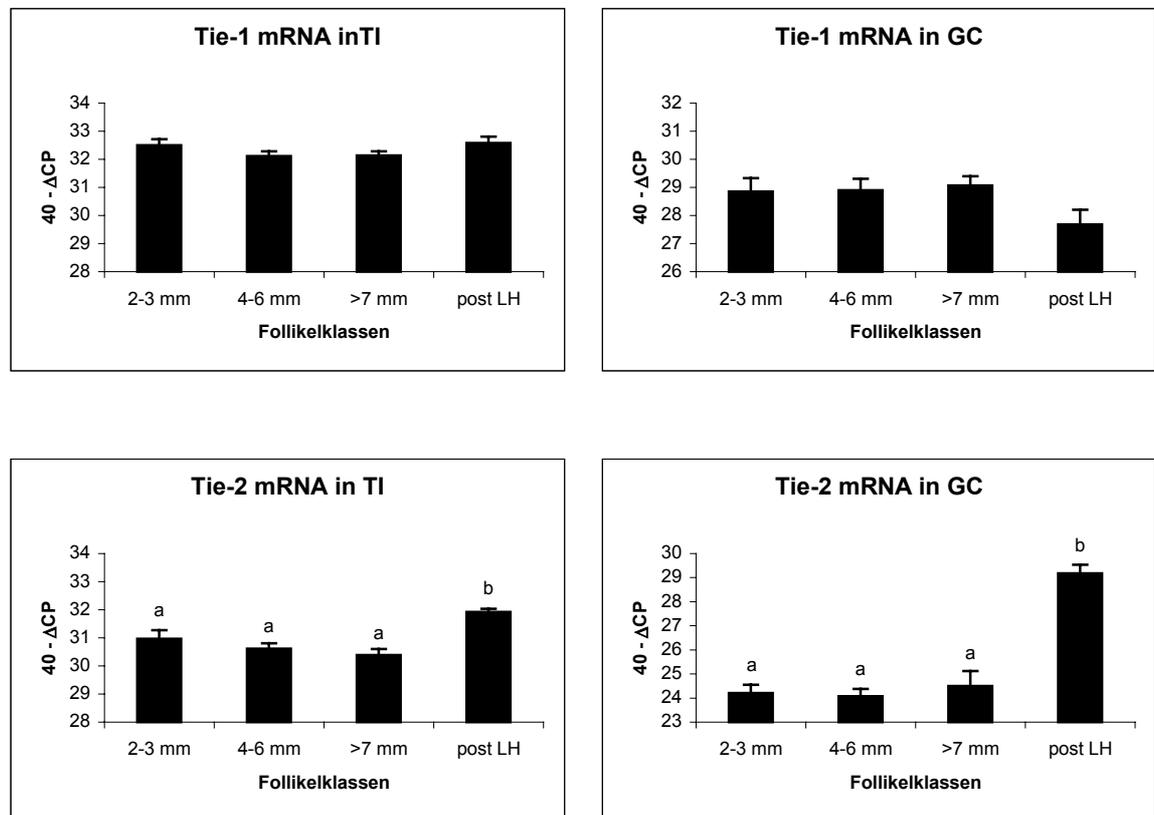


Abb.27 Experiment 2. Expression von Tie-1 und Tie-2 mRNA (40-ΔCP) in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.4 Stickstoffmonoxid-Synthasen

mRNA Expression

##### Experiment 1

Wie in Abb. 28 ersichtlich, wird die mRNA Expression von eNOS in der Gruppe der 6-7mm großen Follikel gegenüber den 4- 5mm großen Follikeln aufreguliert. Im Stroma ist im Verhältnis zu den 6-7mm und >8mm großen Follikeln weniger eNOS mRNA enthalten. Der Expressionsverlauf bei der iNOS mRNA zeigt eine Aufregulierung in den ersten beiden Follikelgruppen gegenüber den großen Follikelstadien, als auch dem Stroma und Gelbkörpern.

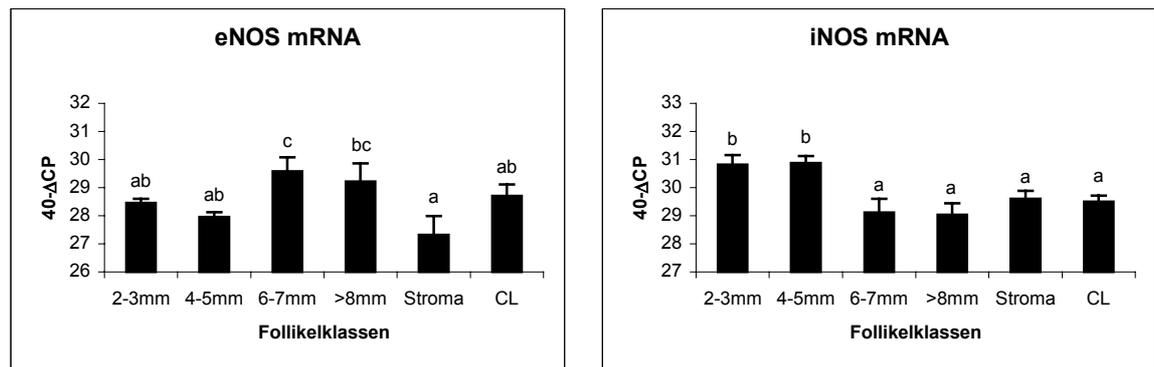


Abb.28 Experiment 1. mRNA Expression (40- $\Delta$ CP) von eNOS und iNOS in den unterschiedlichen Follikelklassen (2-3mm, 4-5mm, 6-7mm, >8mm), im Stroma und in Gelbkörpern (CL) im Ovar des Schweins. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

### Experiment 2

Die mRNA Expression von eNOS ist in der TI während des Follikelwachstums nicht reguliert. In den GC kommt es zu einer Aufregulierung der eNOS mRNA-Expression in den mittleren und großen Follikeln. Nach dem LH-Gipfel wird die mRNA Expression signifikant um das 16-fache abreguliert (Abb.29).

In der TI wird die iNOS mRNA Expression im Laufe der Follikelentwicklung abreguliert. Die gleiche Tendenz ist in den GC noch ausgeprägter zu beobachten (Abb.30).

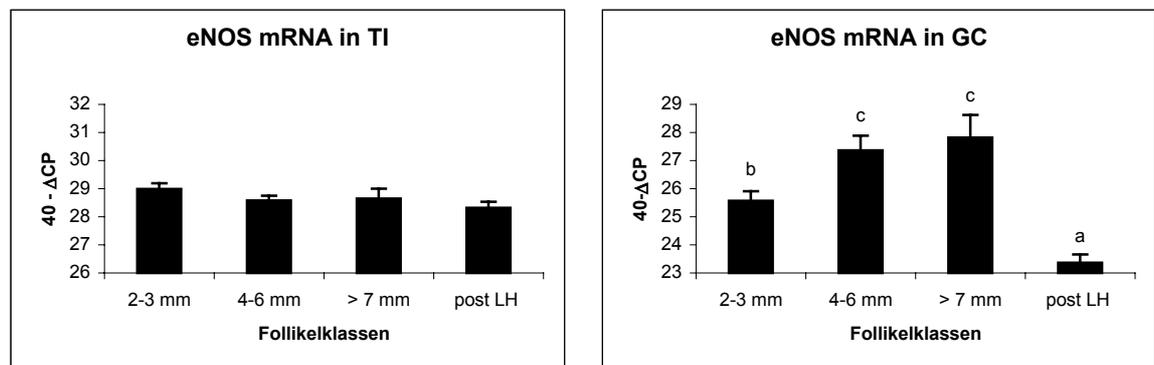


Abb.29 Experiment 2. Expression von eNOS mRNA (40- $\Delta$ CP) in Theca interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

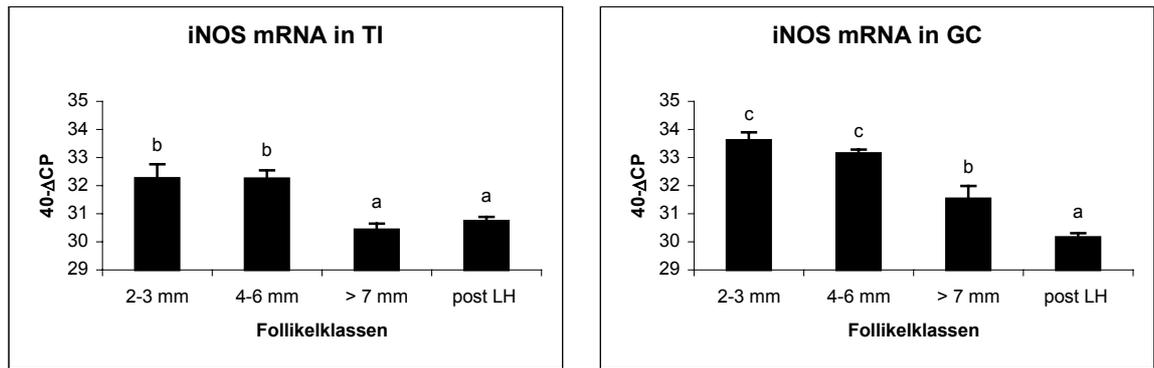


Abb.30 Experiment 2. Expression von iNOS mRNA (40- $\Delta$ CP) in Theka interna (TI) und Granulosazellen (GC) verschiedener Follikelentwicklungsstadien während des Follikelendwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodik

#### Follikel-Klassifizierung

Die Einteilung von am Schlachthof gewonnenen Follikeln verschiedener Sauen in definierte Zyklusabschnitt ist aufgrund der Heterogenität der Follikel sehr schwierig. Follikel gleicher Größe können in sehr unterschiedlichen Reifungsstadien vorliegen, weshalb eine Einteilung nach Größe kaum möglich ist und die Gruppen ein relativ weites Spektrum von Durchmessern umfassen können. Um die Follikelgruppen weiter klassifizieren zu können, wurde zusätzlich die E2, P4 und PGF2 $\alpha$  Konzentration der FF überprüft. Im Experiment 1 dienten die Proben dazu, überhaupt einen Hinweis auf die Exprimierung der ausgewählten Faktoren und eine eventuelle Regulation dieser im Verlauf des Follikelwachstums zu erlangen. Gleichzeitig sollte ein Vergleich zur Menge der Expression zwischen Follikeln, Stroma und CL erbracht werden. Deshalb wurden diese Proben hauptsächlich nach Durchmesser in verschiedenen Gruppen eingeteilt und über den E2 Wert atretische Follikel ausgeschlossen. Im Experiment 2 lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf der Regulation der Faktoren in den getrennten Zell Kompartimenten GC und TI während möglichst genau definierten Zeitabschnitten der Follikularphase. Durch die Bestimmung von E2 und P4 in der FF und Vergleiche mit der Literatur (Ainsworth *et al.* 1980; Babalola and Shapiro 1988; Grant *et al.* 1989) wurden die Follikel in drei Gruppen eingeteilt, was eine andere Größenverteilung als in Experiment 1 bedingte. Ein Teil der Follikel befand sich, nach ihrer E2 und P4 Konzentration zu schließen, in der Zyklusphase nach dem LH-Gipfel, was aufgrund der charakteristischen PGF2 $\alpha$  Werte (Berisha *et al.* 2006a; Hunter and Poyser 1985), die in dieser Gruppe vorhanden waren, bestätigt werden konnte. Diese vierte „post LH“ Gruppe zeigte auch den typischen Abfall von P450Aro und LHR, was auf eine gesicherte Zyklusstadium Bestimmung schließen lässt.

#### Trennung von Theka- und Granulosaschicht

Ein Problem stellte die vollständige Trennung der beiden Follikel-Kompartimente dar. Das verwendete Stereomikroskop war nicht so stark vergrößernd, dass einzelne Zellen genauer betrachtet werden konnten. Da es sich beim Thekagewebe um ein relativ festes Gebilde handelt, war die Möglichkeit einer Kontamination von GC relativ gering, ein mögliches Ablösen von Thekagewebe war nur in größeren Fetzen möglich, die schon bei

der Präparation entfernt werden konnten. Der umgekehrte Fall ist eher möglich, da einzelne GC auch durch mehrmaliges Abkratzen mit dem Löffelspatel wohl nicht zu 100% abgelöst werden. Hier dürfte jedoch das Verhältnis einer sehr kleinen GC-Menge im Vergleich zur großen Thekaschicht nicht zu sehr ausschlaggebend sein. Das Risiko einer Kontamination ist jedoch vor allem bei extremen Expressions-Unterschieden der beiden Kompartimente nicht vollständig auszuschließen.

## 5.2 Gonadotropinrezeptoren und Aromatase

Die Gonadotropine FSH und LH sind essentiell für das Follikelwachstum, Follikelrekrutierung und –ausreifung und die Ovulation. FSHR mRNA wurde ausschließlich in den GC, die mRNA vom LHR auch in der TI von Schweinen (Yuan *et al.* 1996; Liu *et al.* 1998), Rindern (Berisha *et al.* 2000; Ireland and Roche 1983) und Ratten (Camp *et al.* 1991) nachgewiesen. Die beiden Rezeptoren wurden daher auch nur in den Proben des Experiment 2, also den getrennten Follikelkompartimenten untersucht. Im Rind wird die FSHR mRNA in den GC während des Follikelendwachstums nicht reguliert (Berisha *et al.* 2000). Im Schwein hingegen nimmt die Expression der FSHR mRNA vom Beginn der Follikularphase bis zum Östrus ab (Cardenas and Pope 2002). Dies stimmt mit den Ergebnissen des Experiment 2 überein, welche eine Abnahme der FSHR mRNA im Laufe des Follikelendwachstums nachwies. Erst nach dem LH-Gipfel stieg die Expression wieder leicht an. Die Tatsache, dass auch eine Expression in der TI nachgewiesen wurde, ist wahrscheinlich auf Kontamination der TI mit GC zurück zu führen. Die mRNA vom LHR wurde in der TI und den GC vor dem LH-Gipfel aufreguliert und fiel besonders in den GC nach diesem drastisch ab. Eine Zunahme der LHR mRNA in GC war zuvor auch im Schwein (Liu *et al.* 1998) und im Rind (Berisha *et al.* 2000) beobachtet worden. Sauen, bei denen FSH für einen Zeitraum von 36h um den Zeitpunkt der Luteolyse gehemmt wurde, zeigten zum Östrus hin eine reduzierte Anzahl von kleinen, mittleren und großen Follikeln, was aber nicht zu einer verringerten Ovulationsrate führte (Knox 2005). Keine Auswirkungen auf den Zyklus hatte hingegen die Hemmung von FSH in früheren Abschnitten der Lutealphase (Knox *et al.* 1991). FSH scheint also während des Follikelendwachstums beim Schwein nur zu Beginn der Follikularphase, während der Rekrutierung des Follikelpools, eine entscheidende Rolle zu spielen. Im weiteren Verlauf des Follikelwachstums wird die Follikelreifung und eventuell auch die Ovulationsrate LH abhängig. Für die Follikel könnte die Anzahl der exprimierten LHR daher ein entscheidendes Selektionskriterium auf dem Weg zur Ovulation sein. Dies wird

auch dadurch untermauert, dass bereits atretische Follikel keine mRNA für FSHR und nur sehr wenig für LHR exprimieren (Liu *et al.* 1998). Beim Rind hingegen scheint die Abhängigkeit von LH, angesichts der konstant vorhandenen FSHR mRNA, nicht so stark zu sein.

P450 Aro konvertiert Androgene zu E2 und wird im Schwein sowohl in den GC, als auch in der TI exprimiert (Evans *et al.* 1981). Ebenso wie die E2 Konzentration in der FF während der preovulatorischen Follikelwachstumsphase des Schweines ansteigt und nach dem LH-Gipfel abfällt (Ainsworth *et al.* 1990), wird auch die mRNA Expression der P450 Aro reguliert (Guthrie *et al.* 1994). Sie gilt als limitierender Faktor für die E2 Synthese (Corbin *et al.* 2003), ein Kennzeichen für atretischen Follikel ist eine Reduktion der P450 Aro mRNA (Garrett and Guthrie 1997). Die Ergebnisse aus Experiment 2 stimmen mit den Literaturangaben überein, was auch noch einmal das Vorhandensein atretischer Follikel in den Gruppen ausschließt.

### **5.3 Wachstumsfaktoren**

#### **5.3.1 Fibroblasten Wachstumsfaktoren Familie (FGF)**

Den drei Prototypen der großen FGF-Familie FGF-1, FGF-2 und FGF-7 wird eine bedeutende Rolle in der Ovarfunktion zugerechnet (Schams and Berisha 2004; Parrott and Skinner 1998; Berisha *et al.* 2004)

FGF-1 wirkt in vielen Geweben mitogen und angiogen, insbesondere in Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Über die Funktion von FGF-1 im Ovar und in der Follikelentwicklung besteht noch nicht viel Klarheit. Bislang wurde die mRNA von FGF-1 im Ovar von Ratte, Schaf und Rind entdeckt (Berisha *et al.* 2004; Jablonka-Shariff *et al.* 1997; Koos and Seidel 1989). Während des Follikel-Endwachstums beim Rind und auch in der Reifungsphase vom LH-Gipfel bis zur Ovulation konnte keine mRNA Regulierung festgestellt werden (Berisha *et al.* 2004; Berisha *et al.* 2006c). Erst nach der Ovulation, im Stadium der CL-Anbildung, wurde die mRNA Expression aufreguliert, was eine Bedeutung bei der vaskulären Formation des CL impliziert (Berisha *et al.*, 2006c). Das Protein wurde hauptsächlich im Zytoplasma von glatten Muskelzellen und GC, aber auch in den TI-Zellen nachgewiesen (Berisha *et al.* 2004). Im Experiment 1 konnte beim Schwein eine starke mRNA Expression von FGF-1 im Stroma und CL nachgewiesen werden. In den einzelnen Follikel Kompartimenten war FGF-1 während des Follikelwachstums nicht reguliert, nur nach dem LH-Gipfel war in der TI ein Anstieg der

mRNA Expression zu beobachten. Ein großer Einfluss von FGF-1 auf die Follikelentwicklung scheint nicht zu bestehen. Eine Schutzfunktion auf die Blutgefäße in der TI ist zu vermuten, des weiteren deutet die Aufregulierung nach dem LH-Gipfel eher auf eine Funktion bei der Ovulation oder Bildung des Gelbkörpers hin.

FGF-2 war der erste angiogene Faktor der im Ovar identifiziert wurde (Gospodarowicz *et al.* 1985). Er hat im Ovar neben der angiogenen Funktion (Stouffer *et al.* 2001) auch eine anti-apoptotische Aktivität auf GC (Peluso *et al.* 2001). mRNA von FGF-2 wurde im Follikel der Ratte in GC und TI während des Proöstrus und Östrus und in der TI im Follikel des Rindes nachgewiesen (Berisha *et al.* 2000; Guthridge *et al.* 1992). Das FGF-2 Protein wurde im CL des Rindes im Zytoplasma von Endothelzellen (frühe CL Phase) oder von Lutealzellen (späte CL Phase) nachgewiesen (Schams *et al.* 1994). Im bovinen Follikel war das mRNA Signal in den GC nur schwach, während in der TI viel und mit dem Follikelwachstum ansteigend FGF-2 mRNA exprimiert wurde (Berisha *et al.* 2000). Das Protein wurde im Zytoplasma von Endothelzellen und Perizyten in der TI von preovulatorischen bovinen Follikeln nachgewiesen (Berisha *et al.* 2000). Man vermutete, dass FGF-2, VEGF und die ebenfalls in den Blutgefäßen lokalisierten Rezeptoren von VEGF synergistisch wirken, was zur verstärkten Angiogenese im reifen Follikel führt und somit eine wichtige Rolle bei der Selektion des dominanten Follikels spielen könnte (Berisha *et al.* 2000). Im Schweinefollikel wurde bislang nur die mRNA Expression von FGF-2 in GC und von FGFR-1 in TI untersucht. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg von Ligand und Rezeptor in Follikeln ab 4mm Größe festgestellt werden im Vergleich zu Follikeln <4mm, die ebenfalls 30h nach eCG Injektion gewonnen wurden (Shimizu *et al.* 2002). In Experiment 2 war die Regulation eher schwach, in den GC vor dem LH-Gipfel mit zunehmender Größe der Follikel abnehmend, nach dem LH-Gipfel jedoch wieder ansteigend. Die unterschiedliche Regulation im Vergleich zu der Studie von Shimizu *et al.* (2002), lässt sich damit erklären, dass in dieser Studie Follikel eines Zyklusstadiums verglichen wurden, während in Experiment 2 Follikel verschiedener Zyklusstadien verglichen wurden. Im Rind konnte gezeigt werden, dass die FGF-2 mRNA Expression nach dem LH-Gipfel anstieg und dass sich die Lokalisation von den EC und Perizyten der Blutgefäße in den Thekaschichten in die Zellkerne der GC verlagerte (Berisha *et al.* 2006a). Dies weist auf eine Rolle von FGF-2 im Prozess der Luteinisierung von GC um die Ovulation und auf eine Änderung der Funktion im Laufe des Follikelendwachstums hin. In Experiment 1 konnte beim Schwein im Stroma viel FGF-2 mRNA nachgewiesen werden, die Expressionsrate war sogar signifikant höher als in den 4-5mm großen Follikeln. Dies bestätigte sich durch den immunhistologischen Nachweis von FGF-2 Protein, welches hauptsächlich in den Kernen der Stromazellen lokalisiert ist. Mittels

Westernblot wurde nachgewiesen, dass es sich sowohl um die sekretierbare 18kDa FGF-2 Form, als auch um eine 22kDa Form handelte. Bei dieser Methode zeigte sich auch ein im Verhältnis zum Stroma schwaches Signal im Follikelgewebe. Man kann annehmen, dass FGF-2 im Schweineovar von seiner Lokalisation im Stroma aus über seine Rezeptoren in der TI und synergistischen Wirkungen mit VEGF Einfluss auf viele Follikel nehmen kann (Prinzip für polyovulatorische Spezies), während beim Rind die Wirkung auf den dominanten, ovulationsreifen Follikel bezogen scheint (Berisha *et al.* 2000). Damit wird die von Berisha *et al.* (2000) aufgestellte Hypothese für das Rind bestätigt, dass FGF-2 ein wichtiger Faktor für die Angiogenese des dominanten Rinderfollikels ist und damit ein wichtiger Regulator für monoovulatorische Spezies darstellt. In vitro hat FGF-2 beim Schwein keine Auswirkungen auf GC Proliferation und VEGF-Produktion von GC, sowie nur geringe Wirkungen auf die Steroidogenese gezeigt (Grasselli *et al.* 2002), was auf eine geringe intrafollikuläre Funktion schließen lässt. Ob sich die Lokalisation von FGF-2 im Schwein nach dem LH-Gipfel ebenfalls verschiebt und im Zeitraum vor und kurz nach der Ovulation stärker im Follikel agiert wäre ein weiterer interessanter Forschungsansatz.

Die mRNA von FGFR-1IIIc wurde in TI und GC während des Follikelwachstums abreguliert und erst nach dem LH-Gipfel wieder stärker exprimiert wurde, während bei FGFR-2IIIc ein Zunahme der mRNA in der TI großer Follikel vor dem LH-Gipfel zu erkennen war. Dies impliziert die Übertragung unterschiedliche Funktionen während des Follikelwachstums und weist wie beim Rind (Berisha *et al.* 2006a), auf eine Rolle von FGFR-1IIIc während der Ovulation hin.

FGF-7 wird hauptsächlich, aber nicht exklusiv in mesenchymalen Zellen exprimiert und reguliert die Funktion von epithelialen Zellen in vielen Organen, z.B. im Uterus und im Ovar (Rubin *et al.* 1995). Bei Kühen wurde FGF-7 mRNA vorwiegend in den Thekazellen nachgewiesen, während der Rezeptor FGFR-2IIIb hauptsächlich in Granulosazellen exprimiert war (Berisha *et al.* 2004; Parrott and Skinner 1998). FGF-7 agiert hier somit in einer parakrinen Weise, indem es von den Thekazellen exprimiert und sekretiert wird und über seinen Rezeptoren steigernd auf die Proliferation der GC wirken kann (Parrott *et al.* 1994; Berisha *et al.* 2004). In Experiment 2 konnte FGF-7 mRNA auch in GC und FGFR-2IIIb in der TI nachgewiesen werden. Vergleichende Literatur ist bislang nicht vorhanden, allerdings wurde im Endometrium des Schweins ebenfalls FGF-7 mRNA in epithelialen Zellen gefunden (Ka *et al.* 2000). Man muss bedenken, dass die qRT-PCR Methode sehr sensitiv ist und schon wenige vorhandene Moleküle ein Signal ergeben. Die  $40\text{-}\Delta\text{CP}$  Werte für FGF-7 und FGFR-2IIIb lassen auf eher niedrige Expressionsraten schließen. Dadurch könnten auch eventuell entstandene Verunreinigungen zu einer Verzerrung des

Ergebnisse führen. Auch eine Kontamination von TI mit GC und umgekehrt ist nicht auszuschließen. Durch weitere Versuche müsste diese zum Rind unterschiedliche Lokalisation bestätigt und auch die Proteinlokalisierung genauer betrachtet werden. In preantralen Follikeln scheint FGF-7 antiapoptotische, proliferierende und differenzierende Funktionen auf GC zu haben (McGee *et al.* 1999), während es in preovulatorischen Follikeln neben der proliferativen Wirkung eher inhibierend auf die Differenzierung der GC wirkt und eine Suppression der Aromatase-Expression und der Progesteron Produktion hervorruft. Estrogen und LH induzieren die Expression von mRNA, weshalb man annimmt, dass FGF-7 als Mediator der Funktionen dieser beiden Hormone fungiert (Parrott and Skinner 1998). Da im Schwein auch die Aromatase nicht nur in den GC vorkommt, sondern auch in der TI, kann eine verstärkte Expression von FGF-7 und dessen Rezeptor in den TI-Zellen durchaus auf eine stärkere Funktion in diesen Zellen hinweisen. Beim Rind wird FGF-7 mRNA in den beiden Kompartimenten TI und GC während der Endausreifung der Follikel nicht reguliert, während die FGFR-2IIIb mRNA in den GC der großen, preovulatorischen Follikeln aufreguliert war (Berisha *et al.* 2004). Auch in Experiment 2 war der Ligand nicht reguliert und der Rezeptor in der TI von den großen Follikeln vor und nach dem LH-Gipfel aufreguliert. Die signifikante Aufregulierung der mRNA des FGFR-2IIIb lässt auf eine Funktion von FGF-7 bei der Endausreifung des Follikels schließen. Beim Rind hat man zudem festgestellt, dass FGF-7 mRNA in Follikeln nach dem LH-Gipfel aufreguliert wird und somit durch LH stimuliert eine Rolle bei der Ovulation spielen könnte (Berisha *et al.* 2006c). Im Stroma ist die mRNA Expression von FGF-7 gleich stark wie in den Follikeln, die von FGFR-2IIIb signifikant höher als in den 2-6mm und >8mm großen Follikeln, wodurch mehrere Follikel z.B. durch pro-angiogenetische Aktivitäten beeinflusst werden können.

Zusammenfassend konnten gezeigt werden, dass mehrere Mitglieder der FGF-Familie im Ovar des Schweins exprimiert und reguliert sind. Im Vergleich zum Rind ist die mRNA Expression sämtlicher untersuchten FGF-Liganden und auch Rezeptor Splicingisoformen im Stroma sehr hoch. Dies weist auf eine stärkere Rolle der Faktoren in der Beeinflussung des Wachstums mehrerer Follikel hin und ist damit vielleicht ein Baustein des polyovulatorischen Mechanismus.

### **5.3.2 Vaskuläre Endothelzellen Wachstumsfaktoren Familie (VEGF)**

VEGF spielt eine zentrale Rolle in der Regulation physiologischer und pathologischer Angiogenese, u.a. auch im Ovar. Die Inhibierung der VEGF-Aktivität im Ovar beim Affen durch Behandlung mit Anti-VEGF AK oder dem soluble VEGFR-1 Rezeptor (sVEGFR-1)

fürte zu einer verminderten Angiogenese und Abnahme der Theka Zellen Proliferation in Sekundär- und Tertiärfollikeln um 87% (Wulff *et al.* 2001a; Zimmermann *et al.* 2001). Injektion von VEGF Genfragmenten oder VEGF Protein in das Ovar steigert die Größe und Anzahl der Follikel *in vivo* und vermindert die Rate der atretischen Follikel (Shimizu *et al.* 2003b; Quintana *et al.* 2004). VEGF wurde im Ovar verschiedener Spezies wie Mensch, Affe, Ratte, Rind und Schwein nachgewiesen (Kaczmarek *et al.* 2005). Beim Schwein wird nach eCG Applikation die mRNA der splicing Varianten VEGF-120 und VEGF-164 in Follikeln ab einer Follikelgröße von 4-5mm aufreguliert (Barboni *et al.* 2000; Shimizu *et al.* 2002). In der FF dieser Gruppe korreliert der VEGF-Gehalt positiv mit der E2 Konzentration. Hohe Konzentrationen von VEGF und E2 waren von einem gut ausgebildetem Kapillarnetz in TI und TE begleitet, während niedrige Konzentrationen mit einer Reduktion der Blutgefäße in der TI einhergingen (Mattioli *et al.* 2001). Die Akkumulation von VEGF in der FF und die stärkere Expression von mRNA in den GC weisen auf eine auf den produzierenden Follikel beschränkte Funktion hin. Durch langsame Diffusion des Proteins aus der Follikelhöhle könnte ein Gradient in Richtung dieser entstehen und damit ein starker chemotaktischer Reiz für die Bildung von Kapillaren in direkter Nähe zur Basalmembran. Damit würden die viel VEGF produzierenden Follikel ihre eigene Blutversorgung verbessern und gleichzeitig verhindern dass umliegende Follikel davon profitieren (Barboni *et al.* 2000; Mattioli *et al.* 2001). Beim Rind wurde VEGF im Laufe der Follikelendausreifung verstärkt in den GC exprimiert, was ebenfalls als Parameter und Entwicklungsvorteil für den dominanten Follikel angesehen wird (Berisha *et al.* 2000). Die stärkste Expression von mRNA beim Schwein ist in eCG stimulierten Follikeln >5mm vor dem LH-Gipfel zu messen, welche mit dem hohem Gehalt an VEGF von bis zu 25ng/ml in der FF dieser Follikel korreliert. Eine Regulation der Expression ist jedoch nur in den GC zu beobachten, in der TI ist VEGF zudem geringer exprimiert. Nach dem LH-Gipfel fällt die VEGF Expression in den GC stark ab, ebenso die VEGF Konzentration in der FF (Barboni *et al.* 2000). Dies weist auf eine Gonadotropin gesteuerte VEGF Expression hin und zudem auf eine Rolle von VEGF für die Angiogenese und das Wachstum der Follikel. Auch andere Untersuchungen zeigen eine Verbindung bzw. Stimulierung der VEGF Expression durch Gonadotropine (Gomez *et al.* 2004; Schams *et al.* 2001; Shweiki *et al.* 1993). In Experiment 1 konnte neben den VEGF Splicing Varianten VEGF-120 und VEGF-164 auch die Variante mit 188 AS nachgewiesen werden. In Experiment 2 hat sich bei allen Isoformen eine sehr geringe mRNA Regulation während des Follikelwachstums vor dem LH-Gipfel ergeben. Auffällig war die geringe Expression von VEGF im Stroma. Durch die Immunhistologie konnte die hauptsächliche Lokalisation von VEGF in den GC und auch in den Theka Zellen bewiesen

werden. Dies würde ebenfalls auf eine Follikel bezogene Funktion hinweisen. Sowohl in den GC als auch in der TI war in den 4-6mm großen Follikeln eine geringere mRNA Expression als in der Gruppe >7mm zu beobachten, während letztere Gruppe und die 2-3mm großen Follikel keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die recht große Heterogenität von Follikeln der Größe 4-6mm zurückführen. Auch *in vitro* produzierten GC aus 4-5mm großen Follikel wesentlich weniger VEGF als GC aus großen Follikeln, aber nur unwesentlich mehr als >4mm Follikel (Grasselli *et al.* 2002). Ob die Expression von VEGF erst in 4-5mm großen Follikeln ansteigt (Barboni *et al.* 2000) oder schon in 2-3mm großen Follikeln auf einem hohem Expressionsspiegel vorliegt, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Der Unterschied liegt auch in den Versuchsansätzen, da die Follikel in Experiment 1 und 2 mit hoher Sicherheit unter Gonadotropineinfluss standen und zu jedem Abschnitt der Follikularwachstumsphase die größten Follikel ausgewählt wurden. Somit wurden jeweils schon weit entwickelte Follikel untereinander verglichen und nicht wie in der anderen Studie in den Vergleich mit weniger gut entwickelten Follikeln der gleichen Entwicklungsphasen gestellt. In unseren Immunhistoschnitten konnte man sogar schon eine gute Anfärbung in Follikelepithelzellen von Sekundärfollikeln erkennen und auch in Sekundärfollikeln von Affen wurde eine starke Expression von VEGF nachgewiesen (Wulff *et al.* 2001). Zudem stimuliert VEGF die GC Differenzierung und E2 Produktion in kleinen Follikeln, während in mittleren und großen Follikeln >5mm die Proliferation der GC stimuliert wird (Grasselli *et al.* 2002). Somit wäre eher eine Umstellung der Funktion, als ein Änderung der Expression denkbar. Ein Grund für eine zunehmende Expression von VEGF in mittleren und auch großen Follikeln wäre dagegen die beim Follikelwachstum zunehmende Hypoxie der Follikelhöhle (Basini *et al.* 2004). *In vitro* Versuche mit Schweine GC ergaben eine Stimulierung der VEGF Produktion bei zunehmender Hypoxie (Basini *et al.* 2004). Allerdings gibt es neben Hypoxie noch weitere Faktoren, welche die Expression von VEGF regulieren können, z.B. NO (Reynolds *et al.* 2002). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Barboni *et al.* (2000) konnte in Experiment 2 ein starker Abfall der VEGF mRNA Konzentration nach dem LH-Gipfel, besonders in den GC festgestellt werden. Auch beim Rind fiel die mRNA ab, um nach der Ovulation zum CL Aufbau wieder anzusteigen (Berisha *et al.* 2005). Ursache könnte das Erreichen der maximalen Follikelgröße, eines dafür ausreichenden Kapillarnetzes und einer damit einhergehende Verminderung der Angiogeneserate sein. Kurz vor der Ovulation kommt es beim Schaf z.B. zu einer Vasodilatation der bestehenden Blutgefäße, aber keiner Zunahme der Blutgefäßanzahl. Zum Zeitpunkt der Ovulation ist die Anzahl der Gefäße sogar reduziert (Cavender und Murdoch 1988). Es ist nicht bekannt ob die

geringere Menge an VEGF die gleichzeitig eintretende starke Permeabilisierung der Gefäße und Ödematisierung des Gewebes (Plendl 2000) auslösen kann. Durch Injektion von sVEGFR-1 in Follikel nach dem LH-Gipfel konnte aber die Ovulation und Luteinisierung der GC unterdrückt und damit die Bedeutung von VEGF in der preovulatorischen Phase bewiesen werden (Hazzard *et al.* 2002). Ob beim Schwein VEGF auch in geringeren Konzentrationen dafür entscheidend ist oder andere Faktoren eine größere Rolle spielen ist weiterhin unbekannt. Ein Unterschied in der Funktion der unterschiedlichen Isoformen während der gesamten Follikelentwicklung lässt sich aufgrund der gleichen Regulation nicht erkennen.

Neben den VEGF Isoformen konnten in Experiment 1 auch beide Tyrosin Kinase Rezeptoren nachgewiesen werden. Sowohl die mRNA Expression von VEGFR-1, als auch von VEGFR-2 war geringer im Stroma als in den Follikeln und CL. VEGFR-1 war im immunhistochemischen Schnitt am stärksten im Zytoplasma der Perizyten, glatten Muskelzellen und EC der Blutgefäße in der TI lokalisiert, aber auch im Zytoplasma der Theka Zellen. Dies entspricht auch der Lokalisierung von VEGFR-1 im Rind (Berisha *et al.* 2000). VEGF scheint also von den GC aus hauptsächlich auf parakrine Weise zu agieren, um die Vaskularisierung der TI zu stimulieren. Die Funktion von VEGFR-1 während der Follikelentwicklung ist noch weitgehend unbekannt. Nach VEGF-Inhibierung wurde VEGFR-1 im Ovar stark abreguliert (Wulff *et al.* 2001), in einer anderen Untersuchung korrelierte die mRNA Expression von VEGF und VEGFR-1, was zu der Vermutung führte, dass VEGF die Expression seines Rezeptors selber stimuliert (Shimizu *et al.* 2002). In Experiment 2 war die mRNA Expression von VEGFR-1 in der TI nicht reguliert, in den GC wurde sie erst nach dem LH-Gipfel deutlich aufreguliert. Dies entspricht nicht der Regulation der Liganden und lässt nicht auf eine maßgebende Funktion während der Follikelentwicklung vor dem LH-Gipfel schließen. Die Aufregulierung der mRNA Expression nach dem LH-Gipfel weist auf eine Rolle von VEGFR-1 auf den Prozess der Ovulation hin, welche vielleicht weniger in angiogenetischen Vorgängen zu suchen ist, als in Umbauvorgängen des Gewebes allgemein, insbesondere der Stimulierung von Proteasen oder in chemotaktischer Anlockung von Monozyten, welche nach der Ovulation einwandern (Cavender and Murdoch 1988). VEGFR-2 hingegen konnte durch in vivo Untersuchungen mit VEGFR-2 neutralisierenden AK als wichtiger Mediator der VEGF Funktionen bewiesen werden (Zimmermann *et al.* 2003). Am Mäusemodell mit prepubertaler Hypophysektomie konnte gezeigt werden, dass bei der Blockierung von VEGFR-2 trotz exogener Gonadotropingabe die Bildung der Follikelhöhle und damit die Entwicklung Tertiärer Follikel unterbunden wurde. Gleichzeitig war die Mitoserate der EC und damit auch die Angiogenese vermindert. Man vermutet, dass die damit

einhergehende geringere Versorgung mit Gonadotropinen zu der Abnahme der GC Proliferation und E2 und P4 Sekretion führte (Zimmermann *et al.* 2003). Auch eine geringere Permeabilität bereits bestehender Gefäße könnte zu einem vermindertem Austritt von großen Molekülen wie LH führen und damit die Follikelentwicklung hemmen (Zimmermann *et al.* 2001). In Experiment 2 war die Regulation von VEGFR-2 in der TI vor dem LH-Gipfel gering, nur nach dem LH-Gipfel kam es zu einer Abregulierung. In den GC war die Expression in den großen Follikeln aufreguliert, um nach dem LH-Gipfel wieder abzunehmen. Die insgesamt geringe Regulation von den Liganden und auch den Rezeptoren weist auf eine kontinuierliche Funktion von VEGF auf die Entwicklung der Follikel hin. Anscheinend reicht eine gleichbleibende mRNA Expression aus, um den Bedarf an VEGF für die Angiogenese in verschiedenen großen Follikeln zu decken. Die stimulatorische Wirkung von FGF-2 auf die VEGF-Familie und synergistische Wirkung mit VEGF stellt ein weiteres Verstärkungselement dar. Allerdings weiß man natürlich nicht, wie viele biologisch aktiven Proteine letztendlich aus der mRNA entstehen. Insofern ist die Interpretation von mRNA Ergebnissen nur eingeschränkt möglich.

### 5.3.3 Angiopoietin-Tie System

Angp-1, Angp-2 und Tie-2 wurden bislang im Ovar vom Affen (Hazzard *et al.* 2000; Wulff *et al.* 2001b), der Ratte (Maisonpierre *et al.* 1997; Miyabayashi *et al.* 2005), dem Rind (Hayashi *et al.* 2003) und dem Schwein (Shimizu *et al.* 2003a) nachgewiesen. In der Ratte wurde mRNA von Angp-1 hauptsächlich in der TI exprimiert und wanderte nach der Ovulation langsam in Richtung CL Mitte. Angp-2 war dagegen in preovulatorischen Follikeln besonders stark um die Blutgefäße exprimiert, um nach der Ovulation mit den einsprossenden Gefäßen schnell in den entstehenden CL vorzudringen (Maisonpierre *et al.* 1997). Die Funktionen von den Angiopoietinen und VEGF in der Angiogenese scheinen eng miteinander verknüpft zu sein. Die Funktionen von Angp-1 und VEGF bilden eine feine Balance, welche die Angiogenese ermöglicht, ohne das die starken Permeabilisierenden Aktivitäten von VEGF zu pathologischen Erscheinungen wie Ödemen führt (Thurston *et al.* 2000). Somit ist ein stabilisierender und ausreifender Effekt von Angp-1 auf die durch VEGF Stimulus gebildeten Blutgefäße im Follikel denkbar (Maisonpierre *et al.* 1997). Die VEGF mRNA Expression verlief in preovulatorischen Follikeln und im entstehenden CL ähnlich wie Angp-2, was vermuten lässt, dass Angp-2 die stabilisierende Wirkung von Angp-1 auf Blutgefäße aufhebt und zusammen mit VEGF die Vaskularisation des CL durch erhöhte Permeabilität der Gefäße fördert (Maisonpierre *et al.* 1997). In atretischen Follikeln war Angp-2 besonders stark in den GC exprimiert,

während VEGF nicht detektierbar war. In der Abwesenheit von VEGF scheint der destabilisierende Effekt von Angp-2 also zur Blutgefäßregression zu führen (Maisonpierre *et al.* 1997). In bovinen Follikeln wurde Angp-1 im Laufe der Follikelendausreifung stärker exprimiert, während Angp-2 abreguliert wurde und somit die Ratio Angp-2/Angp-1 kleiner wurde (Hayashi *et al.* 2004). Dies stimmt den Ergebnissen aus Experiment 2 überein, in welchen das Angp-2/Angp-1 Ratio in den großen Follikeln vor dem LH-Gipfel am niedrigsten war. Das Ratio Angp-2/Angp-1 in der TI war in den kleinen Follikeln am höchsten, in den mittleren Follikeln genau ausgeglichen. Angesichts der relativ gleichbleibenden VEGF Expression bestätigen diese Ergebnisse die Theorie, dass die Rolle von Angp-2 in der Stimulierung der Aussprossung von neuen Kapillaren in kleinen Follikeln zu suchen ist, während Angp-1 die entstandenen Gefäße stabilisiert und deren Ausreifung durch Anlagerung von Perizyten fördert. Übereinstimmend damit ist die Beobachtung, dass das Blutgefäßnetz der TI im Laufe der preovulatorischen Follikelentwicklung nicht nur dichter wird, sondern die Gefäße auch an Durchmesser zunehmen (Plendl 2000). Nach dem LH-Gipfel konnte im bovinen Follikel und sich anbildenden CL, ebenso wie in der TI der post LH Gruppe des Experiment 2, ein ansteigendes Angp-2/Angp-1 Ratio festgestellt werden (Berisha *et al.* 2006b). Diese Ergebnisse sind mit den Vorgängen der Blutgefäß-Remodellierung und Angiogenese während der Ovulation und CL-Formation stimmig.

Die mRNA Expression von Tie-1 wird nicht reguliert und angesichts nicht bekannter Liganden bleibt die Funktion von Tie-1 während des Follikelwachstums unklar. Tie-2 wird hauptsächlich in der TI exprimiert, aber vor dem LH-Gipfel nicht reguliert, was auf eine funktionsbestimmende Rolle der Liganden hinweist. Nach dem LH-Gipfel wird Tie-2 signifikant aufreguliert, was einhergeht mit einem Anstieg der Angp-2/Angp-1 Ratio. Dies deutet auf eine wichtige Rolle des Angp-Tie Systems bei der Ovulation hin. Die nun wieder überwiegenden Wirkung von Angp-2 bei gleichzeitig vorhandener VEGF Expression würde eine verstärkte Permeabilisierung der Gefäße bedeuten, was zu dem vor der Ovulation eintretenden Ödem (Plendl 2000) führen und die Blutgefäße quasi auf die Invasion in die nach der Ovulation kollabierenden Follikelhöhle vorbereiten könnte. Hayashi *et al.* (2003), konnten eine Stimulierung der E2 Synthese in bovinen GC durch Angp-1 nachweisen. Der ansteigende E2 Gehalt der FF in Experiment 2 stimmt mit dem Expressionsverlauf von Angp-1 überein, zudem ist die mRNA in Experiment 1 überwiegend im Follikel lokalisiert und die Wirkung von Angp-1 somit wahrscheinlich hauptsächlich auf den Follikel bezogen. Ob Angp-1 einen großen Einfluss auf die E2 Produktion hat oder ob die steigende E2 Konzentration eventuell auch einen Stimulus für die Expression von Angp-1 ist, müsste weiter erforscht werden. Die mRNA Expression

von Angp-2, Tie-1 und Tie-2 war im Stroma ebenso stark wie in den Follikeln, was auf eine Rolle für die Blutgefäßversorgung des gesamten Ovars hinweist.

#### 5.3.4 Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen

NO wird eine Rolle bei der Steroidogenese, Follikelentwicklung, Ovulation und der Oozytenausreifung zugewiesen (Tao *et al.* 2004). Diese freien Radikale können viele zelluläre Prozesse durch eine Vielzahl von Mechanismen und mit positiven oder negativen Effekten beeinflussen. Bei einer Beteiligung von NO an den zyklischen Vorgängen im Ovar, erwartet man eine Regulation von eNOS und iNOS. Bislang wurden die mRNA und die Proteine dieser beiden NO-Synthasen im Ovar von der Ratte (Jablonka-Shariff und Olson 1997, Van Voorhist *et al.* 1995), der Maus (Mitchell *et al.* 2004) und dem Schwein (Kim *et al.* 2005) nachgewiesen. Das Protein von eNOS konnte in allen drei Spezies in den GC und in den Thekaschichten lokalisiert werden, bei Schwein und Maus auch in den Endothelzellen der Blutgefäße und beim Schwein zusätzlich in den Stromazellen (Jablonka-Shariff und Olson 1997, Kim *et al.* 2005, Mitchell *et al.* 2004). eNOS mRNA wurde bei der Ratte in den Blutgefäßen und im Stroma (Van Voorhist *et al.* 1995), beim Schwein in kultivierten GC gefunden (Grasselli *et al.* 2001). Die Ergebnisse für iNOS fielen sehr heterogen aus. Während in der Ratte iNOS Protein nur in den Thekaschichten und im Stroma nachgewiesen werden konnte (Jablonka-Shariff und Olson 1997), war die mRNA nur in den GC von unreifen, maximal kleinen antralen Follikeln detektierbar (Van Voorhis *et al.* 1995; Matsumi *et al.* 2000). In der Maus und im Schwein war das Protein von iNOS auch in den GC vorhanden (Mitchell *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005), die mRNA konnte aber nur in den GC der Maus (Mitchell *et al.* 2004) nachgewiesen werden. Diese Unterschiede können durch unterschiedliche Methoden, Materialgewinnung und Entwicklungsstadien der Follikel und Ovarien bedingt sein. Beim Schwein konnte Kim *et al.* (2005) eine vom Follikelwachstumsstadium abhängige Lokalisation und Regulation der NO-Synthase Proteine feststellen. So war das Signal von eNOS in antralen Follikeln wesentlich stärker als in primären oder sekundären Follikeln. iNOS war nur in antralen Follikeln in der TI lokalisiert, zudem war wesentlich mehr iNOS in den GC detektierbar. Dies weist auf eine Rolle der NO-Synthasen im Prozess des Follikelwachstums hin. In der Ratte zeigte sich zudem *in vivo* eine Aufregulierung der Proteine beider NO-Synthasen durch humanes Chorion Gonadotropin (hCG) (Jablonka-Shariff and Olson 1997). eNOS mRNA wurde ebenfalls *in vivo* bei der Ratte und *in vitro* in porcinen GC durch Zugabe von Gonadotropinen verstärkt exprimiert (Van Voorhist *et al.* 1995, Takesue *et al.* 2001). Allerdings konnte Takesue *et al.* (2001) erst 30h nach

Aufregulierung der mRNA einen Anstieg der NO und auch cGMP Konzentration messen, was eine strikt regulierte Translation und Aktivierung der NO-Synthasen impliziert. iNOS mRNA wurde im Gegensatz zu den Proteinen nach hCG Einfluss abreguliert, was einen stimulierenden Einfluss von Gonadotropinen auf die Translation bedeuten könnte (Jablonka-Shariff und Olson 1997, Van Voorhist *et al.* 1995). In Experiment 1 konnte mRNA Expression von eNOS und iNOS im Schweinefollikel, Stroma und Gelbkörper festgestellt werden. Während eNOS in Experiment 2 in der TI nicht reguliert war, konnte ein signifikanter Anstieg der Expression in den GC von mittleren und großen Follikeln beobachtet werden, worauf ein starker Abfall nach dem LH-Gipfel folgte. Die Regulation von iNOS verlief dagegen konträr mit hohen Expressionsraten in kleinen und mittleren Follikeln und einem Abfall in großen Follikeln vor und nach dem LH-Gipfel. Der Abregulierung der Expression beider Faktoren nach dem LH-Gipfel ist angesichts der Bedeutung von NO-Synthasen für die PGF2 $\alpha$  und PGE2 Synthese und Ovulation (Faletti *et al.* 1999; Shukovski and Tsafiri 1994) überraschend, gibt aber keine Auskunft über die Konzentration der Proteinform und die Aktivität der Enzyme, welche zu diesem Zeitpunkt durchaus hoch sein könnten. Die unterschiedliche mRNA Expression der beiden NO-Synthasen weist auf verschiedene Funktionen im Laufe der Follikelendausreifung hin, welche in der lokalen Regulation der ovariellen hormonellen Funktion, der GC Differenzierung (Masuda *et al.* 2001) und Vasodilatation der Gefäße in den Thekaschichten und dem Stroma liegen könnten.

### 5.3.5 Zusammenwirkung der einzelnen Faktoren, Ausblick

Alle Ergebnisse zusammengefasst lassen folgende Arbeitshypothese für das Follikelendwachstum und -selektion beim Schwein zu: FSH bewirkt während eines begrenzten Zeitraumes um die Luteolyse herum die Rekrutierung eines Follikelpools von etwa 50 Follikeln, die in den Wettbewerb um die Ovulation eintreten können. Wahrscheinlich wirkt FSH dabei antiapoptotisch auf kleine und mittlere Follikel die bereits genügend FSHR ausgebildet haben und fördert durch die Stimulierung der Aromatase die Bildung von E2, welches ein wesentliches Kriterium für ein weiteres Wachstum der Follikel ist. Haben die Follikel diese „Hürde“ übersprungen, wechselt ihre FSH-Abhängigkeit zu einer LH-Abhängigkeit. Unter dem anfänglichem Einfluss von FSH und der weiterhin ansteigenden E2 Konzentration im Plasma und der FF kommt es zur verstärkten Ausbildung von LHR, während die Anzahl der FSHR zurück geht. Durch LH wird die Expression von iNOS stimuliert, welches über seine NO-Produktion Einfluss auf die Differenzierung der GC nimmt. E2 im Plasma und in der FF und auch LH bewirken

z.B. über den Mediator FGF-7 die Proliferation von GC. Dadurch kommt es zur Volumenzunahme des Follikels und zur Hypoxie in der Follikelhöhle. Durch die Stresssituation Hypoxie werden vermehrt angiogenetische Faktoren wie VEGF, Angp-2, FGF und ihre Rezeptoren stimuliert. VEGF selber wird auch durch Einfluss von LH und FGF-7 verstärkt exprimiert. Durch die Einwirkung von LH und VEGF wird in den großen Follikeln eNOS aufreguliert, welches zusammen mit FGF-2 die E2 Synthese kontrolliert. Das von eNOS gebildete NO fördert die angiogenetischen Eigenschaften von VEGF und wirkt zudem vasodilatatorisch, was eine erhöhte Blutzufuhr für die Follikel bedeutet. Die wachsenden Follikel können so durch Angiogenese und antiapoptotische Wirkung der Faktoren ein besseres Blutgefäßnetz ausbilden und ihren Sauerstoff-, Nährstoff- und Hormonbedarf decken. VEGF agiert im Zusammenspiel mit Angp-2 dabei mehr im Follikel selber und verschafft somit denjenigen Follikeln einen Entwicklungsvorteil, die mehr VEGF und seine Rezeptoren exprimieren. Dies wird insbesondere in der monoovulatorischen Spezies Rind als ein wichtiger Aspekt für die Entwicklung nur eines dominanten, ovulationsreifen Follikels angenommen. Die FGF-Familie und insbesondere FGF-2 wirken dagegen vom Stroma aus auf ihre Rezeptoren in mehreren Follikel und sind damit wahrscheinlich ein wichtiger Faktor der Follikelausreifung in der polyovulatorischen Spezies. Insbesondere zwischen dem in den Stromazellen exprimierten FGF-2, dem im Follikel lokalisierten VEGF und den in den Blutgefäßen der TI lokalisierten VEGF-Rezeptoren könnte es zu synergistischen Interaktionen kommen, welche zu einer verstärkten Angiogenese in der TI führen. Während VEGF und Angp-2 am Anfang des Follikelwachstums die Aussprossung neuer Blutgefäße bewirken, wird durch steigende E2 Produktion der reifenden Follikel vermehrt Angp-1 gebildet. Es kommt zum Umkehr der Angp-2/Angp-1 Ratio und damit zur Stabilisierung der bereits vorhandenen Gefäße, welche nun ausreichend für die Funktion des Follikels sind. Durch die kontinuierlich sehr hohe E2 Konzentration im Plasma kommt es zur Sekretion des LH-Gipfel, welcher einen rapiden Abfall der Anzahl der LHR und der Aromatase im Follikel und damit der E2 Konzentration in der FF bewirkt. Es kommt zum Anstieg des Angp-2/Angp-1 Verhältnisses und des Tie-2 Rezeptors, was zu einer Destabilisierung der Blutgefäße und zur Ödembildung kurz vor der Ovulation führt.

Neben den Gonadotropinen und Steroidhormonen spielen also auch viele lokale Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Follikelendausreifung. Um deren Zusammenspiel und Aktivität während des Follikelwachstums noch besser verstehen zu können, sollten bei zukünftigen Forschungsarbeiten neben der mRNA die Translationsprodukte genauer betrachtet werden. Vertiefend zu den vorliegenden Studien wäre es interessant den

möglichen Wirkungsweisen von FGF-2 im Stroma auf das Follikelwachstum nachzugehen.

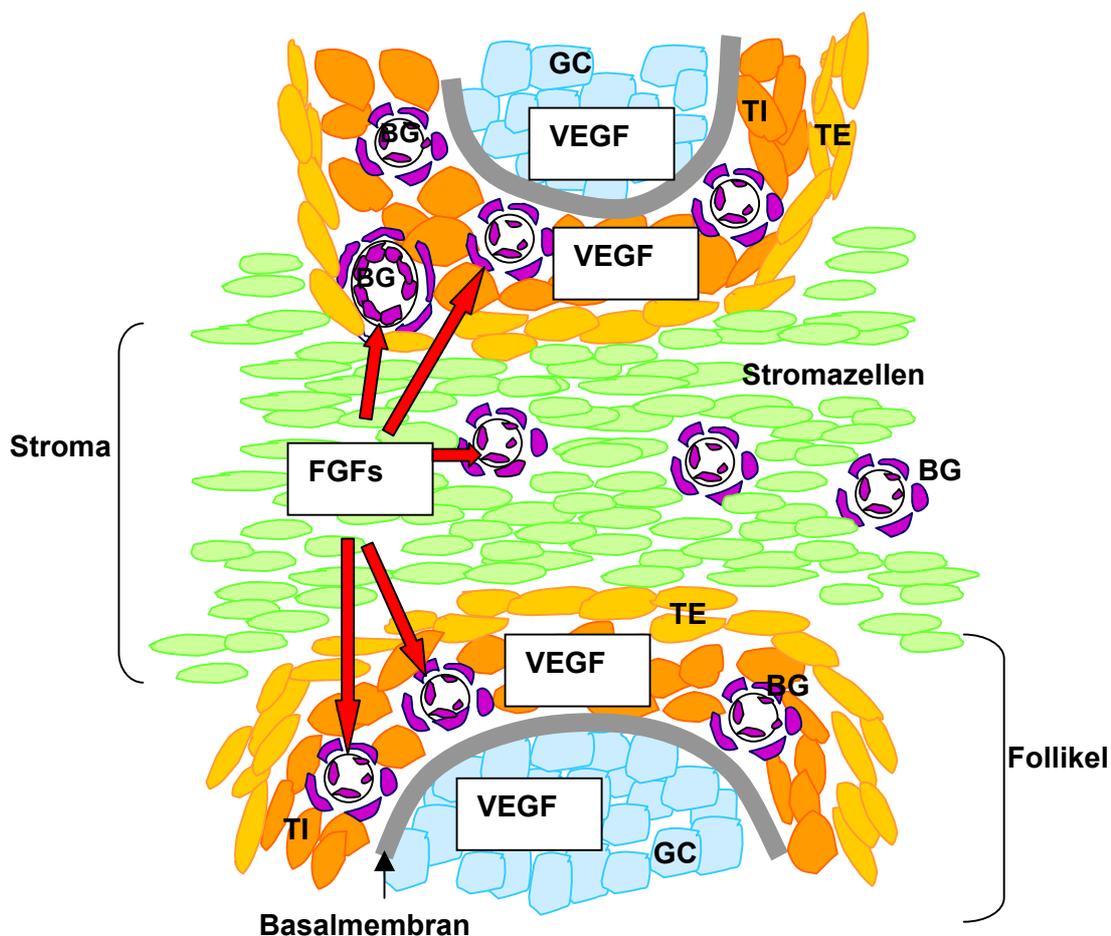


Abb.31 Lokalisation und Zusammenwirkung von FGF, VEGF und ihren Rezeptoren (FGFR, VEGFR, ) im Ovar des Schweins. (GC) Granulosazellen, (TI) Theka interna und (TE) Theka externa, (BG) Blutgefäße mit Endothelzellen und Perizyten.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung lokaler Regulationfaktoren während des Follikelendwachstums beim Schweine zu untersuchen, Zusammenhänge zu klären und eventuelle Unterschiede der Expression und Lokalisation zwischen poly- und monoovulatorischen Spezies zu erkennen.

Dafür wurden Ovarien von geschlechtsreifen Sauen am Schlachthof gewonnen und Follikel, die sich in der Follikularphase des Zyklus befanden, ovarielles Stromagewebe und Gelbkörper (CL) präpariert. In zwei Experimenten wurden Mittels qRT-PCR die Expressionsdaten von Gonadotropinrezeptoren (LHR, FSHR), Aromatase (P450 Aro) und Wachstumsfaktoren (Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF-1, FGF-2, FGF-7) und deren Rezeptoren (FGFR-1IIIc, FGFR-2IIIb, FGFR-2IIIc), Vaskulärer Endothelzellen Wachstumsfaktor (VEGF) und seinen Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2), Angiopoietin-Tie-System (Angp-1, Angp-2, Tie-1, Tie-2) und NO-Synthasen (eNOS, iNOS)) untersucht. Die Proteinlokalisierung von FGF-2, VEGF und VEGFR-1 wurde immunhistochemisch dargestellt. Die Molekulargröße des FGF-2 Proteins im Follikel und Stroma wurde mit Westernblot bestimmt. Im Experiment 1 wurde überprüft, ob die mRNA der ausgewählten Faktoren überhaupt im Schweinefollikel exprimiert wurden und wie stark die Expression in verschieden großen Follikel im Vergleich zu Stromagewebe und CL war. Experiment 2 befasste sich dann mit der genauen Regulation der Faktoren während des Follikelendwachstums in den beiden getrennten Follikel-Kompartimenten Granulosazellen (GC) und Theka interna (TI). Auf Grundlage des Östradiol-17 $\beta$ - (E2), Progesteron- und Prostaglandin F $_{2\alpha}$ -Gehaltes der Follikelflüssigkeit wurden vier Follikelgruppen (2-3mm, 4-6mm, >7mm, post LH) gebildet.

Die Expression des FSHR fiel im Laufe der Follikelentwicklung ab, während LHR und P450 Aro verstärkt exprimiert wurden. Die FGF-Familien Mitglieder wurden stark im Stroma exprimiert. Immunhistochemisch wurde für FGF-2 die dominierende Lokalisation in den Stromazellen bestätigt. Die 18kDa und 22 kDa Isoformen vom FGF-2 Protein konnten hauptsächlich in Stromazellen nachgewiesen werden. VEGF wurde wenig im Stroma exprimiert, das Protein des Liganden war in GC und TI der Follikel lokalisiert, der Rezeptor VEGFR-1 in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße. Die VEGF mRNA Expression sank nach dem LH-Gipfel ab. VEGFR-2 wurde in großen Follikeln aufreguliert, VEGFR-1 erst nach dem LH-Gipfel. In kleinen Follikeln war das Angp-2/Angp-1 Ratio am höchsten, in großen Follikeln am niedrigsten. Nach dem LH-

Gipfel stieg die Ratio wieder an. Die Expression von eNOS verlief gegenläufig zu iNOS, letztere wurde in den großen Follikeln abreguliert.

FSH spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung eines Follikelpools zum Zeitpunkt der Luteolyse, im weiteren Verlauf des Follikelwachstums werden die Follikel dann LH abhängig. Die Intensität der LHR Expression ist ein wichtiges Selektionsmerkmal für die Follikel. LH und E2 bewirken über Mediatoren wie FGF-7 die GC Proliferation und fördern über Stimulierung von VEGF die Angiogenese. Durch schnelle Volumenzunahme des Follikels kommt es zur Hypoxie in der Follikelhöhle, wodurch zahlreiche angiogenetische Faktoren wie z.B. VEGF und Angiopoietine stimuliert werden und für eine ausreichende Blutversorgung der Follikel sorgen. Durch LH und VEGF wird die NO Bildung von eNOS aktiviert, welches die E2 Synthese kontrolliert und durch Vasodilatation eine verbesserte Durchblutung der TI bewirkt. Durch steigende E2 Konzentrationen in großen Follikeln wird Angp-1 stimuliert, welches zur Stabilisierung des nun ausreichenden Blutgefäßnetzes in der TI führt. Nach dem LH-Gipfel kommt es durch Angp-2 wieder zu einer Destabilisierung der Blutgefäße, was wichtig für den Vorgang der Ovulation und der Angiogenese während des nachfolgenden CL Aufbaus ist. Ein wichtiger Parameter für die Follikelselektion scheint die Lokalisation von VEGF und FGF im Follikel zu sein. VEGF wirkt im Follikel und führt somit zu einem Entwicklungsvorteil derjenigen Follikel die mehr VEGF und seine Rezeptoren exprimieren. In der monoovulatorischen Spezies Rind wird dies als ein Grund für die Entwicklung des dominanten, ovulationsreifen Follikels angesehen. FGF-2 wird beim Schwein überwiegend im Stroma exprimiert und kann von hier aus seine Rezeptoren in der TI aktivieren, als auch synergistisch mit VEGF und seinen Rezeptoren verstärkt Angiogenese bewirken. Somit kann FGF-2 vom Stroma aus mehrere Follikel beeinflussen und könnte während des Follikelendwachstums ein wichtiger Faktor der Follikelselektion in polyovulatorischen Spezies sein.

## 7 Summary

### Expression of local regulatory factors in pig ovary

The aim of the study was to further investigate the importance of local other and to detect possible differences of expression and localisation in poly- and monoovulatory species.

Therefore ovaries of sexually mature gilts were collected at the local abattoir and follicles, which were determined to be in the follicular phase of oestrous cycle, ovarian stromal tissue and corpus luteum (CL) were prepared. In two experiments mRNA expression of gonadotropin receptors (LHR, FSHR) regulatory factors during the final follicle growth in pig, to clarify relations among each), Aromatase (P450 Aro) and growth factors (fibroblast growth factor (FGF-1, FGF-2, FGF-7) and their receptors (FGFR-1IIIc, FGFR-2IIIb, FGFR-2IIIc), vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptors (VEGFR-1, VEGFR-2), angiopoietin-tie-system (Angp-1, Angp-2, Tie-1, Tie-2) and nitric-oxid-synthase (eNOS, iNOS) were measured by qRT-PCR. An immunohistochemically determination and localisation was carried out for FGF-2, VEGF and VEGFR-1. Molecular size of FGF-2 was determined by westernblot. mRNA expression of the selected factors in pig total follicles and expression intensity in comparison to stromal tissue and CL was checked in experiment 1. Experiment 2 was concerned with the exact regulation of growth factors in the follicle compartments granulosa cells (GC) and theca interna (TI) during final follicular growth. A classification of follicles was performed according to follicular fluid oestradiol-17 $\beta$  (E2)-, progesterone and prostaglandin F2 $\alpha$  content into four groups (2-3mm, 4-6mm, >7mm, post LH).

Expression of FSHR decreased during follicle growth, while LHR and Aromatase increased. mRNA of FGF-family members was strongly expressed in stromal tissue. This was confirmed immunohistochemically by dominant localisation of FGF-2 protein in stromal cells. 18kDa and 22kDa isoforms of FGF-2 were overriding determined in stromal tissue. VEGF was located in GC and TI but not in stromal tissue. The receptor, VEGFR-1 was found in the endothelial- and smooth muscle cells of blood vessels. VEGF mRNA expression decreased after LH-peak. VEGFR-2 was upregulated in large follicles, VEGFR-1 after LH-peak. Angp-2/Angp-1 ratio was highest in small follicles, lowest in large follicles. After LH-peak the ratio rose again. Expression of eNOS was opposite with iNOS, which was downregulated in large follicles.

FSH plays an important part in recruiting a folliclepool at time of luteolysis, while the further developing follicles become LH dependent. The number of LHR is an important

selection criteria for the follicles. LH and E2 cause GC proliferation by mediators like FGF-7 and enhance angiogenesis by stimulating VEGF. While the follicle growth-up fast the pressure of oxygen in the follicular antrum decreases, whereby angiogenic factors like VEGF and angiopoietins get stimulated and provide an adequate blood supply for the follicles. Activated by LH and VEGF eNOS is producing NO, which controls E2 synthesis and leads to a better blood flow in the TI through vasodilatation. Increasing E2 concentrations in large follicles stimulate Angp-1, which stabilise the now sufficient bloodvessel network in the TI. After the LH-peak Angp-2 destabilises the blood vessels, which is important for the process of ovulation and the succeeding angiogenesis in CL buildup. For follicle selection an important parameter seems to be the localisation of VEGF and FGF in the follicle. VEGF acts in the follicle and therefore follicles which express more VEGF and receptors have a developmental advantage. In cows this fact is suggested as one basic in selection of the one dominant follicle. FGF-2 in the pig is mainly expressed in stromal tissue and able to activate FGFR in the TI and increases angiogenesis in a synergistic way with VEGF and its receptors. FGF-2 in stromal tissue consequently has influence on a few follicles and is maybe an important component in selection of follicles during final follicular growth in polyovulatory species.

## 8 Literaturverzeichnis

Aaronson SA, Bottaro DP, Miki T, Ron D, Finch PW, Fleming TP, Ahn J, Taylor WG, Rubin JS (1991) Keratinocyte growth factor. A fibroblast growth factor family member with unusual target cell specificity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **638**, 62-77.

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT (1994) Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am.J.Ophthalmol.* **118**, 445-450.

Ago H, Kitagawa Y, Fujishima A, Matsuura Y, Katsube Y (1991) Crystal structure of basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution. *J.Biochem.(Tokyo)* **110**, 360-363.

Ainsworth L, Baker RD, Armstrong DT (1975) Pre-ovulatory changes in follicular fluid prostaglandin F levels in swine. *Prostaglandins* **9**, 915-925.

Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ, Armstrong DT (1980) Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol.Reprod.* **23**, 621-627.

Ainsworth L, Tsang BK, Marcus GJ, Downey BR (1984) Prostaglandin production by dispersed granulosa and theca interna cells from porcine preovulatory follicles. *Biol.Reprod.* **31**, 115-121.

Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A (2003) Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res.* **314**, 157-166.

Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ (1998) Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ.Res.* **82**, 1007-1015.

Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ (2003) Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am.J.Pathol.* **162**, 1927-1936.

Babalola GO, Shapiro BH (1988) Correlation of follicular steroid hormone profiles with ovarian cyclicity in sows. *J.Reprod.Fertil.* **84**, 79-87.

Bagri A, Tessier-Lavigne M (2002) Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv.Exp.Med.Biol.* **515**, 13-31.

Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB, Pinkert CA (1984) Luteinizing hormone receptors and progesterone content in porcine corpora lutea after prostaglandin F2 alpha. *Biol.Reprod.* **31**, 913-919.

Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M (2000) Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol.Reprod.* **63**, 858-864.

Basini G, Bianco F, Grasselli F, Tirelli M, Bussolati S, Tamanini C (2004) The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. *Regul.Pept.* **120**, 69-75.

- Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM (2002) Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J.Anat.* **200**, 581-597.
- Bazer FW, Geisert RD, Thatcher WW, Roberts RM (1982) 'The establishment and maintenances of pregnancy. In: Control of pig production.' (Butterworths: England)
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J.Clin.Invest* **103**, 159-165.
- Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R (2000) Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J.Endocrinol.* **167**, 371-382.
- Berisha B, Sinowatz F, Schams D (2004) Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol.Reprod.Dev.* **67**, 162-171.
- Berisha B, Steffl M, Amselgruber W, Schams D (2006a) Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction.* **131**, 319-329.
- Berisha B, Welter H, Kliem H, Meyer HHD, Schams D (2006b) Changes in mRNA expression of angiopoietin and Tie receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reprod.Domest.Anim* **41**, 5.
- Berisha B, Welter H, Meyer HHD, Schams D (2005) The expression of VEGF and its receptors in bovine follicle before and after LH surge and in early corpus luteum (CL). *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **147**, 50.
- Berisha B, Welter H, Shimizu T, Miyamoto A, Meyer HH, Schams D (2006c) Expression of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) and FGF7 in Mature Follicles during the Periovulatory Period after GnRH in the Cow. *J.Reprod.Dev.*
- Bikfalvi A, Savona C, Perollet C, Javerzat S (1998) New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. *Angiogenesis.* **1**, 155-173.
- Black JL, Erickson BH (1968) Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat.Rec.* **161**, 45-55.
- Bonello N, McKie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brannstrom M, Norman RJ (1996) Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol.Reprod.* **54**, 436-445.
- Burgess WH, Maciag T (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **58**, 575-606.
- Camp TA, Rahal JO, Mayo KE (1991) Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol.Endocrinol.* **5**, 1405-1417.

- Cardenas H, Pope WF (2002) Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle. *Mol.Reprod.Dev.* **62**, 92-98.
- Carmeliet P (2000) Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis? *Circ.Res.* **87**, 176-178.
- Cavender JL, Murdoch WJ (1988) Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. *Biol.Reprod.* **39**, 989-997.
- Christenson RK, Ford JJ, Redmer DA (1985) Maturation of ovarian follicles in the prepubertal gilt. *J.Reprod.Fertil.Suppl* **33**, 21-36.
- Clark JR, First NL, Chapman AB, Casida LE (1975) Ovarian follicular development during the estrous cycle in gilts following electrocautery of follicles. *J.Anim Sci.* **41**, 1105-1111.
- Coleman DA, Fleming MW, Dailey RA (1984) Factors affecting ovarian compensation after unilateral ovariectomy in gilts. *J.Anim Sci.* **59**, 170-176.
- Cooke JP, Tsao PS (1993) Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* **88**, 2451-2454.
- Corbin CJ, Moran FM, Vidal JD, Ford JJ, Wise T, Mapes SM, Njar VC, Brodie AM, Conley AJ (2003) Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biol.Reprod.* **69**, 390-397.
- Cuevas P, Carceller F, Reimers D, Gimenez G (2000) Fibroblast growth factor-1 inhibits medial smooth muscle cells apoptosis after balloon injury. *Neurol.Res.* **22**, 185-188.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169.
- Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Huang T, Kovac L, Xu A, Leidich R, Radziejewska E, Rafique A, Goldberg J, Jain V, Bailey K, Karow M, Fandl J, Samuelsson SJ, Ioffe E, Rudge JS, Daly TJ, Radziejewski C, Yancopoulos GD (2003) Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat.Struct.Biol.* **10**, 38-44.
- DiMario J, Buffinger N, Yamada S, Strohman RC (1989) Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* **244**, 688-690.
- Dixit VD, Parvizi N (2001) Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod.Sci.* **65**, 1-16.
- Döcke F (1994) 'Veterinärmedizinische Endokrinologie.' (Gustav Fischer Verlag: Jena, Stuttgart)
- Dor Y, Porat R, Keshet E (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **280**, C1367-C1374.
- Driancourt MA (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* **55**, 1211-1239.

- Driancourt MA, Locatelli A, Prunier A (1995) Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reprod.Nutr.Dev.* **35**, 663-673.
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML (1994) Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* **8**, 1897-1909.
- Eiler H, Nalbandov AV (1977) Sex steroids in follicular fluid and blood plasma during the estrous cycle of pigs. *Endocrinology* **100**, 331-338.
- Espey LL (1980) Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol.Reprod.* **22**, 73-106.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 139-149.
- Evans G, Dobias M, King GJ, Armstrong DT (1981) [Estrogen, androgen, and progesterone biosynthesis by theca and granulosa of preovulatory follicles in the pig.]. *Biol.Reprod.* **25**, 673-682.
- Evans G, Dobias M, King GJ, Armstrong DT (1983) Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. *Biol.Reprod.* **28**, 322-328.
- Faletti A, Perez MS, Perotti C, de Gimeno MA (1999) Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. *Nitric.Oxide.* **3**, 340-347.
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* **18**, 4-25.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* **9**, 669-676.
- Findlay JK (1986) Angiogenesis in reproductive tissues. *J.Endocrinol.* **111**, 357-366.
- Florkiewicz RZ, Baird A, Gonzalez AM (1991) Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization. *Growth Factors* **4**, 265-275.
- Flowers B, Cantley TC, Martin MJ, Day BN (1991) Episodic secretion of gonadotrophins and ovarian steroids in jugular and utero-ovarian vein plasma during the follicular phase of the oestrous cycle in gilts. *J.Reprod.Fertil.* **91**, 101-112.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70.
- Friesel RE, Maciag T (1995) Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J.* **9**, 919-925.
- Garrett WM, Guthrie HD (1997) Steroidogenic enzyme expression during preovulatory follicle maturation in pigs. *Biol.Reprod.* **56**, 1424-1431.

- Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sanchez-Criado JE (1999) A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. *Biol.Reprod.* **60**, 914-919.
- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**, 1149-1159.
- Gillis P, Savla U, Volpert OV, Jimenez B, Waters CM, Panos RJ, Bouck NP (1999) Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J.Cell Sci.* **112 ( Pt 12)**, 2049-2057.
- Girsh E, Greber Y, Meidan R (1995) Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. *Biol.Reprod.* **52**, 954-962.
- Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG (1998) Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* **78**, 1385-1394.
- Gomez R, Lima I, Simon C, Pellicer A (2004) Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Reproduction.* **127**, 483-489.
- Gospodarowicz D (1990) Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clin.Orthop.Relat Res.* 231-248.
- Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Esch F, Bohlen P (1985) Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* **117**, 2383-2391.
- Grant SA, Hunter MG, Foxcroft GR (1989) Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J.Reprod.Fertil.* **86**, 171-183.
- Grasselli F, Basini G, Bussolati S, Tamanini C (2002) Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. *Reprod.Domest.Anim* **37**, 362-368.
- Grasselli F, Basini G, Tirelli M, Cavalli V, Bussolati S, Tamanini C (2003) Angiogenic activity of porcine granulosa cells co-cultured with endothelial cells in a microcarrier-based three-dimensional fibrin gel. *J.Physiol Pharmacol.* **54**, 361-370.
- Grasselli F, Ponderato N, Basini G, Tamanini C (2001) Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domest.Anim Endocrinol.* **20**, 241-252.
- Griffith OW, Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu.Rev.Physiol* **57**, 707-736.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**, 454-456.
- Guthridge M, Bertolini J, Cowling J, Hearn MT (1992) Localization of bFGF mRNA in cyclic rat ovary, diethylstilbesterol primed rat ovary, and cultured rat granulosa cells. *Growth Factors* **7**, 15-25.

- Guthrie HD, Barber JA, Leighton JK, Hammond JM (1994) Steroidogenic cytochrome P450 enzyme messenger ribonucleic acids and follicular fluid steroids in individual follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol.Reprod.* **51**, 465-471.
- Guthrie HD, Bolt DJ, Cooper BS (1990) Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosa cell aromatase activity in prepuberal gilts. *J.Anim Sci.* **68**, 3719-3726.
- Guthrie HD, Bolt DJ, Cooper BS (1993) Changes in follicular estradiol-17 beta, progesterone and inhibin immunoactivity in healthy and atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Domest.Anim Endocrinol.* **10**, 127-140.
- Guthrie HD, Cooper BS (1996) Follicular Atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. *Biol.Reprod.* **55**, 543-547.
- Guthrie HD, Grimes RW, Cooper BS, Hammond JM (1995) Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J.Anim Sci.* **73**, 2834-2844.
- Hayashi KG, Acosta TJ, Tetsuka M, Berisha B, Matsui M, Schams D, Ohtani M, Miyamoto A (2003) Involvement of angiotensin-converting enzyme system in bovine follicular development and atresia: messenger RNA expression in theca interna and effect on steroid secretion. *Biol.Reprod.* **69**, 2078-2084.
- Hayashi KG, Berisha B, Matsui M, Schams D, Miyamoto A (2004) Expression of mRNA for the angiotensin-converting enzyme system in granulosa cells during follicular development in cows. *J.Reprod.Dev.* **50**, 477-480.
- Hazzard TM, Christenson LK, Stouffer RL (2000) Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiotensin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol.Hum.Reprod.* **6**, 993-998.
- Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL (2002) Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol.Reprod.* **67**, 1305-1312.
- Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ (1998) VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am.J.Physiol* **274**, H1054-H1058.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J.Biol.Chem.* **267**, 26031-26037.
- Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R (2004) Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod.Sci.* **82-83**, 461-477.
- Hunter RH, Cook B, Baker TG (1976) Dissociation of response to injected gonadotropin between the Graafian follicle and oocyte in pigs. *Nature* **260**, 156-158.
- Hunter RH, Poyser NL (1985) Ovarian follicular fluid concentrations of prostaglandins E2, F2 alpha and I2 during the pre-ovulatory period in pigs. *Reprod.Nutr.Dev.* **25**, 909-917.

- Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG (1995) Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1255-1261.
- Ireland JJ, Roche JF (1983) Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* **112**, 150-156.
- Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP (1997) Cellular proliferation and fibroblast growth factors in the corpus luteum during early pregnancy in ewes. *Growth Factors* **14**, 15-23.
- Jablonka-Shariff A, Olson LM (1997) Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* **138**, 460-468.
- Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM (1999) Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol.Reprod.* **61**, 171-177.
- Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* **267**, 14519-14522.
- Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A (2002) The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol.Med.* **8**, 483-489.
- Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Maciag T, Drohan WN (1986) Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* **233**, 541-545.
- Jia XC, Hsueh AJ (1984) Homologous regulation of hormone receptors: luteinizing hormone increases its own receptors in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **115**, 2433-2439.
- Jia XC, Kessel B, Welsh TH, Jr., Hsueh AJ (1985) Androgen inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **117**, 13-22.
- Johnson DE, Williams LT (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv.Cancer Res.* **60**, 1-41.
- Ka H, Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW (2000) Keratinocyte growth factor: expression by endometrial epithelia of the porcine uterus. *Biol.Reprod.* **62**, 1772-1778.
- Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ (2005) Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod.Biol.* **5**, 111-136.
- Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 10705-10709.

- Kessel B, Liu YX, Jia XC, Hsueh AJ (1985) Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Biol.Reprod.* **32**, 1038-1050.
- Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY (2000) Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ.Res.* **86**, 952-959.
- Klagsbrun M, D'Amore PA (1991) Regulators of angiogenesis. *Annu.Rev.Physiol* **53**, 217-239.
- Klagsbrun M, Moses MA (1999) Molecular angiogenesis. *Chem.Biol.* **6**, R217-R224.
- Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R (2002) The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv.Exp.Med.Biol.* **515**, 33-48.
- Knox RV (2005) Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest.Anim Endocrinol.* **29**, 385-397.
- Knox RV, Naber CH, Zimmerman DR (1991) Follicle-stimulating hormone (FSH) during the secondary surge in gilts as influenced by administration of porcine follicular fluid (pFF). *J.Anim Sci.* **69**, 761-769.
- Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W (1998) Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr.Biol.* **8**, 529-532.
- Koos RD, Seidel RH (1989) Detection of acidic fibroblast growth factor mRNA in the rat ovary using reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **165**, 82-88.
- Korhonen J, Partanen J, Armstrong E, Vaahtokari A, Elenius K, Jalkanen M, Alitalo K (1992) Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. *Blood* **80**, 2548-2555.
- Kroll J, Waltenberger J (1998) VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **252**, 743-746.
- Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J.Biol.Chem.* **271**, 19705-19709.
- Landriscina M, Soldi R, Bagala C, Micucci I, Bellum S, Tarantini F, Prudovsky I, Maciag T (2001) S100A13 participates in the release of fibroblast growth factor 1 in response to heat shock in vitro. *J.Biol.Chem.* **276**, 22544-22552.
- Leiser R, Zimmermann W, Sidler X, Christen A (1988) [Normal cyclical morphology of the endometrium and ovary of swine]. *Tierarztl.Prax.* **16**, 261-280.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162.
- Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M (1996) VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am.J.Physiol* **270**, H1803-H1811.

- Li J, Shworak NW, Simons M (2002) Increased responsiveness of hypoxic endothelial cells to FGF2 is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent regulation of enzymes involved in synthesis of heparan sulfate FGF2-binding sites. *J.Cell Sci.* **115**, 1951-1959.
- Liu J, Aronow BJ, Witte DP, Pope WF, La Barbera AR (1998) Cyclic and maturation-dependent regulation of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol.Reprod.* **58**, 648-658.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann.Intern.Med.* **120**, 227-237.
- Madej A, Lang A, Brandt Y, Kindahl H, Madsen MT, Einarsson S (2005) Factors regulating ovarian function in pigs. *Domest.Anim Endocrinol.* **29**, 347-361.
- 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, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60.
- Masuda M, Kubota T, Aso T (2001) Effects of nitric oxide on steroidogenesis in porcine granulosa cells during different stages of follicular development. *Eur.J.Endocrinol.* **144**, 303-308.
- Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, Koji T, Esumi H, Taketani Y (2000) Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol.Reprod.* **63**, 141-146.
- Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR (1991) A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 9026-9030.
- Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA (2001) Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol.Reprod.* **65**, 1014-1019.
- McCann SM, Karanth S, Kimura M, Yu WH, Rettori V (1996) The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. *Rev.Bras.Biol.* **56 Su 1 Pt 1**, 105-112.
- McGee EA, Chun SY, Lai S, He Y, Hsueh AJ (1999) Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. *Fertil.Steril.* **71**, 732-738.
- McNatty KP, Gibb M, Dobson C, Thurley DC (1981) Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *J.Endocrinol.* **90**, 375-389.
- Meyer HH, Eisele K, Osaso J (1989) A biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-PGF $_2$   $\alpha$ . *Prostaglandins* **38**, 375-383.
- Meyer HH, Sauerwein H, Mutayoba BM (1990) Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17  $\beta$ . *J.Steroid Biochem.* **35**, 263-269.

- Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM (2004) Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. *Hum.Reprod.* **19**, 30-40.
- Mitsube K, Zackrisson U, Brannstrom M (2002) Nitric oxide regulates ovarian blood flow in the rat during the periovulatory period. *Hum.Reprod.* **17**, 2509-2516.
- Miyabayashi K, Shimizu T, Kawauchi C, Sasada H, Sato E (2005) Changes of mRNA expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins and their receptors during the periovulatory period in eCG/hCG-treated immature female rats. *J.Exp.Zoolog.A Comp Exp.Biol.* **303**, 590-597.
- Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S (2002) Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J.Cell Sci.* **115**, 175-183.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* **43**, 109-142.
- Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH (1992) Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol.Reprod.* **47**, 485-491.
- Morris SM, Jr., Billiar TR (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am.J.Physiol* **266**, E829-E839.
- Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM (1999) Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19**, 1156-1161.
- Nathan C, Xie QW (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.
- Nickel W (2005) Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Traffic* **6**, 607-614.
- Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK (2001) Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol.Cell Endocrinol.* **175**, 123-130.
- Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, Givol D, Lonai P (1993) Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev.Biol.* **158**, 475-486.
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC (1999) Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* **79**, 213-223.
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J.Clin.Invest* **100**, 3131-3139.
- Parrott JA, Skinner MK (1998) Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology* **139**, 228-235.

- Parrott JA, Vigne JL, Chu BZ, Skinner MK (1994) Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology* **135**, 569-575.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Fernandez G (2001) Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC delta-dependent pathway. *Endocrinology* **142**, 4203-4211.
- Picton HM, Miller AT, Hunter MG (1999) Effect of FSH infusion on follicle development in GnRH agonist-treated gilts. *J.Reprod.Fertil.* **117**, 249-257.
- Piotrowicz RS, Maher PA, Levin EG (1999) Dual activities of 22-24 kDa basic fibroblast growth factor: inhibition of migration and stimulation of proliferation. *J.Cell Physiol* **178**, 144-153.
- Plendl J (2000) Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat.Histol.Embryol.* **29**, 257-266.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr.Relat Cancer* **7**, 165-197.
- Prakash BS, Meyer HH, Schallenberger E, van de Wiel DF (1987) Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J.Steroid Biochem.* **28**, 623-627.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 159-178.
- Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI (2004) Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil.Steril.* **82 Suppl 3**, 1101-1105.
- Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA (1994) Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog.Growth Factor Res.* **5**, 159-175.
- Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA (2002) Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int.J.Exp.Pathol.* **83**, 151-163.
- Reynolds LP, Redmer DA (1998) Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J.Anim Sci.* **76**, 1671-1681.
- Richards JS (1979) Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog.Horm.Res.* **35**, 343-373.
- Richards JS (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* **60**, 51-89.
- Richards JS, Hedin L (1988) Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu.Rev.Physiol* **50**, 441-463.
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.

Robinson CJ, Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J.Cell Sci.* **114**, 853-865.

Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum.Reprod.Update.* **4**, 3-24.

Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon G, Taylor WG, Fortney E, Sakata H, Finch PW, . (1995) Keratinocyte growth factor. *Cell Biol.Int.* **19**, 399-411.

Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA (1989) Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 802-806.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-74.

Schams D, Amselgruber W, Einspanier R, Sinowatz F, Gospodarowicz D (1994) Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. *Endocrine* 907-912.

Schams D, Berisha B (2002) Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest.Anim Endocrinol.* **23**, 53-65.

Schams D, Berisha B (2004) Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. *Reprod.Domest.Anim* **39**, 241-251.

Schams D, Kosmann M, Berisha B, Amselgruber WM, Miyamoto A (2001) Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* **109**, 155-162.

Semenza G (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem.Pharmacol.* **64**, 993-998.

Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF (1998) Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J.Biol.Chem.* **273**, 29979-29985.

Shimizu T, Iijima K, Sasada H, Sato E (2003a) Messenger ribonucleic Acid expressions of hepatocyte growth factor, angiopoietins and their receptors during follicular development in gilts. *J.Reprod.Dev.* **49**, 203-211.

Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E (2003b) Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol.Reprod.* **69**, 1388-1393.

Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E (2002) Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol.Reprod.* **67**, 1846-1852.

Shukovski L, Tsafri A (1994) The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* **135**, 2287-2290.

- Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E (1993) Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J.Clin.Invest* **91**, 2235-2243.
- Slomczynska M, Duda M, Si zK (2001) The expression of androgen receptor, cytochrome P450 aromatase and FSH receptor mRNA in the porcine ovary. *Folia Histochem.Cytobiol.* **39**, 9-13.
- Snyder GD, Holmes RW, Bates JN, Van Voorhis BJ (1996) Nitric oxide inhibits aromatase activity: mechanisms of action. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **58**, 63-69.
- Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M (2002) VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J.Cell Biochem.* **85**, 357-368.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 444-448.
- Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM (2001) Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch.Med.Res.* **32**, 567-575.
- Strickland S, Beers WH (1976) Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J.Biol.Chem.* **251**, 5694-5702.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180.
- Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD (1998) Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* **282**, 468-471.
- Takekida S, Matsuo H, Maruo T (2003) GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages. *Mol.Cell Endocrinol.* **202**, 155-164.
- Takesue K, Hattori MA, Nishida N, Kato Y, Fujihara N (2001) Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. *J.Mol.Endocrinol.* **26**, 259-265.
- Tamanini C, De Ambrogi M (2004) Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod.Domest.Anim* **39**, 206-216.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc.Res.* **65**, 550-563.
- Tanaka J, Acosta TJ, Berisha B, Tetsuka M, Matsui M, Kobayashi S, Schams D, Miyamoto A (2004) Relative changes in mRNA expression of angiopoietins and receptors tie in bovine corpus luteum during estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis: a possible mechanism for the initiation of luteal regression. *J.Reprod.Dev.* **50**, 619-626.

- Tao Y, Fu Z, Zhang M, Xia G, Yang J, Xie H (2004) Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Mol.Cell Endocrinol.* **222**, 93-103.
- Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ (2001) Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc.Res.* **49**, 659-670.
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD (2000) Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat.Med.* **6**, 460-463.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM (1999) Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286**, 2511-2514.
- Tonetta SA, diZerega GS (1989) Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr.Rev.* **10**, 205-229.
- Tsang BK, Ainsworth L, Downey BR, Armstrong DT (1979) Pre-ovulatory changes in cyclic AMP and prostaglandin concentrations in follicular fluid of gilts. *Prostaglandins* **17**, 141-148.
- Tsang BK, Arodi J, Li M, Ainsworth L, Srikandakumar A, Downey BR (1988) Gonadotropic regulation of prostaglandin production by ovarian follicular cells of the pig. *Biol.Reprod.* **38**, 627-635.
- Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J.Clin.Invest* **95**, 1798-1807.
- Van Voorhis BJ, Moore K, Strijbos PJ, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, Weiner CP (1995) Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. *J.Clin.Invest* **96**, 2719-2726.
- Vikkula M, Boon LM, Carraway KL, III, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR (1996) Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* **87**, 1181-1190.
- Wang Y, Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv.Pharmacol.* **34**, 71-90.
- Weimann E, Kiess W (1991) 'Wachstumsfaktoren: Grundlagen, Biochemie und klinische Bedeutung.' (Schattauer Verlag: Stuttgart)
- Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM (1998) Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J.Biol.Chem.* **273**, 18514-18521.
- Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM (2001b) Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* **142**, 3244-3254.

- Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM (2001a) Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* **142**, 3244-3254.
- Wulff C, Wilson H, Lague P, Duncan WC, Armstrong DG, Fraser HM (2000) Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 4302-4309.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248.
- Yuan W, Lucy MC, Smith MF (1996) Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol.Reprod.* **55**, 1045-1054.
- Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brannstrom M (1996) Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum.Reprod.* **11**, 2667-2673.
- Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F (1994) Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J.Clin.Invest* **94**, 2036-2044.
- Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Granger H, Geppetti P, Ledda F (1993) Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from postcapillary venules. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **192**, 1198-1203.
- Zimmermann RC, Hartman T, Kavac S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J (2003) Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J.Clin.Invest* **112**, 659-669.
- Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M (2001) Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 768-772.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. H.H.D. Meyer möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut danken.

Herrn Prof. Dr. D. Schams und Dr. B. Berisha danke ich für die Überlassung des Themas und die immer offene und freundliche Diskussion.

Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz für seine Bereitschaft, die Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zu vertreten.

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. W. Amselgruber bedanken

Vielmals danken möchte ich Frau G. Schwentker und Frau M. Partsch für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Dank auch an Dr. Harald Welter für die gute Einarbeitung in die Methodik und Dr. Susanne Ulbrich, die immer hilfsbereit bei allen Fragen war.

Besonderen Dank gilt meinen Mit-Doktoranden, allen voran Peter und Heike, für die gemeinsame Lösung so manchen Rätsels, lustige Stunden und ein nettes und kollegiales Arbeitsklima.

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes danke ich für eine angenehme Zusammenarbeit und eine schöne Zeit in Freising.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung, die sie mir während des gesamten Weges meiner Ausbildung gegeben haben, herzlich bedanken.

Danken möchte ich auch den Tierärzten und Fleischbeschauern des Schlachthof Landshut für die immer freundlich gewährte Unterstützung bei der Probenbeschaffung.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vera Steinberg  
geb. 05. Januar 1977 in Wuppertal  
ledig

### Schulbildung

1983-1986                      Grundschule Recklinghausen  
1987-1996                      Theodor-Heuss-Gymnasium Recklinghausen

### Berufsausbildung

1997-1999                      Veterinärmedizinische Fakultät der  
   Universität Budapest, Ungarn  
2000-2003                      Veterinärmedizinische Fakultät der  
   Freien Universität Berlin  
01.2004                          Approbation als Tierärztin

### Promotion

Seit 03.2004                      Doktorandin am Lehrstuhl für Physiologie,  
   Technische Universität München, Weihenstephan  
06.2004 – 12.2005              Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für  
   Physiologie, TUM, Weihenstephan

## Publikationen

### Abstract

Steinberg, V.; Berisha, B.; Pfaffl, M.W.; Schams, D.: Expression and localisation of fibroblast growth factor (FGF) family members in porcine antral follicles. – In: Proceedings of the 2nd International qPCR Symposium, Industrial Exhibition, TATAA Application Workshop & qPCR Matrix Workshop, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, 05.-09.09.2005, (2005) Abstr. No. P19, S. 27

### Präsentationen

mRNA expression and localisation of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles, Montagsseminar 06/2005, Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München

Function of growth factors in the porcine ovary, Montagsseminar, 01/2006, Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München

### Gensequenz

Steinberg, V, Schams D., Berisha B. (2005) Sus scrofa partial mRNA for receptor tyrosine kinase (TIE-1 gene), Accession Nummer der EMBL Datenbank : AJ867846