

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
(Direktor Univ.- Prof. Dr. Univ.-Prof. Dr. med. Marek Zygmunt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Thema: Expression von Transforming growth factor- β (TGF- β) 1,2,3 und Typ I und II
Rezeptor (TGF- β RI, RII) im Laufe der Entwicklung des menschlichen fetalen Ovars
und in Term-Plazentagewebe**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2016

vorgelegt von:
Birte Schilling
geb. am: 23.05.1967
in: Bad Oldesloe

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Mustea

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Fluhr

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Frauenklinik

Tag der Disputation: 17.05.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Ovar	5
1.2. Plazenta	8
1.3. TGF- β ein pleiotroper Wachstumsfaktor	10
1.4. TGF- β Rezeptoren (TGF- β R)	13
1.5. Biologische Effekte	14
2. Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Gewebeproben	20
3.2. Reagenzien	21
3.3. Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (PCR)	23
3.4. Immunohistochemie	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Fetale Ovarien	26
4.2. Plazenta	33
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	42
7. Literatur	43
Danksagung	48

1. Einleitung

Die fetale Organentwicklung ist eine der vulnerabelsten Phasen für das Entstehen von Missbildungen und Funktionsstörungen. Dies gilt auch für die Entwicklung des Ovars. Das Polycystische Ovar-Syndrom (PCO) ist eine häufig vorkommende Erkrankung von Frauen im Reproduktionsalter. Je nachdem welche Diagnosekriterien zu Grunde gelegt werden wird angenommen, dass bis zu 20% aller Frauen [1] darunter leiden. Die Ätiologie ist letztlich nicht geklärt, aber aufgrund des vorliegenden Krankheitsbildes u.a. mit einer Störung sowohl der Steroidsynthese als auch der Formation der Follikel sowie des umliegenden Bindegewebes könnte der Ursprung der Erkrankung bereits in der Fetalperiode liegen.

So kommt es zum Beispiel beim PCO Syndrom zu einer vermehrten Androgenausschüttung durch Dysregulation der Steroidsynthese. An dieser Dysfunktion der Thecazellen sind auch andere Faktoren wie z.B. Insulin-Growth-Factor 1 beteiligt. [2]. Auch erscheint das die Oocyten umgebende Stroma sowie die Verteilung und die Entwicklungsstadien der einzelnen Follikel innerhalb des Ovars pathologisch verändert [3].

Es ist somit von Bedeutung die Wachstumsfaktoren zu identifizieren, die die fetale Entwicklung des Ovars regulieren. Transforming growth factor beta (TGF- β) ist ein wichtiger Regulator von Wachstums- und Differenzierungsprozessen in zahlreichen Organen - sowohl in der pränatalen als auch in der postnatalen Entwicklungsphase. Daher ist TGF- β ein vielversprechender Kandidat, der auch an der Entwicklung des fetalen humanen Ovars beteiligt sein könnte.

Darüber hinaus ist bekannt, dass einige der TGF- β Isoformen in der Plazenta nachgewiesen wurden [4, 5]. Ein differenzierter Nachweis der verschiedenen Isoformen und den dazugehörigen Rezeptoren könnte Hinweise darauf geben, ob TGF- β in dem Regulationsmechanismus der Plazenta mitbeteiligt sein könnte

Daher nutzte ich die Möglichkeit zu einem Forschungsaufenthalt in dem Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, Brigham and Women'S Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, in der Arbeitsgruppe von Prof. John Yeh.

Zum Zeitpunkt zu dem die Experimente durchgeführt wurden war nicht bekannt, ob TGF- β und seine Rezeptoren während der fetalen humanen Ovarentwicklung exprimiert werden. Ebenfalls war im humanen System nicht gezeigt, ob die Plazenta im dritten Trimenon neben

TGF- β 1 und TGF- β 2 auch die Isoform TGF- β 3 sowie für die Signalübermittlung erforderlichen Rezeptoren exprimiert [4, 5].

Im Folgenden wird daher ein kurzer Überblick über die Entwicklung des Ovars (1.1.) den Aufbau der Plazenta (1.2.) sowie die Bedeutung von TGF- β als Wachstumsfaktor mit besonderem Schwerpunkt in der Regulation der Oogenese (1.3.) gegeben.

1.1. Ovar

Die Entwicklung der weiblichen Gameten im menschlichen Fetus und Embryo wird von Expansion durch mitotische Teilung und Reduktion durch Atresie begleitet. Dabei ergeben sich dramatischen Veränderungen der Anzahl weiblicher Gameten. So wird durch mitotische Vermehrungszyklen um die 20. Schwangerschaftswoche (SSW) eine maximale Anzahl von etwa 7 Millionen Keimzellen erreicht. Im Laufe der weiteren fetalen Entwicklung schreitet die Differenzierung der einzelnen Keimzellen unterschiedlich schnell voran, so dass sich zum Zeitpunkt der Geburt in den Ovarien die Keimzellen in Follikeln unterschiedlicher Reifestufen befinden. Ein Großteil der Keimzellen wird jedoch bereits in der Fetalperiode durch Atresie zerstört. Der Vorgang der Dezimierung setzt sich, im Gegensatz zu der mitotischen Vermehrung, über die geschlechtsreife Phase bis zur Menopause fort.

Der hier kurz skizzierte komplexe Verlauf der Keimzelleselektion, ihrer Reifung und der zum Teil parallel laufenden Atresie unterliegt einer fein abgestimmten Steuerung, über deren Einzelheiten bis heute nur sehr wenig bekannt ist [6]. Als eine Substanzgruppe, die regulierend in verschiedenste Funktionen und Abläufe von Lebewesen einwirken, haben sich die Wachstumsfaktoren herauskristallisiert. Hierzu gehört auch die Familie der Transforming Growth Factor β (TGF- β). Für TGF- β konnte bereits in verschiedenen Spezies eine wichtige Rolle in Rahmen der embryonalen und fetalen Differenzierung nachgewiesen werden, so dass auch ein regulierender Effekt auf die Entwicklung humaner fetaler Gameten anzunehmen ist [7, 8]. Detaillierte Untersuchungen zur Rolle von TGF- β als potentieller Regulator der humanen fetalen Ovarentwicklung liegen allerdings noch nicht vor.

Einblicke in diese Regulationsmechanismen könnten helfen Krankheitsbilder mit Einfluss auf die Fertilität wie z.B. das PCO-Syndrom, aber auch Krankheitsbilder die durch das Heranreifen schadhafter Oocyten entstehen, besser zu verstehen

Im Folgenden wird die Entwicklung fetaler humaner Ovarien kurz skizziert und das gegenwärtige Wissen über Funktion und Steuerung von TGF- β und seinen Isoformen bei Differenzierung und Proliferation verschiedener Organsysteme dargestellt.

Entwicklung fetaler humaner Ovarien

Die Entwicklung humaner Ovarien kann in vier verschiedene Phasen eingeteilt werden:

- I. Indifferentes gonadales Stadium
- II. Stadium der Differenzierung
- III. Phase der Vermehrung und Reifung
- IV. Phase der Follikelformation

I. Indifferentes gonadales Stadium

In einem Gestationsalter von etwa 5 Wochen sind paarige Gonadenanlagen, die Genitalleisten, angelegt. Sie entstehen durch die Proliferation des Zölomepithels, welches sich aus dem mesodermalen Keimblatt ableitet, und der Verdichtung des darunterliegenden Mesenchyms. In diesem Zeitraum ist eine morphologische Unterscheidung zwischen Ovar und Testis nicht möglich.

Im Gegensatz zu der Entwicklung männlicher primärer Keimstränge werden die weiblichen durch eindringendes Mesenchyms in unregelmäßige Zellhaufen aufgelöst. Sie werden durch eine zweite Generation von Keimsträngen in den Markbereich der Ovaranlage verdrängt und später durch gefäßreiches Bindegewebe ersetzt, welches dann die Medulla ovarii bildet. Diese zweite Generation von Keimsträngen wird ebenfalls von Zölomepithel gebildet und beschränkt sich auf die Rindenzone der Ovaranlage.

Der Ursprung der primordialen Keimzellen (Urkeimzellen) lässt sich aus dem primitiven Ektoderm ableiten, wobei eine spezifische Ursprungszelle bisher nicht definiert werden konnte. In der dritten SSW sind sie erstmalig an der Wand des Dottersackes in der Nähe des Allantoisabganges sichtbar. Durch das Wachstum des Embryos sowie durch aktive Bewegungen wandern sie zwischen der 4. und 5. SSW in die Gonadenanlagen. Schon während dieser Wanderung beginnen die Keimzellen sich durch Mitosen zu vermehren. Bis zur 6. SSW beträgt ihre Anzahl bereits etwa 10.000. Haben die Primordial Keimzellen die Gonadenanlagen erreicht, differenzieren sie sich zu Oogonien.

Der Ursprung der somatischen Zellen innerhalb der Gonaden ist bis lang noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass sie aus dem Mesonephron stammen.

II. Stadium der Differenzierung

Die Differenzierung zwischen Testis und Ovar findet um die 6.-9 SSW statt. Beim Fehlen des Testis Determining Factor (TDF), Produkt eines Y-chromosomal gelegenen Genes, geht die Differenzierung des inneren sowie des äußere weiblichen Genitales in die Gonadenreifung über.

III. Phase der Vermehrung und Reifung

Die ersten Anzeichen der Differenzierung der Keimzellen zu Oogonien lassen sich in der 6.-8. SSW nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch die rasante mitotische Vermehrung, die mit 6-7 Millionen Oogonien in der 16.-20. SSW ein Maximum erreicht.

Ein Teil der Oogonien tritt nun in die Prophase der ersten meiotischen Teilung über. Dieser Vorgang der Meiose zu einem haploiden Entwicklungsstadium läuft während der gesamten Schwangerschaft und ist erst mit Zeitpunkt der Geburt beendet. Das Verharren der Oozyten in der Meiose nach der ersten Reifeteilung wird vermutlich durch hemmende Substanzen unterhalten, die von den benachbarten Granulosazellen produziert werden. Die so entstandenen primären Oozyten werden im dritten Entwicklungsmonat zumeist im Inneren der Gonaden angetroffen.

Der Verlust von Keimzellen lässt sich während der Mitose, Meiose und auch, nach der Follikelbildung nachweisen. Der massive Abfall der Oozytenanzahl in der 2. Schwangerschaftshälfte (etwa 4-5 Millionen) resultiert somit aus mehreren Mechanismen. Es kommt zu Atresie im Rahmen der Meiose. Primäre Oozyten, die nach der 1. Reifeteilung keine Granulosazellschicht entwickelt haben, degenerieren. Und zusätzlich migrieren Keimzellen der äußeren Gonaden an die Oberfläche und werden dort von dem Oberflächenepithel inkorporiert oder in den Peritonealraum eliminiert. Das Neugeborene hat somit bereits zum Zeitpunkt der Geburt etwa 80% seiner Oozyten verloren. Die genaue Anzahl variiert in der Literatur von 266,000 [9] bis 2 Millionen [10]

IV. Phase der Follikelformation

Die Bildung der Follikel beginnt um die 14.-20.SSW durch einwandernde Blutgefäße und perivaskuläre Zellen im Bereich des ovarialen Cortex wobei immer kleinere Abschnitte und schließlich die Oozyten, die bereits die erste Reifeteilung vollendet haben, umschlossen werden. Die daraus entstandene Einheit- Oozyte in der Prophase der 1. Meiose, umgeben von

einer einzelnen Lage Prä-Granulosazellen sowie von einer Basalmembran- wird als Primordial Follikel bezeichnet.

Sobald die Oozyte von den Prä-Granulosazellen umgeben ist, können noch verschiedene Reifungsschritte folgen, bevor der Follikel in seine Ruhephase tritt. Hierzu gehören die Vergrößerung des Zytoplasmas, eine exzentrische Anordnung des Zellkernes und die Bildung mehrerer Lagen von Granulosazellen. Gelegentlich (im 3. Trimenon) lässt sich auch eine kleine Lage Theca-Zellen nachweisen. Das Ergebnis dieser Reifung ist der Primärfollikel.

Im weiblichen Neugeborenen sind somit sämtliche Follikel bereits angelegt, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien zwischen dem Primordialfollikel und einem bereits einen vollständig ausgebildeten Primärfollikel befinden. In diesem Zustand verbleiben die Follikel bis zum Erreichen der Geschlechtsreife.

Obwohl bereits in der Fetalphase der typische Zyklus der erwachsenen reproduktiven Lebensspanne mit der Formation von Follikeln, unterschiedlicher Ausreifung und Atresie erfolgen, kommt es jedoch nicht zur vollständigen Reifung im Sinne einer Ovulation. Auch die Produktion von Östrogenen lässt sich erst in der Spätschwangerschaft im Rahmen der Follikelreifung nachweisen.

Für Übersichtsarbeiten zur Entwicklung des fetalen Ovars siehe [9, 11-13]

1.2. Plazenta

Parallel zur Entwicklung des Embryos bildet sich die Plazenta aus. Nach Nidation der befruchteten Eizelle kommt es zu einer Invasion der Syncytiotrophoblasten in das mütterliche Gewebe. Dieser Prozess der Trophoblasteninvasion in die Dezidua und das Myometrium ist um die 18. SSW abgeschlossen. Die Proliferation der Cytotrophoblasten und zeitgleich das absolute Wachstum der Plazenta hört später im Verlauf der Schwangerschaft etwa um die 35. SSW auf. [14]

Die Plazenta spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Ungeborenen. Sie sichert den Stoffaustausch zwischen dem Ungeborenen und der Mutter, erscheint aber auch mitbeteiligt an dem Schutz des Embryos vor der Immunabwehr der Mutter.

Die humane Plazenta war eines der ersten Gewebe in denen TGF- β nachgewiesen werden konnte [15]. Über welche Mechanismen TGF- β an den oben aufgeführten Prozessen beteiligt sein könnte, war zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht eindeutig geklärt.

Aus den Arbeiten von Gorivodsky et al., 1999 [16] und Clark et al., 1990 [17] ergeben sich Hinweise darauf, dass TGF- β 2 in der fetalen Plazenta den Embryo vor der Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem schützt.

Aber auch bei der Regulation des invasiven Wachstums der Plazenta könnte TGF- β 1 beteiligt sein. Denn parallel zu dem Wachstumsverlauf der Plazenta mit den beiden Wachstumseinschnitten um die 17. bzw 34. SSW konnte auch jeweils am Ende dieser Wachstumsperioden ein Gipfel der Expression von TGF- β 1 insbesondere in den Syncytiotrophoblasten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass TGF- β in die Regulation dieser Mechanismen mit eingebunden sein könnte [14] [18]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TGF- β an der Kontrolle sowohl der Proliferation [19] als auch der Invasion [20] der extravillösen Trophoblasten beteiligt ist.

Aber auch durch direkte intrazelluläre Mechanismen im Rahmen des Zell Zyklus und zusätzlich durch indirekte Mechanismen scheint TGF- β das Wachstum und die Proliferation der Plazenta zu regulieren [8]. TGF β spielt auch eine aktive autocrine und / oder paracrine Rolle in der Regulation der der Plazentaentwicklung [21, 22].

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lag noch keine Studie vor, die TGF- β 3 und die zelluläre Verteilung der TGF- β Rezeptoren RI und RII in humaner Term-Plazenta darstellen konnte [4, 5].

Die vorhandenen Studien haben sich auf TGF- β 1 und TGF- β 2 fokussiert und konnten die beiden Wachstumsfaktoren überwiegend in den Syncytiotrophoblasten und in den extravillären Trophoblasten nachweisen. Um TGF- β Signale weiterzuleiten sind die zwei Rezeptoren TGF- β RI und TGF- β RII notwendig. Das bedeutet dass beide Rezeptoren nachgewiesen werden müssen um die Zielzellen von TGF- β zu erkennen. Für Plazentagewebe des ersten Trimenons gibt es bereits eine Arbeit von Ando et al [23].

In dieser Arbeit erweitern wir diese Informationen mit Daten zur Plazenten zum Geburtstermin.

1.3. TGF- β ein pleiotroper Wachstumsfaktor

Als Wachstumsfaktoren bezeichnet man eine Gruppe verschiedener Proteine, die das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Zell-Zell Kommunikation regulieren. Auch wenn der genaue Wirkungsmechanismus bislang nicht eindeutig geklärt ist, können Wachstumsfaktoren aufgrund von strukturellen und funktionellen Unterschieden in mehrere Superfamilien eingeteilt werden.

Als Beispiele verschiedener Superfamilien mit ihrer strukturellen Besonderheit können genannt werden:

a) Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, wie Wachstumshormone, Interleukin (IL)-2, IL-4, und Granulozytenstimulierender Faktor (G-CSF). Alle dieser Faktoren weisen ein Vier-Helix-Bündel als Motiv auf.

b) β -trefoil (deutsch beta-Kleeblatt) Familie, wie Interleukin (IL)-1 β , IL-1 α , Fibroblastenstimulierender Faktoren (FGF) und Keratinozyten Wachstumsfaktoren (KGF).

Diese Mitglieder teilen alle eine gängige β -Kleeblatt Faltung.

c) Epidermaler Wachstumsfaktoren ähnliche Faktoren, wie Epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) und Transformierender Wachstumsfaktor alpha (TGF- α).

Diese Mitglieder haben eine Immunglobulin-artige Domäne in ihrer Struktur.

d) Mit Hilfe der Auflösung der Kristallstrukturen von Wachstumsfaktoren konnte eine weitere Superfamilie identifiziert werden, die nach dem ersten zu dieser Gruppe zugeordnetem Mitglied Transformig growth factor- β benannt wurde. Als Gemeinsamkeit besitzen sie ein ungewöhnliches Arrangement aus sechs Zystein-Molekülen, verbunden zu einer „Zystein-Knoten“ Konformation, jeweils in einer äquivalenten topographischen Position.

Die aktive Form dieser Proteine sind Dimere, entweder Homo- oder Heterodimere. Deutliche Unterschiede zeigen sie jedoch in der Bindungsstelle, welche den Dimer aus den zwei Monomeren bildet. Auch in ihrer Sequenz weisen die verschiedenen Mitglieder nur eine sehr geringe Sequenzhomologie aus, meist unter 40%. Im Vergleich dazu haben die TGF- β Isoformen 1-3 untereinander eine Sequenzhomologie zwischen 70-80 %. Sie konnten in Zellen und/oder Zellflüssigkeiten unterschiedlichster Lebewesen, von der Drosophila bis zum Menschen mit zum Teil sehr unterschiedlichen biologischen Effekten nachgewiesen werden.

Zu den Mitgliedern dieser TGF- β Superfamilie zählen mehr als zwanzig Moleküle, einschließlich TGF- β , Inhibin, Activin, Müllerian inhibiting substance, Bone morphogenic

proteins (BMP-2-7), das decapentaplegic gene complex (DPP-C), ein growth-differentiation factor (GDF-1) und dorsalin-1 (dsl-1)[8].

Die Entdeckung von TGF- β 1 als ein eigenständiges Molekül gelang, unabhängig von einander in zwei Laboratorien, erstmalig 1981 durch Michael Sporn und Harold Moses. Dieser neu entdeckte Faktor hatte die Fähigkeit, dass verankerungsunabhängige Wachstum von normalen Ratten Fibroblasten in Anwesenheit von Epidermal Growth Factor (EGF) zu steigern [24]. Aus humaner Plazenta konnte TGF- β erstmals 1983 gewonnen werden [15]. Bis heute sind fünf Isoformen von TGF- β (TGF- β 1-5) isoliert worden, wobei die aktiven Formen eine 64-82% Sequenzhomologie aufweisen. TGF- β Isoformen sind ubiquitär vorkommende Peptide, die in nahezu jeder Zelle eines Organismus anzutreffen sind. In Säugetieren konnten bislang nur die Isoformen TGF- β 1-3 nachgewiesen werden. Ihre korrespondierenden Gene liegen für jede Isoform auf einem unterschiedlichem Chromosom: TGF- β 1 auf 19q13, - β 2 auf 1q41 und - β 3 auf 14q24.

Im Folgenden werden die für Säugetiere relevanten Isoformen (TGF- β 1-3) besprochen.

1.3.1. Struktur

Die biologisch aktive Form aller TGF- β Isoformen ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 25 kd. Die beiden Monomere (je 112 Aminosäuren) werden durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Eine Zerstörung dieser Disulfidbrücken, z.B. durch Reagenzien wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, führt zu einer Inaktivierung von TGF- β . Die TGF- β Vorläufer haben eine Länge von etwa 400 Aminosäuren. Sie beinhalten eine N-verbundenes Glykolisierungsareal außerhalb der bioaktiven Domäne und am N-terminalen Ende eine hydrophobische Signalsequenz für den Transport in das Endoplasmatische Reticulum (ER) und somit zur Exocytose. Die bioaktive Domäne ist am C-terminalen Ende des Vorläufers lokalisiert, dem eine Sequenz aus vier basischen Aminosäuren voraus geht. Eine proteolytische Spaltung an dieser Stelle findet intrazellulär erst nach der Dimerisation der Vorläufer statt.

1.3.2. TGF- β Aktivierung

Der inaktive TGF- β Monomer besteht aus einem N-terminalen und einem C-terminalen Region. Die N-terminale Pro-Region der Vorläufer von TGF- β spielt in der Synthese der

Faktoren eine wichtige Rolle. Diese Pro-Region sorgt für die korrekte Faltung und Disulfidbindung der bioaktiven Domäne während der TGF- β Synthese zu einem Homodimer [25]. Im Gegensatz zu Pro-Regionen anderer Proteine, bleibt die TGF- β Pro-Region auch nach der proteolytischen Spaltung nicht-covalent mit der bioaktiven Domäne (der C-terminalen Region) verbunden.

Die N-terminale Region des biologisch inaktiven TGF- β Dimer wird als β -LAP (latency associated peptide) bezeichnet. Diese nicht-kovalente Bindungen des β -LAP mit der C-terminalen Region des Vorläufers, welche das aktive TGF- β darstellt, bezeichnet man als sogenannten kleinen latenten Komplex (L-TGF- β), wobei jeder Komplex als Dimer vorliegt. Der L-TGF- β besitzt ein Molekulargewicht von etwa 100kD.

Es finden sich jedoch auch Zellen (z.B. aktivierte Thrombozyten), die TGF- β als latenten Komplex mit einem Molekulargewicht von 235 kD freisetzen das sogenannte LL-TGF- β (larger latent complex). In diesen Zellen findet sich ein zusätzliches Protein, das latent TGF- β binding protein (LTBP) mit einem Molekulargewicht von 125 bis 169kD, welches an das β -LAP mittels Disulfidbrücken bindet. Dieses Protein ist nicht notwendig für die Ausbildung der latenten Form, es scheint jedoch die Sekretion des LL-TGF- β zu fördern. Wird L-TGF- β bzw. LL-TGF- β sezerniert, ist das TGF- β biologisch inaktiv, da der Faktor so nicht an Rezeptoren der Zelloberfläche binden kann.

In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass die latente Form von TGF- β durch Ansäuerung, Alkalisierung, Hitze und Harnstoff aktiviert werden kann, und zwar über die Spaltung der nicht-covalenten Bindung der N-terminalen Region. Da eine azidische Mikroumgebung auch in-vivo existiert (z.B. in Osteoklasten und aktivierten Macrophagen), könnte dieses mitbeteiligt sein an der Aktivierung von TGF- β . Es gibt Hinweise auf einen enzymatischen Prozess, z.B. durch Plasmin oder Sialidase, der zu einer Aktivierung führt. Der genaue physiologische Mechanismus ist aber weiterhin unbekannt.

Aus Übersichtsarbeiten zu Struktur und Aktivierung von TGF- β , siehe:[26-28]

Der hier beschriebene komplexe Prozess der Bildung des durch Disulfidbrücken verbundenen Dimers, mit Abspaltung des N-terminalen Endes, als Notwendigkeit um TGF- β zu aktivieren deutet auf die Notwendigkeit einer exakten Regulierung der TGF- β Aktivität hin. Der latente TGF- β Komplex könnte unter anderem als Regulator für den Zugang der Zelle zu TGF- β dienen oder auch den zu schnellen Verbrauch verhindern, da aktives TGF- β lediglich eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten besitzt.

1.4. TGF- β Rezeptoren (TGF- β R)

Die aktiven Formen von TGF- β entfalten ihre Wirkung über die Bindung an membranständigen Rezeptoren der Zielzellen. Bislang sind drei Rezeptoren charakterisiert worden, die spezifisch TGF- β Isoformen erkennen: TGF- β RI mit einem Molekulargewicht von 53 kD und TGF- β RII mit einem Molekulargewicht von 70-80 kD. Beide Rezeptoren besitzen eine Serin/Threonin Kinase [29] und werden zur Signalübermittlung benötigt, wobei sie einen heteromeren Komplex bilden [30].

Ein weiterer Rezeptor, als TGF- β RIII oder auch Betaglykan bezeichnet, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 300 kD. Er besteht aus einem "Core Protein", welches in Verbindung mit einem großen Proteoglykan mit dazu beiträgt die TGF- β Isoformen den TGF- β RI und RII zu präsentieren [31]. Dieser Rezeptor besitzt keine funktionelle cytoplasmatische Domäne [26].

In bestimmten Zelltypen konnten eine Reihe weiterer membrangebundener TGF- β Bindungsproteine nachgewiesen werden wie zum Beispiel eine Klasse Isoform-spezifischer Bindungsproteine an Ratten Glomeruli [27, 32].

Für die Signalübermittlung sind mindestens zwei Rezeptoren, TGF- β RI und TGF- β RII notwendig [28, 33]. Die beiden notwendigen Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Liganden zu binden. Der Rezeptor Typ II für TGF- β erkennt diese Liganden frei im Medium, wohingegen der Rezeptor Typ I den Komplex aus TGF- β mit dem Rezeptor Typ II erkennt und mit diesem einen oligomeren Komplex bildet. Ein zentrales Ereignis der Signalübermittlung durch diesen Komplex ist die Phosphorylierung des Typ I Rezeptors. Dieser Schritt wird höchstwahrscheinlich durch den Typ II Rezeptor katalysiert, dessen Kinase die Voraussetzung ist für die Phosphorylierung innerhalb der Zelle. Die Aktivität der Rezeptor Typ II Kinase scheint dabei durch die Bindung an seinen Liganden nicht verstärkt zu werden. Vereinfacht dargestellt fungiert der Ligand -TGF- β - als Vermittler, welcher das Substrat- den Rezeptor Typ I - zu der primären Kinase des Rezeptors Typ II führt [28]. Innerhalb der Zelle werden nun durch den Liganden-Rezeptor Komplex signalspezifische SMAD Proteine phosphoryliert [34]. Nach Transport in den Nukleus aktivieren sie die Transkription von Genen, zum Einen durch die Assoziation mit DNA-gebundenen Faktoren oder durch direkte Bindung an DNA Promotor Elementen.

Alle signalspezifischen SMAD Proteine, für TGF- β sind dies SMAD 2 und 3, besitzen die Fähigkeit mit SMAD 4 zu interagieren. SMAD 4 wiederum ist identisch mit einem Tumorsuppressor (DPC4), der häufig z. B. bei Pancreascarcinomen fehlt oder als Mutation

vorliegt [35]. In diesem Fall wird somit der antiproliferative Effekt von TGF- β verhindert [36]. Diese Signalkaskade weist bereits auf die große Bedeutung von TGF- β für die Regulation der Proliferation hin.

1.5. Biologische Effekte von TGF- β

1.5.1. Immunmodulatorische Effekte

TGF- β wirkt nicht nur auf die Gewebeentwicklung und Differenzierung sondern ist ein wichtiger Immunmodulator mit überwiegend immunsuppressiver Wirkungen [37]. Im Vordergrund steht hier unter anderem die Blockierung der Proliferation von Thymozyten sowie T- und B-Lymphozyten durch TGF- β 1 und - β 2. Allen TGF- β Isoformen wird in der Entwicklung der immunologischen Toleranz eine zentrale Bedeutung zugewiesen [38]. Aber auch immunstimulierende Wirkungen sind bekannt, da TGF- β 1 die Sekretion von IgA, der dominierenden Immunglobulin Isoform in Schleimhautsekreten, fördert [39]. Die Effekte der Immuntoleranz können in der Plazenta von Bedeutung sein, da die Immuntoleranz des mütterlichen Organismus gegenüber dem Feten eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft darstellt. Da in dieser Arbeit aber die entwicklungsbiologischen Aspekte im Vordergrund stehen, werden die immunologischen Effekte von TGF- β nicht weiter ausgeführt.

1.5.2. Effekte auf die Gewebeproliferation

Anfang der 80 Jahre wurde erstmalig beschrieben, dass TGF- β in der Lage ist das Wachstum epithelialer Zellen zu hemmen [40]. Bis heute sind eine Reihe von verschiedenen Wirkungen und Wirkungsmechanismen, z. B. auf die Zellproliferation, die Extrazelluläre Matrix (ECM) oder die Immunsuppression, von TGF- β beobachtet worden. Zum Teil werden dabei gegensätzlichen Effekt je nach Spezies, Zellpopulationen oder auch Entwicklungsstadien berichtet.

So konnten Hill et al [41] demonstrieren, dass TGF- β 1 humane fetale Fibroblasten von Feten mit einem Gewicht von weniger als 50 g stimuliert, den gleichen Zelltyp in Feten über 100g

Körpergewicht jedoch inhibiert. Die überwiegende Mehrzahl der Zellen wird durch TGF- β in ihrem Wachstum inhibiert, als gut untersuchtes Beispiel gilt hier der Keratinozyt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TGF- β 1 sowohl reversibel die Proliferation bestimmter epithelialer Zellen in Maus Brustdrüsen als auch die Regeneration von Ratten-Hepatozyten nach partieller Heparektomie hemmt. In ihrem Wachstum gefördert werden hingegen nur wenige Zellen. Als Beispiel seien hier Schwannsche Zellen sowie Osteoblasten zu nennen. Diese bifunktionale Wirkung von TGF- β findet sich auch im Rahmen der Zelldifferenzierung. Beispiele sind der förderndem Einfluss auf die Differenzierung humaner Bronchialepithelzellen während auf Ratten Myoblasten ein hemmender Effekt nachgewiesen wurde [8].

Noch nicht bekannt ist zum jetzigen Zeitpunkt der genaue Mechanismus der dazu führt, dass eine Überexpression von TGF- β einen supprimierenden Einfluss auf die Entwicklung von Brusttumoren bei Mäusen ausübt [42].

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Wirkung von TGF- β ist sein Einfluss auf die Extrazelluläre Matrix (ECM) [43]. Es konnte demonstriert werden, dass TGF- β 1 und - β 2 die Bildung der einzelnen Bestandteile der ECM fördert. Diese spielt mit ihren einzelnen Komponenten wie Glycoprotein, Collagen, Fibronectin, Proteoglycanen und Glykosaminen eine wesentliche Rolle im Rahmen der Zell-Zellinteraktionen. Diese Interaktionen kontrollieren ihrerseits die Migration von Zellen und den morphologischen Aufbau des Gewebes. Somit ist die ECM ein bestimmender Faktor in der Embryogenese, in Reparaturvorgängen sowie im Zuge invasiven Tumorwachstums.

Bislang sind vier unterschiedliche Wege bekannt auf denen TGF- β die ECM-Synthese fördert:

- a) Die Synthese einzelner ECM-Komponenten wird durch TGF- β gefördert,
- b) Die Synthese von Protease Inhibitoren wird erhöht und
- c) die Synthese von Proteasen wird reduziert.
- d) die Synthese von Integrinen wird induziert.

Durch die TGF- β Effekte steht mehr Substrat für den Aufbau zur Verfügung, während durch die verminderte proteolytische Spaltung der ECM Komponenten der Abbau reduziert wird. Die Integrine sind heterodimere membranständige Rezeptoren, welche zur Vernetzung der Zellen der ECM erforderlich sind.

Aber auch dieses System ist nicht von der Bifunktionalität des TGF- β ausgeschlossen. So konnte in Hühnerchondrozyten eine Hemmung des Collagen Typ II und in Osteosarkoma Zelllinien eine verminderte Synthese der α 3 Integrin Untereinheit demonstriert werden [27].

1.5.3. Die Effekte von TGF- β in der Organentwicklung

Im Bereich Reproduktion und Entwicklung erscheinen homozygote TGF- β Knockout Mäuse zum Zeitpunkt der Geburt zunächst phänotypisch unauffällig. Etwa drei Wochen post partum entwickeln sie jedoch ein ausgeprägtes allgemeines Krankheitssyndrom, welches durch eine multifokale entzündliche Zellinfiltration gekennzeichnet ist und zum Tode führt [44]. Betroffenen sind Organe wie Herz, Magen, Leber, Lunge, Pancreas, Speicheldrüsen und längsgestreifte Muskulatur [45]. Neben diesem inflammatorischen Geschehen gibt es Hinweise, die auf Störungen der Reproduktionsfähigkeit und der embryonalen Entwicklung lebender homozygoter TGF- β knockout Mäuse hinweisen [46].

Die Wirkung von TGF- β auf Stammzellen konnte in Zellkulturexperimenten demonstriert werden. Dabei zeigte sich, dass TGF- β 1 die Proliferation von primordialen Stammzellen hemmt, welche 8,5 Tage post coitum (p.c.) aus Mäuseembryonen isoliert worden sind. Der chemotropische Effekt in Kultur befindlicher Keimleisten auf primordialen Stammzellen wird durch Antikörper gegen TGF- β 1 blockiert und TGF- β 1 ist in der Lage diesen chemotropischen Effekt nachzuahmen [47]. Diese Beobachtungen geben Hinweise, dass TGF- β einer der Faktoren sein könnte, welche die Migration primordialer Keimzellen in die Gonaden regulieren.

Außerdem ist TGF- β in der Lage akute reversible Phänotyp-Transformationen einiger Säugetierzellen zu induzieren [48]. Weitere Studien konnten zeigen, dass TGF- β in vielen Zell- Zell Interaktionen sowohl im Rahmen der Embryonalentwicklung als auch an der fetalen Organogenese beteiligt ist [7, 8, 46].

Eine Auswahl der Effekte von TGF- β auf verschiedene Gewebe gibt Tabelle 1:

Tabelle 1

System	Negativ	Positiv	Quelle
Zellproliferation	Epithelwachstum		[27]
	einige Fibroblasten	einige Fibroblasten	
	humaner Fetus >100g	humaner Fetus <50g	
	Kreatinozyten	Osteoblasten	
	Zelldifferenzierung	Zelldifferenzierung	
ECM	Inhibition Collagen Typ II Synthese	Synthese ECM	[27]
		Synthese von Proteaseninhibitoren	[8]
		Synthese von Integrinen	[8]
Immunsuppression	Proliferation von Thymuszellen, T-, B- Lymphozyten	IgA Synthese	[27]
	lymphokin aktivierte Killerzellen		[49]
Endokrin	Freisetzung von FSH	Steroidproduktion	[50]

1.5.4 . Wirkung von TGF- β im Ovar

Der Nachweis von TGF- β in humanen Ovarien erfolgte erstmalig 1992. Die Isoformen konnten in unterschiedliche Ausprägung in Granulosa-, Thecazellen und in Oocyten nachgewiesen werden [51].

Es ist bekannt, dass die Mitglieder der TGF- β Superfamilie, inklusive der drei TGF- β Isoformen, in erwachsenen Ovarien exprimiert werden. Eine TGF- β Expression konnte in Oozyten, Theca-Zellen, kleinen Luteal-Zellen und in Östrogen-stimulierten Ratten Granulosazellen nachgewiesen werden [52]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die TGF- β Isoformen verschiedene Effekte auf die Follikelentwicklung ausüben. Sie sind beteiligt an der Regulation der Granulosa-Zell Proliferation [53], der Bildung von Steroiden [50] und der Reifung von Oozyten während der Follikelentwicklung [54]. TGF- β induziert ebenfalls die Synthese von FSH-Rezeptoren in Granulosazellen [55].

Ein Überblick über die wichtigsten Wirkungen von TGF- β in den verschiedenen Zelltypen der Ovarien gibt die folgende Tabelle 2:

Tabelle 2

Zelltyp	Negative Wirkung	Positive Wirkung	Autor
Granulosa Zellen	Steroidhormonsynthese kein Effekt	Steroidhormonsynthese kein Effekt	[50]
	LH-Rezeptoren Anzahl (in Anwesenheit einer suboptimalen FSH Konzentration)	LH-Rezeptoren Anzahl (in Anwesenheit einer optimalen FSH Konzentration)	[56, 57]
	FSH-Wirkung	FSH-Wirkung	[56]
		EGF-Rezeptoren (Anzahl)	[58]
		Amplifikation der cAMP-Wirkung	[56, 58]
Theca-Zellen	Steroidbildung		[50]
Oocyten		Meiotische Reifung	[54]
		Meiosis	[54]
Primordial germ cell (PGC)	Proliferation	Chemotropischer Effekt auf die Keimleiste	[47]

Intensiv wird bislang die Expression und die Wirkung von TGF- β in postnatalen Ovarien erforscht. Über die Rolle von TGF- β während der humanen fetalen Entwicklung ist jedoch nur sehr wenig bekannt.

1.5.5. Wirkung von TGF- β in der Entwicklung der Plazenta

TGF- β spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung der Trophoblasten an der humanen fetal-mütterlichen Grenzfläche [19]. TGF- β scheint dabei eng in die Regulation der Invasion von Trophoblasten in die Plazenta während des ersten Trimenons eingebunden zu sein [20]. Im Plazentagewebe produzieren die extravillösen Trophoblasten große Mengen an Komponenten der ECM. Da die Regulation der Ausbildung der ECM wie unter 1.5.2. dargestellt auch von TGF- β beeinflusst wird, kann angenommen werden, dass auch die Reifung der Plazenta von TGF- β wesentlich beeinflusst werden könnte.

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zu Beginn der Arbeiten stand die Hypothese, dass das pleiotrophe TGF- β bei der Reifung des fetalen humanen Ovars von Bedeutung sein könnte.

Es war bereits bekannt, dass TGF- β sowohl für die Regulation der Oozytenreifung im adulten Ovar als auch bei der Steuerung der embryonalen und fetalen Entwicklung zahlreicher Organe eine zentrale Bedeutung besitzt [7, 8]. In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher die Hypothese geprüft werden, dass TGF- β auch bei der Reifung des fetalen humanen Ovars von Bedeutung ist.

Zu diesem Zweck wurde die Expression der TGF- β Isoformen und ihrer Rezeptoren in einem ersten Projekt in verschiedenen Entwicklungsstadien des humanen fetalen Ovars untersucht. Hierfür wurden Proben aus terminierten Schwangerschaften zwischen der 11. bis 24. SSW verwendet. Sowohl Transkription als auch Expression von TGF- β 1-3 sowie deren Rezeptoren RI und RII wurden durch die Bestimmung der messenger-RNA und den immunhistochemischen Proteinnachweis in humanen fetalen Ovarien zwischen der 11. und 24 SSW untersucht.

Außerdem fragten wir, ob die Plazenta, am Geburtstermin ebenfalls die drei TGF- β Isoformen und die zur Signalübermittlung notwendigen Rezeptoren exprimiert. Dieses wurde mit den gleichen Methoden wie im fetalen humanen Ovar untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Gewebeproben

Menschliche fetale Ovarien in einem Gestationsalter von 11 bis 24 Wochen wurden von intakten vorzeitig beendeten Schwangerschaften gewonnen. Das Gestationsalter wurde mit Hilfe der letzten Regelblutung sowie der Schädel-Steißlänge bestimmt. Bei Feten in einem Alter von 12 Wochen oder jünger wurde das Geschlecht mittels X- und Y-Chromosom PCR bestimmt, wie bei Witt und Erickson [59] beschrieben. Bei Feten ab der 13. Woche wurde das Geschlecht morphologisch bestimmt. Für jede untersuchte Altersgruppe wurden mindestens zwei verschiedene Feten untersucht.

Humanes Plazentagewebe wurde von regel- und zeitgerechten Entbindungen gewonnen.

Sofort nach Präparation der Gewebe wurden diese auf Eis gelagert, in eiskalter Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit Hilfe eines Präpariermikroskop von Binde- und Fettgewebe befreit. Die Extraktion der RNA wurde innerhalb 1 Stunde nach Erhalt der Ovarien durchgeführt oder das Gewebe wurde sofort bei -70°C eingefroren. Für die Immunhistochemischen Untersuchungen wurde das Gewebe im Anschluss an die Formalin Fixierung in Paraffin eingebettet. Die Verwendung der humanen Gewebe war von dem Human Research Committee of Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA, genehmigt worden.

3.2. Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
ABC Kit	Vector Laboratories, Bulingame, CA, USA
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, ME; USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP) (2,5 mM)	GibcoBRL, Grand Island, NY, USA
DAB Substrate kit (3,3'-diaminobenzidine)	Vector Laboratories, Bulingame, CA, USA
DTT (0,1 M)	GibcoBRL, Grand Island, NY, USA
Ethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ethidium Bromid	Sigma, St. Louis, MO, USA
first strand reverse transctiption Buffer, 5X	GibcoBRL, Grand Island, NY, USA
L Taq-DNA polymerase (5U/ μ L)	GibcoBRL, Grand Island, NY, USA
Mg ⁺⁺ (50 mM)	Sigma, St. Louis, MO, USA
oligo(dT) (1 μ / μ L)	Pharmacia Biotech, Piscataway, NY, USA
PCR buffer	GibcoBRL, Grand Island, NY; USA
Phosphat gepufferten Salinlösung (PBS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Primer für PCR	Oligos Etc., Wilsonville, OR, USA
Restriktionsenzyme Nci I, Hind III, Eco RI, RcaI, Pst I	Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA
Rnasin (40.000 U/ml)	Promega, Madison, WI, USA
Select Spin Columns	5Prime-3Prime, Inc., Boulder, CO, USA
Superscript Reverse Trascriptase (200U/ μ L)	GibcoBRL, Grand Island, NY, USA
TRIZOL®	GibcoBRL, Grand Island, NY, USA
Vectastain ABC kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA
Xylene	Sigma, St. Louis, MO, USA

Antikörper	Bezugsquellen
Anti-Human Polyklonale Kaninchen Antikörper TGF- β 1 Cat#:sc-146,	Santa Cruz, CA, USA
Anti-Human Polyklonale Kaninchen Antikörper TGF- β 2 Cat#: sc-090	Santa Cruz, CA, USA
Anti-Human Polyklonale Kaninchen Antikörper TGF- β 3 Cat#: sc-082	Santa Cruz, CA, USA
Anti-Human Polyklonale Kaninchen Antikörper TGF- β RI Cat#: sc-398	Santa Cruz, CA, USA
Anti-Human Polyklonale Kaninchen Antikörper TGF- β RII Cat#: sc-400	Santa Cruz, CA, USA
Ratten IgG	Sigma, St. Louis, MO, USA

Geräte	Bezugsquellen
Programmable Thermal Controller PCT-100	MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA
Microscope	Bx40, Olympus
Spectrophotometer	DU-64, Beckmann

3.3. Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Unter Verwendung von TRIZOL® wurde die gesamte RNA aus fetalen Ovarien gesunder Schwangerschaften in einem Gestationsalter von 11,12,14,16 und 18 bis 23 Wochen sowie aus Plazentaprobe gewonnen. Die Konzentration der RNA wurde über ein Spectrophotometer bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt.

Diese aus den Ovarien und Plazenten gewonnene RNA wurde, wie im folgendem beschrieben, als Ausgangsprodukt für die Gewinnung von komplementärer DNA (cDNA) verwendet:

Ein Mikrogramm oligo(dT) (1µ/µl) wurde als Primer für jede Reverse Transkriptions Reaktionsansatz benutzt. Ein µg von der gesamt RNA und oligo(dT) wurde in einem Endvolumen von 17µl für 2 Minuten auf 68°C erhitzt und anschließend für 5 Minuten auf 25°C gekühlt (Programmable Thermal Controller PCT-100). Diesem mRNA und oligo(dT) Gemisch wurden 4 µL 5X first strand reverse transcription Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl 2,5 mM deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP), 1 µl Superscript Reverse Trascriptase (200U/µL) und 1 µl Rnasin (40.000 U/ml) in einem Endvolumen von 29µl zugefügt. Diese Mischung wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch ein 10 minütiges Erhitzen auf 68°C beendet und die so gewonnene cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Bei jedem Versuchsdurchlauf wurde Hefe transfer RNA (tRNA) als Negativkontrolle benutzt.

Die Primer für die PCR wurden abgeleitet von den cDNA Sequenzen für TGF-β1,-β2,-β3, RI und RII.

TGF-β1 wurde amplifiziert mittels des PCR primers (5'-(1575) GAGGTGACCTGGCCACCATTCAT (1597)-3' und 5'(1749) TCCGCAAGGACCTCGGCTGG (1768)-3') mit einer daraus resultierender Fragmentlänge von 194bp [60] (GenBank No. X02812).

TGF-β2 wurde amplifiziert mittels des PCR Primers (5'-(912)ACTTTCTACAGACCCTACTT (931)-3' und 5'-(1316) GCCATCAATACCTGCAAATC (1297)-3') mit einer daraus resultierender PCR Fragmentlänge von 405 bp [61], GenBank No. M19154) .

TGF-β3 wurde amplifiziert durch die PCR Primer (5'-(623) CCTAAAGGAATTACCTCCAA (642)-3' und 5'-(993) TCCATCACCTCGTGAATGT (975)-3') mit einem resultierendem Fragment in einer Länge von 372 bp (15, GenBank No.

X14149). (Anmerkung: Die Primer Sequence und die resultierende Fragmentlänge von 372 bp für TGF- β 3 wurde von Nishida et al [61] übernommen und als korrekt angenommen auch wenn die Fragmentlänge laut Sequenz von TGF- β 3 aufgezeichnet in GenBank No. X14149 371 bp beträgt).

TGF- β RI wurde amplifiziert mit den PCR Primer (5'-(1268) CGTGCTGACATCTATGCAAT (1287)-3' und 5'-(1519) AGCTGCTCCATTGGCATAC (1501)-3' mit einer daraus resultierenden Fragmentlänge von 244 bp [62] (GenBank No. L11695).

TGF- β RII wurde amplifiziert mit den PCR Primer (5'-(510) TCCACCTGTGACAACCCAGAAA (525)-3' und 5'-(827) TATGACTAGCAACAAGCAGG (807)-3') mit einem daraus resultierendem Fragment von 318 bp Länge [63] (GenBank, No. M85079). Die genannten Primer waren speziell dafür konzipiert um einmalige Sequenzen jedes untersuchten Wachstumsfaktors und Rezeptors zu amplifizieren.

Für die cDNA Amplifikation durch die PCR wurden 5 μ l von der reverse-transkribierten cDNA benötigt, zusammen mit 5 μ l PCR buffer, 3 μ l 50 mM Mg⁺⁺, 4 μ l 2,5 mM dNTP, 0,13 μ l Taq-DNA polymerase (5U/ μ l), 5 μ l Sense und Antisense Primer (100 μ l/ml) in einem Endvolumen von 50 μ l verarbeitet. Komplementäre DNA von Plazentagewebe wurde als positive Kontrolle, Hefe tRNA und Wasser als negative Kontrollen in jedem Zyklus verwendet. Vierzig Zyklen der folgenden Thermozyklus Konditionen wurden benutzt: 94°C für 30 Sekunden, bei 55°C für 2 Minuten, 72°C für 1 Minute erhitzt. Die amplifizierten DNA Fragmente wurden ohne weitere Reinigung über Elektrophorese mit 4% Agarose Gel analysiert und mit Hilfe einer Ethidium Bromid Färbung visualisiert.

Für den enzymatischen Verdau zur Bestätigung der Identität der aus den fetalen Ovarien gewonnen PCR Fragmente wurden die PCR Produkte mit Select Spin Columns gereinigt. Zehn μ l des gereinigten PCR Produktes wurden mit Restriktionsenzyme und dem passenden Puffer für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Für TGF- β 1 spaltet das Restriktionsenzym Nci I das Fragment in 104 und 90 bp; für TGF- β 2 spaltet Hind III das Fragment in 305 und 100 bp; für TGF- β 3 spaltet Eco RI das Fragment in 293 und 79 bp; für RI spaltet das Restriktionsenzym RcaI das Fragment in 176 und 68 bp und für RII spaltet Pst I das Fragment in 278 und 40 bp. Die Endprodukte des Verdaues wurden anschließend auf 4% Agarose Gel analysiert.

3.4. Immunohistochemie

Von jedem Gewebeblock (n=16 Ovarien: n=2 für 11 und 12 Wochen; n=14 für 14 bis 24 Wochen bzw. n=10 Plazenten) wurden 8µm dünne Paraffinschnitte gewonnen. Diese Gewebeschnitte wurden zunächst mit Xylen und absteigenden Konzentrationen von Ethanol deparaffiniert und anschließend mit PBS gespült. Die Antikörper (Anti-Human Polyklonale Kaninchen Antikörper, Santa Cruz, CA; USA; Cat#: TGF-β1:sc-146, TGF-β2:sc-090, TGF-β3:sc-082, TGF-β RI:sc-398, TGF-β RII:sc-400) wurden mit 0,5% Bovinen Serum Albumin (BSA) in PBS zu einer endgültigen Konzentration von 1,5µg/ml für TGF-β1,-β2 und -β3 sowie von 1,0µg/ml für RI und RII verdünnt. 50 µl (Ovarien) bzw. 100µl (Plazenta) der entsprechenden Antikörper Lösung wurden auf die einzelnen Gewebeschnitte aufgetragen. Nach Angabe des Herstellers besteht keine Kreuzaktivität zwischen den verwendeten Antikörpern. Als Negativkontrolle wurde Kaninchen IgG als erster Antikörper unter sonst identischen Bedingungen auf die Schnitte aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte von menschlicher Plazenta verwendet [19]. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Schnitte mit PBS für 10 Minuten gespült. Anschließend wurden 50µl (Ovarien) bzw. 100µl (Plazenta) Biotin markiertes Ziegen anti-Kaninchen IgG (Vectastain ABC kit and peroxidase substrate kit DAB) auf die Schnitte appliziert und diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem 5 minütigem Spülen mit PBS (2x) wurde 50µl (Ovarien) bzw. 100µl (Plazenta) Avidin DH/Biotinylated Enzyme Lösung (ABC kit) auf die Schnitte aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einer Spülung mit PBS für 5 Minuten (2x) wurde Diaminbenzidine (DAB kit) auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation wurde, nachdem eine Farbreaktion beobachtet werden konnte, durch Spülung mit Wasser beendet. Mit ansteigenden Konzentrationen von Ethanol und Xylene wurden die Gewebeschnitte dehydriert, versiegelt, mit Deckgläschen abgedeckt und bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten. Die gewonnenen Präparate wurden visuell analysiert und Lokalisation und Färbeintensität des Signals der untersuchten Antikörper beschrieben. Es wurde zwischen folgenden Zelltypen differenziert: Oozyten, Prae-Granulosazellen und Bindegewebe.

4. Ergebnisse

4.1. Fetale Ovarien

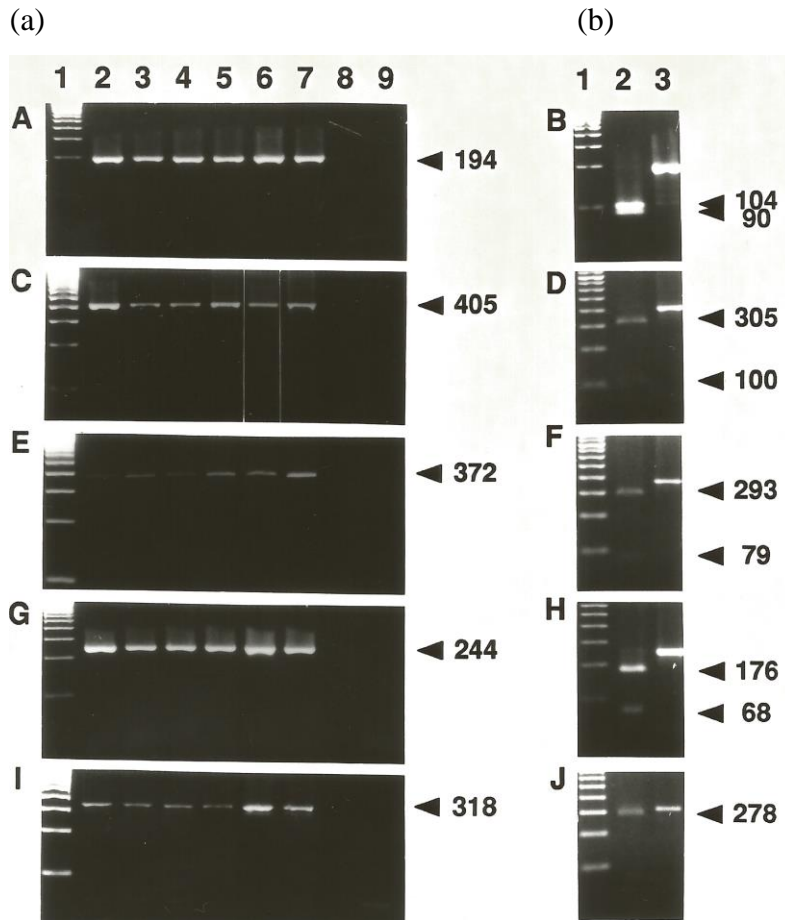
4.1.1. TGF- β und Rezeptor mRNA Expression in humanen fetalen Ovarien

Mittels rtPCR wurde die Expression der TGF- β Isoformen und der Rezeptoren untersucht, Dabei wurde eine Expression der mRNA sowohl für die drei TGF- β Isoformen als auch die zwei TGF- β Rezeptoren nachgewiesen. Dieser Nachweis der Transkription gelang in allen untersuchten Entwicklungsstufen von 11,14,18,20 und 22 Wochen. Die Abb. 1a zeigt TGF- β 1,- β 2 und- β 3 PCR Fragmente mit den entsprechenden Amplifikationsprodukten von 194 bp, 405 bp und 372 bp. Für RI und RII wurden die entsprechenden PCR Fragmente von 244 bp bzw. 318 bp nachgewiesen.

Der enzymatische Verdau bestätigte die Identität der dargestellten PCR Produkte. Die erwarteten Verdauungsfragmente für die spezifisch für TGF- β 1,- β 2,- β 3 und RI und RII amplifizieren Produkte werden in der Abb. 1b gezeigt.

Abb. 1

Ergebnisse der Reversen Transkription-PCR (RT-PCR) und die entsprechende enzymatische Verdauung von TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β Rezeptor I (RI) und RII in humanen fetalen Ovarien



A und B = β 1, C und D = β 2, E und F = β 3, G und H = RI, I und J = RII.

(a) Ergebnisse der RT-PCR Analyse: Spalte 1: 100-Basenpaare (BP) Leiter; Spalten 2-6: humane fetale Ovarien in der 11,14,18, 20 und 22 Gestationswoche; Spalte 7: Plazenta (positiv Kontrolle); Spalte 8: Hefe Transfer RNA (negativ Kontrolle); Spalte 9: Wasser (negativ Kontrolle). (b) Restriktions Enzym Verdau um die Identität der RT-PCR Produkte zu verifizieren: Spalte 1: 100-Basenpaare (BP) Leiter; Spalte 2 Verdaufragmente (von einem repräsentativen 20 Wochen altem Ovar); Spalte 3 unverdaute intaktes PCR Produkt (20 Wochen altes Ovar). Alle fetalen Altersgruppen und die Plazenta als positive Kontrolle demonstrierten die erwarteten Produkte sowohl der RT-PCR Analyse als auch der Restriktions Enzym Verdau.

4.1.2. Expression von TGF- β Isoformen und Rezeptorprotein in humanen fetalen Ovarien

Nachdem eine Transkription von TGF- β Isoformen 1-3 und den Rezeptoren I und II in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte, wurde nun mittels immunhistochemischer Methoden die Translation und die topische Zuordnung der TGF- β Isoformen und der entsprechenden Rezeptoren untersucht.

TGF- β 1

Der gegen TGF- β 1 gerichtete polyklonale Antikörper färbte Ovarien von 11 und 12 Gestationswochen ohne dass eine Bevorzugung bestimmter Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Abb. 2A). Im Gegensatz dazu war TGF- β 1 in Ovarien der 18. bis 22. Woche in der Mehrzahl der Oozyten nachzuweisen. (Abb. 2B, dicker Pfeil). Die höchste Färbeintensität zeigte sich im Zytoplasma der Oozyten wobei jedoch nahezu kein TGF- β 1 in den Nucleii gefunden werden konnte. Die umgebende Schicht von frühen Granulosazellen sowie das Bindegewebe zeigten lediglich eine sehr schwache Färbung (Abb. 2B, dünner Pfeil).

TGF- β 2

Der Färbungen mit gegen TGF- β 2 gerichteten polyklonalen Antikörpern zeigte in 11 und 12 Wochen alten Ovarien eine homogene leichte Färbung (Abb. 2C). In Gewebeproben des zweiten Trimesters trat eine Bindung überwiegend in den Oozyten lokalisiert auf (Abb. 2D, dicker Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt der Oozytenentwicklung konnte die stärkste Färbung im Cytoplasma der Oozyten nachgewiesen werden, die bereits eine umgebende Schicht früher Granulosazellen entwickelt hatten. Unreife Oozyten zeigten hingegen eine deutlich schwächere Anfärbung. In den Granulosazellen sowie den Bindegewebszellen konnte fast keine Proteinexpression nachgewiesen werden. (Abb. 2D, dünner Pfeil)

TGF- β 3

Die Färbung für TGF- β 3 in der 11. und 12. Gestationswoche war bevorzugt in den Oozyten nachzuweisen (Abb. 2E, dicker Pfeil). Das gleiche Verteilungsmuster zeigte sich ebenfalls in Ovarien der 18. bis 24. Gestationswoche, hier jedoch mit einer leicht intensiveren Färbeintensität. Diese Intensität variierte zwischen den einzelnen Oozyten wobei solche mit einer umgebenden Schicht von jungen Granulosazellen die größte Intensität aufwiesen (Abb.

2F, dicker Pfeil). Nahezu keine Färbung konnte in Granulosa- oder Bindegewebszellen beobachtet werden (Abb. 2F, dünner Pfeil).

TGF- β Rezeptor Typ I (TGF- β RI)

Die Abb. 3 zeigt die Immunfärbung für TGF- β RI in Ovarien im Alter von 11 Gestationswochen. Das gesamte Gewebe wird zart gefärbt. Das Verteilungsmuster zeigt, dass der Rezeptor in diesem Zelltyp überwiegend in der Peripherie der Zellen erscheint. In späteren Gestationswochen ist die Färbung überwiegend in den Oozyten lokalisiert mit einem Maximum im Cytoplasma welches den Nuclei umgibt (Abb. 3B, dicker Pfeil). Färbung konnte ebenfalls in den einschichtigen Lagen umgebender Granulosazellen nachgewiesen werden (Abb. 3B, dünner Pfeil). Nahezu ohne Anfärbung blieb das Bindegewebe.

TGF- β Rezeptor Typ II (TGF- β RII)

Der Antikörper gegen TGF- β RII konnte vor allem in Oozyten binden. Im Alter von 11 und 12 Wochen war die Färbung um den Nucleus der unreifen Oozyten am ausgeprägtesten (Abb. 3C). In Ovarien des zweiten Trimesters konnte ebenfalls eine starke Expression des RII in den Oozyten beobachtet werden (Abb. 3D, dicker Pfeil). Demgegenüber war die Färbung der umgebenden einschichtigen Lage von Granulosazellen weniger ausgeprägt (Abb. 3D, dünner Pfeil). Die Färbungsintensität variierte zwischen den einzelnen Oozyten wobei jedoch die kräftigste Färbung in reiferen Oozyten mit einer umgebenden Lage von Granulosazellen zu finden war. Eine nur sehr schwache Färbung zeigten die Bindegewebszellen.

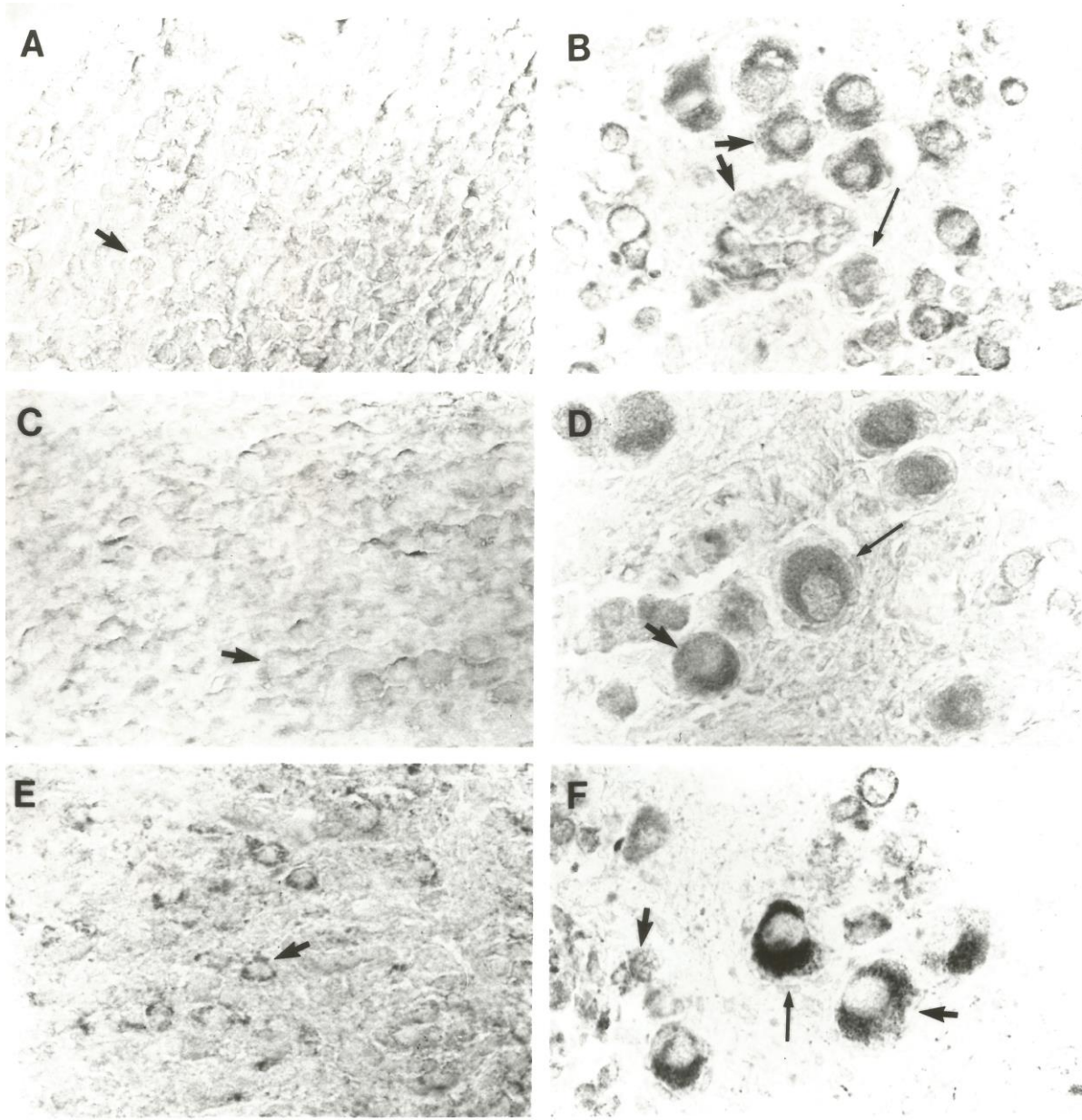
Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurde Kaninchen IgG verwendet. Es konnte keine Färbung gezeigt werden.

Die oben dargestellten Daten der Proteinexpression sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl die TGF- β Isoformen als auch die Rezeptoren mit zunehmendem Reifegrad der Oozyten vermehrt exprimiert werden. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, dass TGF- β -Signale an der fetalen Entwicklung des humanen Ovars beteiligt sein können.

Abb. 2

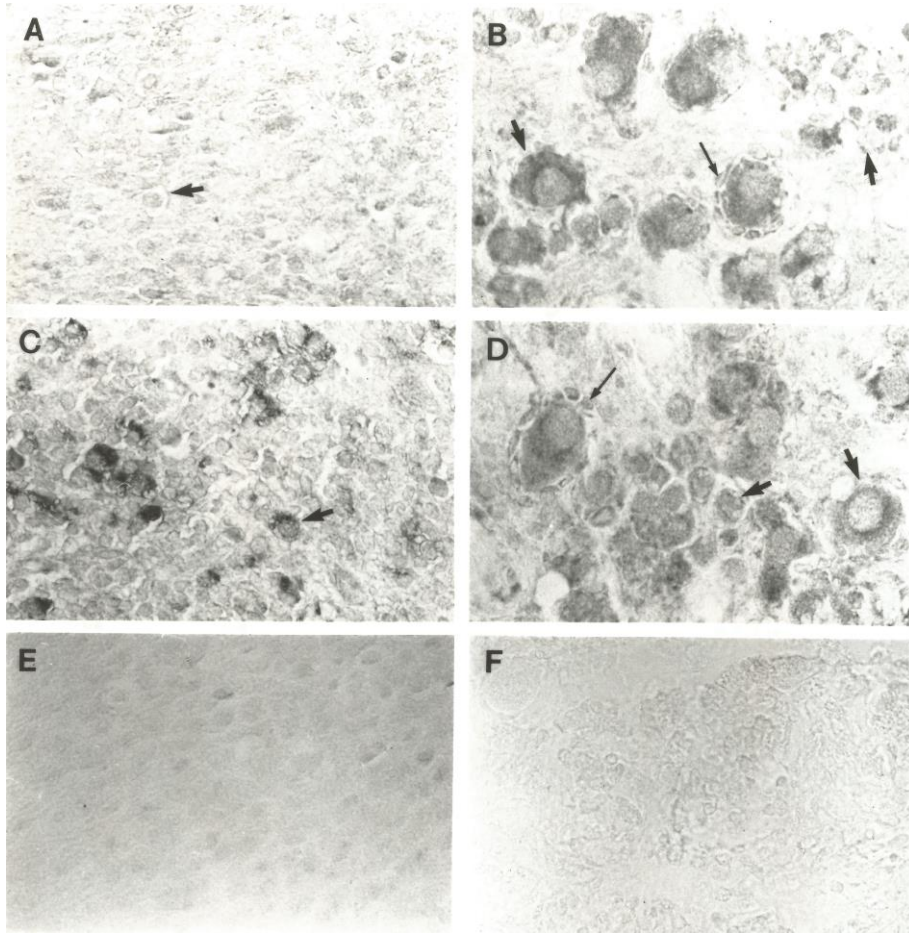
Immunohistochemische Untersuchungsergebnisse als Photographien der mikroskopischer Analysen der TGF- β Isoformen Verteilung in humanen fetalen Ovarien



Linke Spalte: Proben 11 Wochen alter humanen fetaler Ovarien; rechte Spalte: Proben 20 Wochen alter humanen fetaler Ovarien. Jedes Bild zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Untersuchung von mindestens zwei unterschiedlichen Proben je Altersgruppe. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und mit Anti-TGF- β 1 (A und B), Anti-TGF- β 2 (C und D) und Anti-TGF- β 3 (E und F) inkubiert. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde Diaminobendidine benutzt. Dicker Pfeil = Oocyten; dünner Pfeil = Pre-Granulosa Zellen. Vergrößerung: x 400

Abb. 3

Immunohistochemische Untersuchungsergebnisse als Fotografien der mikroskopischen Analysen der TGF- β Rezeptoren - Verteilung in humanen fetalen Ovarien



Linke Spalte: Proben 11 Wochen alter humanen fetaler Ovarien; rechte Spalte: Proben 24 Wochen alter humanen fetaler Ovarien. Jedes Bild zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Untersuchung von mindestens zwei unterschiedlichen Proben je Altersgruppe. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und mit anti-TGF- β Rezeptor I (A und B), anti-TGF- β Rezeptor II (C und D) und Ratten Immunoglobulin G (Negative Kontrolle) (E und F) inkubiert. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde Diaminobenedidine benutzt. Dicker Pfeil = Oocyten; dünner Pfeil = Pre-Granulosa Zellen. Vergrößerung: x 400

Tabelle 3

Zusammenfassung der Ergebnisse immunohistochemischer Untersuchungen fetaler Ovarien

	Intensität der Färbung für die untersuchten Wachstumsfaktoren				
	Erstes Trimester (11-12 . SSW; n = 2)		Zweites Trimester (14-24 SSW; n = 14)		
	Oocyten*	Bindegewebe Zellen#	Oocyten\$	Granulosa Zellen	Bindegewebe Zellen
TGF-β1	+	+	+++	-	+
TGF-β2	+	+	+++§	-	- / +
TGF-β3	++	- / +	+++§	-	- / +
TGF-β Rezeptor I	+	+	++§	+	- / +
TGF-β Rezeptor II	++	- / +	+++§	++	- / +

Legende: - = keine Färbung; - / + = minimale Färbung in einigen Proben; + = minimale Färbung; ++ = mittelgradige Färbung, +++ = intensive Färbung. Die Intensität der Färbung kann zwischen den einzelnen Zelltypen und Gestationsalter verglichen werden, da immer die gleichen Antikörper verwendet wurden. Der Vergleich zwischen unterschiedlichen Antikörper kann nur durch den Vergleich „Färbung vorhanden“ vs. „Färbung nicht vorhanden“ durchgeführt werden.

* Unreife Oocyten; # In dieser Altersgruppe kann keine Unterscheidung zwischen Bindegewebs- und Pregranulosazellen getroffen werden; \$ Beinhaltet unreife Oocyten und Oocyten die von einer einzelnen Lage früher Granulosazellen umgeben sind; § Farbintensität variiert zwischen den einzelnen Oocyten

Als Negativkontrolle wurden Versuche mit Kaninchen IgG als erstem Antikörper durchgeführt. Bei diesen Kontrollexperimenten konnte keine Färbung gezeigt werden.

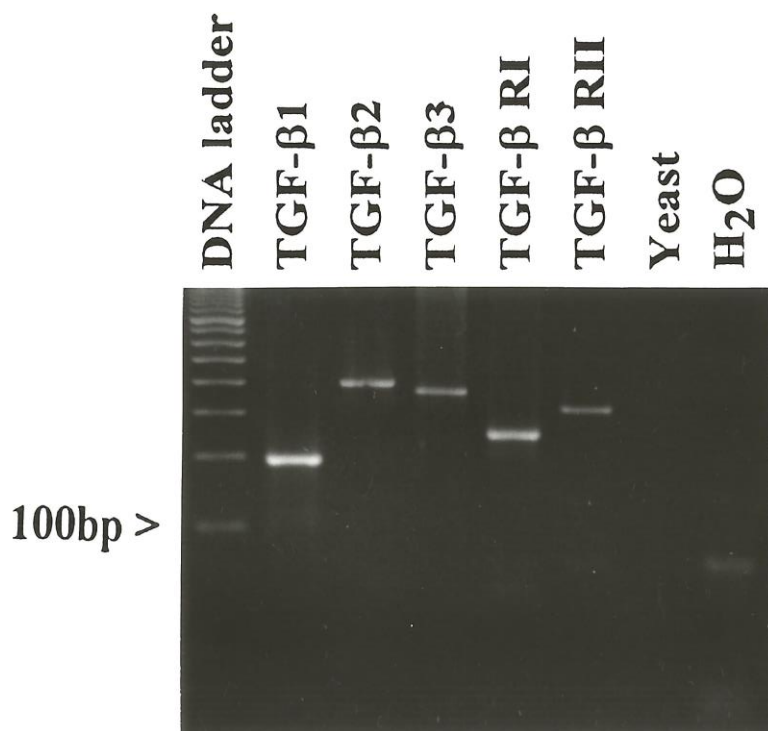
4.2. Plazenta

4.2.1. TGF- β und Rezeptor mRNA Expression in humaner Plazenta am Termin

Die Transkription von Genen die Mitglieder der TGF- β Familie kodieren, wurde mittels RT-PCR untersucht. Es konnte mRNA für TGF- β 1,- β 2,- β 3 und TGF- β RI und RII nachgewiesen werden. Abb. 4 zeigt TGF- β 1,- β 2 und - β 3 PCR Fragmente mit den entsprechenden Amplifikationsprodukten von 194 bp, 405 bp und 372 bp. Für RI und RII wurden die entsprechenden PCR Fragmente von 244 bp bzw. 318 bp nachgewiesen.

Abb. 4

Ergebnisse der PCR-Amplifikation von TGF- β 1, - β 2, - β 3, RI und RII in humaner Plazenta am Termin



Linke Spalte „DNA Leiter“ = Marker von DNA Längen in Abschnitten von jeweils 100-Basenpaaren (bp). Die humane fetale Plazenta zeigt die erwarteten Banden bei: RI 194 bp für TGF- β , 405bp für TGF- β 2, 372 bp für TGF- β 3, 244 bp für TGF- β RI und 318 bp für TGF- β RII. Hefe tRNA und H₂O (Negativkontrollen) zeigen kein Amplifikationsprodukt.

4.2.2. Protein-Expression von TGF- β Isoformen und Rezeptoren in humaner Plazenta am Termin

Die Ergebnisse der immunohistochemischen Versuche sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Das Färbemuster von TGF- β 1 und - β 2 wurde als Positivkontrolle verwendet, da deren Expression in der Plazenta bereits bekannt war [5, 60]. Details der Daten werden im Folgenden beschrieben.

TGF- β 1

In humaner, am Termin gewonnener Plazenta färbte der gegen TGF- β 1 gerichtete polyklonale Antikörper intensiv das Zytoplasma der Syncytiotrophoblasten Zellschicht sowohl der Stamm als auch der terminalen Zotten (Abb. 5A). Amnionzellen der Chorionplatte färbten sich stark positiv wie auch extravillöse Trophoblastenzellen (Abb. 5C). Keine Färbung wurde in den Nucleii der genannten Zellen nachgewiesen. Eine mäßige Färbung fand sich in fetalen Blutgefäßen und eine zarte Färbung konnte in der Dezidua gezeigt werden.

TGF- β 2

Der gegen TGF- β 2 gerichtete Antikörper zeigte eine kräftige Färbung im Cytoplasma der Syncytiotrophoblastenzellschicht der Stamm und terminalen Zotten, der extravillöse Trophoblastenzellen und der Amnionzellen der Chorionplatte. Die Dezidua zeigte lediglich eine schwache und fetale Blutgefäße eine mäßige Anfärbung.

TGF- β 3

Der polyklonale Antikörper gegen TGF- β 3 zeigte eine kräftige Färbung im Cytoplasma der Syncytiotrophoblastenzellschicht der Stamm und terminalen Zotten (Abb. 5D), wobei sich die Nucleii nicht oder nur sehr zart färbten. Mäßige bis intensivere Färbung wurde in den Amnionzellen der Chorionplatte (Abb. 5E) und in den extravillösen Trophoblasten nachgewiesen (Abb. 5F). Nur eine schwache Färbung fand sich in fetalen Blutgefäßen und Deziduazellen.

TGF- β Rezeptor Typ I

Die Abb. 5G zeigt eine mäßige Färbung für TGF- β RI in der Syncytiotrophoblastenzellschicht und dort mehr in den Nucleii als im Cytoplasma betont. Weitere Färbung konnte in Amnionzellen der Chorionplatte (Abb. 5H) und in den extravillösen Trophoblasten mit

reduzierter bis deutlicher Intensität gefunden werden (Abb. 5I). Leichte Färbung zeigten fetale Blutgefäße und nahezu ohne Färbung blieben die Deziduazellen.

TGF- β Rezeptor Typ II

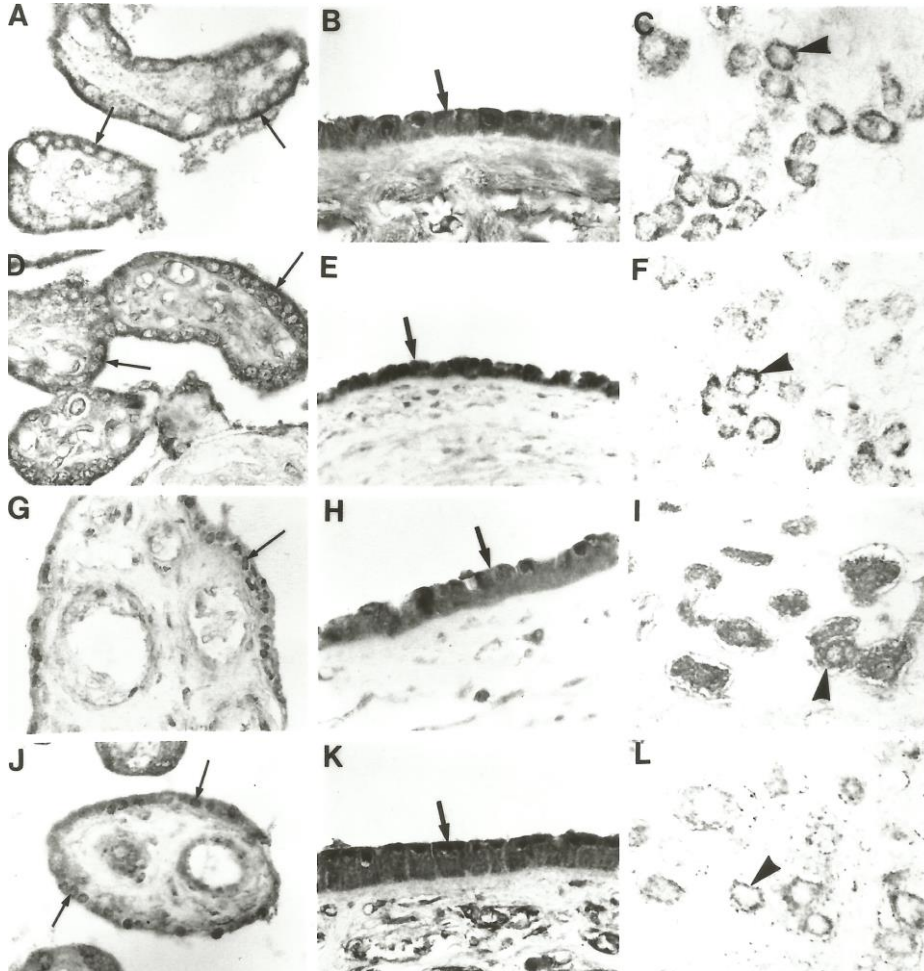
Der polyklonale Antikörper gerichtet gegen TGF- β RII wurde in der Syncytiotrophoblastenzellschicht mit der größten Intensität in den Nucleii gefunden (Abb. 5J). Die Amnionzellen der Chorionplatte wurden ebenfalls intensiv gefärbt (Abb. 5K). Extravillöse Trophoblasten wiesen eine mäßige Färbung im Cytoplamsa mit Aussparung der Nucleii auf (Abb. 5L). Fetale Blutgefäße sowie Dezidua zeigten lediglich eine sehr schwache Färbung.

Negativ Kontrolle

Als Negativkontrolle wurden Versuche mit Kaninchen IgG als erstem Antikörper durchgeführt. Bei diesen Kontroll-Experimenten trat keine Färbung auf.

Abb. 5

Repräsentative Ergebnisse der Immunohistochemischen Analysen von Plazentagewebe am Termin



Immunohistochemische Färbung für TGF- β 1 (A – C), TGF- β 3 (D – F), TGF- β RI (G – I), TGF- β RII (J-L). Die Pfeile markieren die Gebiete die Färbung aufweisen. Linke Spalte: Plazentazotten mit Färbung der Syncytiotrophoblasten (dünner Pfeil). Mittlere Spalte: Chorionplatte mit Färbung der Amniotischen Zellen (dicker Pfeil). Rechte Spalte: extravillöse Trophoblasten mit cytoplasmatischer Färbung (Pfeilkopf). Vergrößerung x40

Tabelle 4

Zusammenfassung der Ergebnisse immunohistochemischer Untersuchungen an Plazentagewebe zum Zeitpunkt des Geburtstermins *

	Humane Plazenta am Termin n = 10 #				
	Syncytiotrophoblast	Chorion- Platte	Extravillöse Trophoblasten	Dezidua	Fetale Blutgefäße
TGF-β1	+++	+++	+++	+	++
TGF-β2	+++	+++	+++	+	++
TGF-β3	+++	++	+++	+	+
TGF-β Rezeptor I	++	++/+++	+++	- / +	+
TGF-β Rezeptor II	++	+++	++	+	+

Legende: TGF 0 Transforming growth factor; - = keine Färbung; - / + = minimale Färbung in einigen Proben; + = minimale Färbung; ++ = mittlegradige Färbung, +++ = intensive Färbung.

* Färbeintensität der unterschiedlichen Zelltypen kann nur verglichen werden wenn der gleiche Antikörper verwendet wurde. Der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Antikörpern ist nur im Hinblick auf die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Färbung möglich

Jeder Antikörper konnte in allen 10 unterschiedlichen Plazentaprobe demonstriert werden

Als Negativkontrolle wurden Versuche mit Kaninchen IgG als ersten Antikörper durchgeführt. Bei diesen Kontrollexperimenten konnte keine Färbung gezeigt werden

5. Diskussion

Ovar

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass das TGF- β System in fetalen humanen Ovarien nachweisbar ist. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Expression der Isoformen TGF- β 1 und TGF- β 2 sowie des RI zwischen dem ersten und zweiten Trimenon der Schwangerschaft ein unterschiedliches Verteilungsmuster aufweist.

Im ersten Trimenon konnten in den Oozyten alle untersuchten Isoformen sowie Rezeptoren nachgewiesen werden, in dem umgebende Gewebe (Bindegewebszellen) hingegen nur TGF- β 1, TGF- β 2 und RI. Für TGF- β 3 und den RII konnte nur eine sehr schwache Färbung nachgewiesen werden.

Im zweiten Trimenon zeigte sich, im Vergleich mit jüngeren Ovarien, eine insgesamt höhere Färbeintensität sowie eine Bevorzugung der Oozyten für alle hier untersuchten Proteine. Das Verteilungsmuster der Färbeintensität für TGF- β 1 fand sich gleichmäßig zwischen den Oozyten. Im Gegensatz dazu zeigten sich für TGF- β 2, TGF- β 3, RI und RII deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Oozyten. Für die beiden Rezeptoren konnten zudem in Granulosazellen, die in einer Einzellage um die Oozyten angeordnet waren, eine Färbung nachgewiesen werden. Die zeitgleiche Expression beider Rezeptoren nur in Oozyten und Granulosazellen lässt vermuten, dass diese Zellen das Ziel für TGF- β in diesem Stadium der Entwicklung sind. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass TGF- β in den Oozyten sowie in den Granulosazellen eine wichtige Rolle in der untersuchten Entwicklungsperiode spielen könnte.

In der fetalen Periode, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurde, finden essentielle Schritte der humanen Oozyten Entwicklung statt. Die anfängliche mitotische Vermehrung der Keimzellen ist gefolgt von der Meiose zu Oozyten. In dieser Phase erfolgt sowohl die Atresie als auch die Bildung erster Follikel.

Die hier nachgewiesene Expression von TGF- β Isoformen und ihrer Rezeptoren in humanen fetalen Oozyten und Granulosazellen deutet darauf hin, dass das TGF- β System eine Rolle in der Regulation der von Oozyten- und Granulosazellentwicklung spielen könnte. Diese Daten werden unterstützt durch Ergebnisse von Levacher et al, die eine Expression von TGF- β 1 und TGF- β 2 in fetalen und neonatalen Ratten Ovarien darstellen konnte. [64].

Die Arbeitsgruppe von Prof. John Yeh, in dem ich diese Arbeiten durchführen durfte, hatte zuvor die Anwesenheit anderer Wachstumshormone in fetalen humanen Ovarien untersucht [65]. Sie konnten die Expression von Insulin-Like Growth Factor Rezeptoren, Epidermal Growth Factor und Transforming Growth Factor alpha Receptor demonstrieren [65, 66]. Andere Arbeitsgruppen haben die Anwesenheit von TGF- β in adulten Ovarien in verschiedenen Species nachweisen können. Auch hier wird eine Beteiligung an dem Prozess der Oozytenentwicklung angenommen [54, 67]. In erwachsenen humanen Ovarien wurden TGF- β 1 und TGF- β 2 gefunden [68]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Wachstumsfaktoren, inklusive des TGF- β Systems, an der Regulation der humanen Ovarentwicklung beteiligt sind.

Die differenzierte Expression der drei Isoformen von TGF- β deutet darauf hin, dass sie eigene Funktionen während der fetalen Entwicklung ausüben könnten. Diese Hypothese wird durch Arbeiten bestätigt, die Messenger RNA und Protein Expression in erwachsenen humanen Ovarien untersucht haben. In erwachsenen Ovarien wurde TGF- β 1 in Oozyten, Granulosazellen und Thecazellen nachgewiesen, wohingegen TGF- β 2 überwiegend mit den Theca Zellen assoziiert ist [68].

Sowohl die Reifung der einzelnen Oocyten und als auch die Atresie verlaufen in dem fetalen humanen Ovar nicht synchron. Eine visuelle Zuordnung sowohl der einzelnen Zelltypen als auch der unterschiedlichen Entwicklungsstadien mittels mikroskopischer Analysen war zum Zeitpunkt der Untersuchungen das übliche Vorgehen, birgt jedoch potentielle Fehler. Eine möglichst exakte Bestimmung des Entwicklungsstandes wäre jedoch wünschenswert, um differenziertere Aussagen zu dem Wirkmechanismus der untersuchten TGF- β Isoformen treffen zu können. Hierzu gibt es erst in der letzten Zeit Arbeiten, die eine genauere Bestimmung der Entwicklungsphasen der Oocyten ermöglichen. Z.B. wurden in der Arbeit von G.M. Hartshorne et al neue Daten präsentiert, die das Timing von prenataler Oogenese und Apoptosis mittels TUNEL Färbung sichtbar machen und so die Identifikation der verschiedenen Phasen im Verlauf der meiotischen Reifung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der fetalen humanen Ovar Entwicklung ermöglichen [69]. Weitere Studien wären notwendig die parallel die Expression von TGF- β und den genauen Zeitpunkt der prenatalen Oogenese zu untersuchen.

In der Arbeit von Rayn Schindler et al aus dem Jahr 2010 wird die Phase der Follikelbildung in fetalen Rattenovarien genauer untersucht [70]. Ihre Ergebnisse unterstützen unsere

Hypothese, dass TGF- β in den Prozess der Follikelbildung und Regulation mit eingebunden sein könnte. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass TGF- β 1 zusammen mit Connective tissue growth factor (CTGF) die spezifische Anordnung von Primordial Follikel stimuliert und das TGF- β 1 alleine den Pool an Primordial Follikeln verkleinern kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits in dieser frühen Phase der fetalen Entwicklung durch die Reglementierung der Anzahl der Oocyten Einfluss auf die Dauer der weiblichen reproduktiven Lebensspanne genommen werden kann und das TGF- β dabei eine regulierende Rolle spielen könnte.

Die Ergebnisse von Studien an humanen fetalen Ovarien erbrachten oft diskrepante Ergebnisse zu Studien an fetalen Ovarien anderer Spezies. Diese Diskrepanzen unterstreichen die begrenzte Übertragbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Spezies [64]. Für Arbeiten, die das Verständnis für die Entwicklungen fetaler humaner Ovarien und daraus resultierender Krankheitsbilder zum Ziel haben, bleiben Untersuchungen an humanen Geweben zwingend erforderlich. Die geringe Verfügbarkeit von humanem fetalem Gewebe ist hierbei weiterhin der einschränkende Faktor.

Die Bedeutung des PCO als Ursache für Fertilitätsstörungen wird durch neueste Untersuchungen gestützt, die weiterhin eine hohe Prävalenz des PCO nachweisen [71]. Unsere Hypothese, dass die Rolle von TGF- β auf das humane fetale Ovar auch auf die Entstehung des PCO Syndroms Einfluss nehmen könnte, wird durch die Beobachtungen von von Hatzirodos et al unterstützt [72]. Die von seiner Arbeitsgruppe erhobenen Daten geben Hinweise darauf, dass während der frühen fetalen Ovarentwicklung Fibrillin 3 die Aktivität von TGF- β reguliert. Es ist bekannt das TGF- β die Bildung und Funktion von Bindegewebe reguliert und dass bei Frauen mit dem PCO Syndrom die bindegewebigen Anteile der Ovarien verändert sind [72]. Somit könnte hier ein prädisponierender Faktor vorliegen, der bereits in der Fetalperiode die Entstehung eines PCO Syndrom begünstigt.

Plazenta

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten zeigen, dass neben TGF- β 1 und TGF- β 2 auch die mRNA von TGF- β 3 und die TGF- β Rezeptoren I und II in der humanen reifen Plazenta exprimiert wird. Des Weiteren konnten wir auch die Proteinexpression mit dem entsprechenden Verteilungsmuster demonstrieren. Unsere Ergebnisse stimmen mit anderen

Arbeiten überein, die ebenfalls die Präsenz von TGF- β 1 in den Syncytiotrophoblasten von Plazenten in einer sehr späten Gestationsphase zeigen konnten [14].

Die Rezeptoren TGF- β RI und TGF- β RII konnten in unseren Untersuchungen gleichzeitig in denselben Zelltypen und Zellkompartementen gefunden werden. Da die Anwesenheit beider Rezeptoren notwendig ist um die Signalkaskade in Gang zu setzen, wird durch unsere Beobachtung die Hypothese unterstützt, dass TGF- β eine aktive Rolle als auto-/ paracrinere Faktor in der Entwicklung und Regulation der Plazenta spielt.

Für TGF- β ist bekannt, dass er das Wachstum und die Proliferation von Zellen reguliert. Zum einen durch direkte intrazelluläre Mechanismen, welche den Zellzyklus betreffen als auch durch indirekte Mechanismen. Eine Art der indirekten Regulation besteht im Zusammenspiel mit der ECM [8, 73].

Insbesondere der extravillöse Trophoblast des Plazentagewebe produziert eine Vielzahl von ECM-Komponenten. Die Regulation und das Zusammenspiel dieser einzelnen Komponenten der ECM ist ein wichtiger Faktor in der aktiven Phase der Plazenta, so dass durch unsere Arbeit die Hypothese unterstützt wird, dass TGF- β Isoformen und deren Rezeptoren an der Regulation der plazentaren Entwicklung beteiligt sind.

In den nachfolgenden Jahren konnten von anderen Arbeitsgruppen weitere Anhaltspunkte gefunden werden, die diese Hypothese bestätigen.

So konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass TGF- β die Trophoblasten Invasion inhibiert indem die Menge an MMP-9 (Matrix Metalloproteasen) und der Protease uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) reduziert wird, ohne dabei die Zellproliferation oder TIMP (Tissue Inhibitor) Level zu verändern [74].

Auch konnten eine erhöhte TGF- β Aktivität in Plasma bei Patientinnen mit Prä-Eklampsie nachgewiesen werden. Daraus resultiert die Vorstellung, dass eine gestörte Implantation der befruchteten Eizelle im Zusammenhang mit dem Auftreten der Prä-Eklampsie stehen könnte [74]. Weitere Untersuchungen über die Rolle von TGF- β und deren Rezeptoren sind notwendig um die Ätiologie von Erkrankungen und die mögliche Rolle die TGF- β dabei spielen könnte besser zu verstehen.

6. Zusammenfassung

TGF- β ist ein pleiotropes Molekül das nicht nur im Immunsystem eine wesentliche Funktion in der Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz besitzt, sondern auch Differenzierung und Expansion in vielen Geweben reguliert. Von TGF- β sind drei Isoformen beschrieben, die alle an den gleichen Rezeptor binden. Dieser TGF- β Rezeptor I kann für sich allein zwar TGF- β binden, aber kein Signal in die Zelle übermitteln. Hierfür ist der TGF- β Rezeptor II erforderlichlich.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Yeh beschäftigt sich intensiv mit der Entwicklung des fetalen humanen Ovars. Zum Zeitpunkt der von mir durchgeführten Untersuchungen war nicht bekannt ob und wenn ja in welchen Reifestadien TGF- β an der Regulation der Entwicklung von fetalen Ovarien beteiligt ist. Ziel dieser Studie war es daher die Translation und Expression der TGF- β Isoformen und der TGF- β Rezeptoren I und II im fetalen humanen Ovar zu untersuchen.

Die Transkription wurden mittels rtPCR untersucht und die Proteinexpression mittels Immunhistochemie nachgewiesen.

Ich konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Expression der TGF- β Isoformen und ihrer Rezeptoren nachweisen. Die Immunhistochemie zeigte darüber hinaus, dass die Verteilung in den Zelltypen (Oozyten und Granulosazellen) in Geweben des ersten und des zweiten Trimenons unterschiedlich reguliert ist. Im zweiten Trimenon zeigte sich, im Vergleich mit jüngeren Ovarien, eine insgesamt höhere Färbeintensität sowie eine Bevorzugung der Oozyten für alle hier untersuchten Proteine. Diese Ergebnisse stützen unsere ursprüngliche Hypothese, dass TGF- β in der untersuchten Entwicklungsperiode auch im Ovar eine Bedeutung besitzt.

In einem zweiten Teil der Untersuchungen wurde die Expression von TGF- β und seiner Rezeptoren in der reifen humanen Placenta untersucht. Es war bekannt, dass TGF- β exprimiert wird, ob auch die für die biologische Wirkung erforderlichen TGF- β RI und RII vorhanden sind, war jedoch nicht bekannt. Hier konnte im Rahmen meiner Arbeit die Expression aller TGF- β Isoformen als auch der Rezeptoren nachgewiesen werden.

Spätere Arbeiten konnten die von uns gefundenen Ergebnisse im Wesentlichen bestätigen. Zusammenfassend zeigen die hier vorgelegten Daten, dass TGF- β zu kritischen Zeitpunkten der fetalen Ovarentwicklung exprimiert wird. Ob sich hier Ansatzpunkte ergeben um Krankheitsbilder deren Ursprung in der fetalen Entwicklungsperiode vermutet werden, wie z. B. das Polycystische Ovar besser zu verstehen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

7. Literatur

1. Hart R, Hickey M, Franks S: **Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004, **18**(5):671-683.
2. Qin KN, Rosenfield RL: **Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome.** *Mol Cell Endocrinol* 1998, **145**(1-2):111-121.
3. Atiomo WU, Pearson S, Shaw S, Prentice A, Dubbins P: **Ultrasound criteria in the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS).** *Ultrasound Med Biol* 2000, **26**(6):977-980.
4. Lysiak JJ, Hunt J, Pringle GA, Lala PK: **Localization of transforming growth factor beta and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation.** *Placenta* 1995, **16**(3):221-231.
5. Vuckovic M, Genbacev O, Kumar S: **Immunohistochemical localisation of transforming growth factor-beta in first and third trimester human placenta.** *Pathobiology* 1992, **60**(3):149-151.
6. Yeh JA, E.Y.: **The ovarian life cycle.** In: *REproductive Endocrinology* 4th edn. Edited by Yen SSCJ, R.B.; Barbieri, R.L. . Philadelphia: WB Saunders 1999: 153-190.
7. Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB: **Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo.** *J Cell Biol* 1987, **105**(6 Pt 2):2861-2876.
8. Sporn MBR, A.B.: **The transforming growth factor-betas.** In: *Peptide Growth Factors and their Receptors.* edn. Edited by Sporn MBR, A.B. . New York: Springer 1991: 419-472.
9. Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF: **Morphometric study of the human neonatal ovary.** *Anat Rec* 1991, **231**(2):201-208.
10. Baker TG: **A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963, **158**:417-433.
11. Speroff LG, R.H.; Kase, N.G.; : **The Ovary-Embryology and Development** In: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 5 edn. Edited by Speroff LG, R.H.; Kase, N.G.; . Baltimore Williams and Wilkins; 1994: 93-105.
12. Eppig JJ: **The Ovary: Oogenesis.** In: *Scientific Essentials of Reproductive Medicine.* edn. Edited by Hillier SCK, H.C.; Neilson J.P. London W.B. Saunders; 1996: 147-159.
13. Yding Anderson CB, A.G.: **Gonadal Differentiation.** In: *Scientific Essentials of Reproductive Medicine.* edn. Edited by Hillier SCK, H.C.; Neilson J.P. London: WB Saunders; 1996: 105-119.
14. Dungy LJ, Siddiqi TA, Khan S: **Transforming growth factor-beta 1 expression during placental development.** *Am J Obstet Gynecol* 1991, **165**(4 Pt 1):853-857.
15. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB: **Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(12):3676-3680.
16. Gorivodsky M, Torchinsky A, Zemliak I, Savion S, Fein A, Toder V: **TGF beta 2 mRNA expression and pregnancy failure in mice.** *Am J Reprod Immunol* 1999, **42**(2):124-133.
17. Clark DA, Flanders KC, Banwatt D, Millar-Book W, Manuel J, Stedronska-Clark J, Rowley B: **Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor beta-2.** *J Immunol* 1990, **144**(8):3008-3014.

18. Selick CE, Horowitz GM, Gratch M, Scott RT, Jr., Navot D, Hofmann GE: **Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in human implantation sites.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **78**(3):592-596.
19. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK: **Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation.** *Biol Reprod* 1992, **46**(4):561-572.
20. Graham CH, Lala PK: **Mechanism of control of trophoblast invasion in situ.** *J Cell Physiol* 1991, **148**(2):228-234.
21. Mitchell EJ, O'Connor-McCourt MD: **A transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor from human placenta exhibits a greater affinity for TGF-beta 2 than for TGF-beta 1.** *Biochemistry* 1991, **30**(17):4350-4356.
22. Mitchell EJ, Fitz-Gibbon L, O'Connor-McCourt MD: **Subtypes of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors with different affinities for TGF-beta 1 and TGF-beta 2 are exhibited by human placental trophoblast cells.** *J Cell Physiol* 1992, **150**(2):334-343.
23. Ando N, Hirahara F, Fukushima J, Kawamoto S, Okuda K, Funabashi T, Gorai I, Minaguchi H: **Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface.** *Am J Reprod Immunol* 1998, **40**(1):48-56.
24. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB: **New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**(9):5339-5343.
25. Gray AM, Mason AJ: **Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly.** *Science* 1990, **247**(4948):1328-1330.
26. Sun PD, Davies DR: **The cystine-knot growth-factor superfamily.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1995, **24**:269-291.
27. Lawrence DA: **Transforming growth factor-beta: an overview.** *Kidney Int Suppl* 1995, **49**:S19-23.
28. Massague J: **TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins.** *Cell* 1996, **85**(7):947-950.
29. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF: **Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase.** *Cell* 1992, **68**(4):775-785.
30. Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K: **Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor.** *Cell* 1993, **75**(4):681-692.
31. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J: **Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system.** *Cell* 1991, **67**(4):785-795.
32. MacKay K, Robbins AR, Bruce MD, Danielpour D: **Identification of disulfide-linked transforming growth factor-beta 1-specific binding proteins in rat glomeruli.** *J Biol Chem* 1990, **265**(16):9351-9356.
33. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J: **Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.** *Nature* 1994, **370**(6488):341-347.
34. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P: **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** *Nature* 1997, **390**(6659):465-471.
35. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH *et al*: **DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1.** *Science* 1996, **271**(5247):350-353.
36. Janknecht R, Wells NJ, Hunter T: **TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300.** *Genes Dev* 1998, **12**(14):2114-2119.

37. Sasaki H, Pollard RB, Schmitt D, Suzuki F: **Transforming growth factor-beta in the regulation of the immune response.** *Clin Immunol Immunopathol* 1992, **65**(1):1-9.
38. Okamura T, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Komai T, Fujio K, Yamamoto K: **Role of TGF-beta3 in the regulation of immune responses.** *Clin Exp Rheumatol* 2015, **33**(4 Suppl 92):S63-69.
39. Lebman DA, Nomura DY, Coffman RL, Lee FD: **Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type beta-induced isotype switching.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(10):3962-3966.
40. Moses HL, Coffey RJ, Jr., Leof EB, Lyons RM, Keski-Oja J: **Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation.** *J Cell Physiol Suppl* 1987, **Suppl 5**:1-7.
41. Hill DJ, Strain AJ, Elstow SF, Swenne I, Milner RD: **Bi-functional action of transforming growth factor-beta on DNA synthesis in early passage human fetal fibroblasts.** *J Cell Physiol* 1986, **128**(2):322-328.
42. Pierce DF, Jr., Gorska AE, Chytil A, Meise KS, Page DL, Coffey RJ, Jr., Moses HL: **Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(10):4254-4258.
43. Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A: **Transforming growth factor-beta.** *Cancer Surv* 1992, **12**:81-103.
44. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ: **Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice.** *Development* 1995, **121**(6):1845-1854.
45. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D *et al*: **Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.** *Nature* 1992, **359**(6397):693-699.
46. Shull MM, Doetschman T: **Transforming growth factor-beta 1 in reproduction and development.** *Mol Reprod Dev* 1994, **39**(2):239-246.
47. Godin I, Wylie CC: **TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture.** *Development* 1991, **113**(4):1451-1457.
48. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB: **Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(1):119-123.
49. Hirte H, Clark DA: **Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of transforming growth factor-beta as a suppressive factor.** *Cancer Immunol Immunother* 1991, **32**(5):296-302.
50. McAllister JM, Byrd W, Simpson ER: **The effects of growth factors and phorbol esters on steroid biosynthesis in isolated human theca interna and granulosa-lutein cells in long term culture.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **79**(1):106-112.
51. Chegini N, Williams RS: **Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues.** *J Clin Endocrinol Metab* 1992, **74**(5):973-980.
52. Benahmed M, Morera AM, Ghiglieri C, Tabone E, Menezo Y, Hendrick JC, Franchimont P: **Transforming growth factor-beta(s) in the ovary.** *Ann N Y Acad Sci* 1993, **687**:13-19.
53. Mondschein JS, Canning SF, Hammond JM: **Effects of transforming growth factor-beta on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [3H]thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures.** *Endocrinology* 1988, **123**(4):1970-1976.
54. Feng P, Catt KJ, Knecht M: **Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte.** *Endocrinology* 1988, **122**(1):181-186.

55. Dunkel L, Tilly JL, Shikone T, Nishimori K, Hsueh AJ: **Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha.** *Biol Reprod* 1994, **50**(4):940-948.
56. Knecht M, Feng P, Catt K: **Bifunctional role of transforming growth factor-beta during granulosa cell development.** *Endocrinology* 1987, **120**(4):1243-1249.
57. Knecht M, Feng P, Catt KJ: **Transforming growth factor-beta regulates the expression of luteinizing hormone receptors in ovarian granulosa cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986, **139**(2):800-807.
58. Feng P, Catt KJ, Knecht M: **Transforming growth factor beta regulates the inhibitory actions of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation.** *J Biol Chem* 1986, **261**(30):14167-14170.
59. Witt M, Erickson RP: **A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction.** *Hum Genet* 1989, **82**(3):271-274.
60. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV: **Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells.** *Nature* 1985, **316**(6030):701-705.
61. Nishida K, Sotozono C, Adachi W, Yamamoto S, Yokoi N, Kinoshita S: **Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 mRNA expression in human cornea.** *Curr Eye Res* 1995, **14**(3):235-241.
62. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, Bush HL, Jr.: **Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1.** *J Clin Invest* 1995, **96**(6):2667-2675.
63. Sable DB, Yeh J: **Growth factor receptor messenger RNA expression in human fetal brain regions.** *Obstet Gynecol* 1995, **86**(2):240-247.
64. Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R: **Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in the fetal and neonatal rat ovary.** *Differentiation* 1996, **61**(1):45-51.
65. Shifren JL, Osathanondh R, Yeh J: **Human fetal ovaries and uteri: developmental expression of genes encoding the insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II receptors.** *Fertil Steril* 1993, **59**(5):1036-1040.
66. Yeh J, Osathanondh R, Villa-Komaroff L: **Expression of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor receptor and its ligands, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha, in human first- and second-trimester fetal ovary and uterus.** *Am J Obstet Gynecol* 1993, **168**(5):1569-1573.
67. Tsafirri A, Vale W, Hsueh AJ: **Effects of transforming growth factors and inhibin-related proteins on rat preovulatory graafian follicles in vitro.** *Endocrinology* 1989, **125**(4):1857-1862.
68. Chegini N, Flanders KC: **Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages.** *Endocrinology* 1992, **130**(3):1707-1715.
69. Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E, Ghafari F: **Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection?** *Mol Hum Reprod* 2009, **15**(12):805-819.
70. Schindler R, Nilsson E, Skinner MK: **Induction of ovarian primordial follicle assembly by connective tissue growth factor CTGF.** *PLoS One* 2010, **5**(9):e12979.

71. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R: **Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome.** *Fertil Steril* 2016, **106**(1):6-15.
72. Hatzirodos N, Bayne RA, Irving-Rodgers HF, Hummitzsch K, Sabatier L, Lee S, Bonner W, Gibson MA, Rainey WE, Carr BR *et al*: **Linkage of regulators of TGF-beta activity in the fetal ovary to polycystic ovary syndrome.** *FASEB J* 2011, **25**(7):2256-2265.
73. Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, Rockenstein EM, Mucke L: **Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1.** *Am J Pathol* 1995, **147**(1):53-67.
74. Staun-Ram E, Shalev E: **Human trophoblast function during the implantation process.** *Reprod Biol Endocrinol* 2005, **3**:56.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, Brigham and Women´s Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, unter Anleitung von Prof. John Yeh angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank. Nicht nur für die Überlassung der Themas der Arbeit, sondern auch besonders für die Geduld meine ersten wissenschaftlichen Schritte in einem englischsprachigen Labor zu begleiten.

Mein weiterer Dank geht an alle lang- und kurzfristigen Mitglieder seiner Arbeitsgruppe, die mich in jeglicher Form bei meinen Forschungsarbeiten unterstützt haben und ohne derer Hilfe meine Zeit in Boston, sowohl im wissenschaftlichen als auch im privaten Bereich nicht so erfreulich und mit so vielen bleibenden positiven Erfahrungen verlaufen wäre.

Mein besondere Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alexander Mustea. Nach meiner Rückkehr aus Boston und einigen beruflichen Umwegen hat er sich dieser Arbeit angenommen. Ohne seine Unterstützung wäre sie nicht zustande gekommen.

Frau Prof. Dr. med. Julia Mayerle für Ihre Freundschaft und die Unterstützung, die Arbeit doch noch zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Nicht zuletzt meinem lieben Ehemann, der mich in all den Jahren unerlässlich unterstützt und bestärkt hat und niemals den Glauben an mich verloren hat und meinen beiden Kindern Kasia und Inga, die mich in meinem Vorhaben immer unterstützt und motiviert haben!

