

**Molekulartoxikologische Untersuchungen
zur Wirkung von Gestagenen
auf Reproduktionsorgane der Ratte**

vorgelegt von
Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
Nicole Torno
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Stahl

Berichter: Prof. Dr. L. W. Kroh

Berichter: Prof. Dr. A. Hartwig

Berichter: Dr. K. Meyer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18.03.2011

Berlin 2011

D 83

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	4
2.1	Reproduktionsorgane der Ratte	4
2.1.1	Der Uterus.....	4
2.1.2	Die Mamma.....	4
2.2	Ovarielle Hormone.....	6
2.3	Mechanismen steroidaler Hormonrezeptorwirkungen	7
2.3.1	Der Progesteron-Rezeptor (PR)	8
2.4	Synthetische Gestagene	8
2.4.1	Pharmakologische Zweitwirkung	8
2.4.2	Neue Progestine	10
2.5	Präklinische Charakterisierung von Progestinwirkungen.....	10
2.5.1	Die Ratte als In-vivo-Modellsystem	10
2.5.2	Uterine In-vitro-Modellsysteme	11
3	Fragestellung	12
4	Material und Methoden.....	13
4.1	Testsubstanzen.....	13
4.1.1	Progesteron-Rezeptor-Ligand (PRL)	13
4.1.2	Promegeston (R5020)	13
4.1.3	Medroxyprogesteronacetat (MPA).....	14
4.1.4	Progesteron (P4).....	14
4.1.5	Levonorgestrel (LNG).....	15
4.2	In-vivo-Experimente	15
4.2.1	Versuchstiere	15
4.2.2	Haltungsbedingungen	16
4.2.3	Substanzapplikation	16
4.2.4	Organentnahme und Asservierung.....	16
4.3	In-vitro-Experimente.....	17
4.3.1	Zellkultivierung	17
4.3.2	Ermittlung des Wachstumsverhaltens.....	17
4.3.3	Beurteilung der Zytotoxizität	17
4.3.4	Substanzinkubation für Genexpressionsanalysen	18
4.4	Molekularbiologische Untersuchungen.....	18
4.4.1	Laser Capture Microdissection (LCM)	19
4.4.1.1	Anfertigen von Gefrierschnitten	19
4.4.1.2	Anfärben der Zielstrukturen	19
4.4.1.3	Mikrodissektion spezifischer Zellpopulationen	19
4.4.2	RNA-Isolierung.....	22
4.4.2.1	Quantifizierung	23
4.4.2.2	Qualitätskontrolle.....	23
4.4.2.3	cDNA-Synthese.....	23
4.4.2.4	Lineare Amplifizierung	23
4.4.3	Genexpressionsanalysen	24
4.4.3.1	Affymetrix GeneChip®-Experimente.....	24
4.4.3.1.1	Labeling und Hybridisierung	25
4.4.3.1.2	Datengenerierung	25
4.4.3.1.3	Qualitätskontrolle.....	25
4.4.3.1.4	Statistische Auswertung.....	26
4.4.3.1.5	Ermittlung der Lage eines Probe Sets innerhalb des entsprechenden Transkripts.....	27
4.4.3.2	TaqMan® Low Density Arrays (TLDA).....	27
4.4.3.2.1	Statistische Auswertung.....	28

4.5	Proteinbiochemie	29
4.5.1	Immunoblotting.....	29
4.5.1.1	Proteinextraktion	29
4.5.1.2	Quantifizierung	29
4.5.1.3	SDS-PAGE und Immunoblotting.....	30
4.5.2	Immunhistochemie (IHC).....	30
4.5.2.1	Immunhistochemische Färbung.....	31
4.5.2.2	Gewebekontrollen	31
5	Ergebnisse	32
5.1	Gestageneffekte am Uterus der Ratte.....	32
5.1.1	In-vivo-Experimente	32
5.1.1.1	Befunde konventioneller toxikologischer Parameter	32
5.1.1.2	Genexpressionsanalyse am Uterus.....	33
5.1.1.2.1	Multivariate Analyse.....	33
5.1.1.2.2	Univariate Analyse.....	36
5.1.1.2.2.1	Identifizierung von Markergenen zur Charakterisierung des pharmakologischen Effekts von Gestagenen am Uterus	39
5.1.1.2.3	Festlegung eines Markergensets	44
5.1.1.2.3.1	Verifizierung der Markergene	44
5.1.1.2.3.2	Bestätigung der Markergene	44
5.1.2	In-vitro-Experimente	45
5.1.2.1	Charakterisierung von ELT 3-Zellen	45
5.1.2.1.1	Zellkultivierung.....	45
5.1.2.1.2	Expression des PR	46
5.1.2.2	Genexpressionsanalyse an ELT 3-Zellen	47
5.1.2.2.1	Untersuchung der Markergene in ELT 3-Zellen	47
5.2	Gestageneffekte an der Mamma der Ratte	49
5.2.1	Etablierung der Laser Capture Microdissection (LCM)	49
5.2.1.1	Optimierung der Probenaufarbeitung.....	49
5.2.1.2	Vergleichende Genexpressionsanalyse.....	51
5.2.1.2.1	Multivariate Analyse.....	51
5.2.1.2.2	Univariate Analyse.....	53
5.2.1.2.3	Detektion zielzellspezifischer Gene	53
5.2.1.3	Einflussfaktoren auf das Genexpressionsprofil	55
5.2.1.3.1	Qualität von RNA und GeneChips®.....	55
5.2.1.3.2	Amplifizierungsprozess.....	58
5.2.1.3.2.1	Vergleich der Genexpressionsprofile.....	58
5.2.1.3.2.2	Vergleich detektierter Expressionsintensitäten	61
5.2.2	In-vivo-Experimente	62
5.2.2.1	Befunde konventioneller toxikologischer Parameter	62
5.2.2.2	Genexpressionsanalyse an der Mamma.....	62
5.2.2.2.1	Multivariate Analyse.....	62
5.2.2.2.2	Univariate Analyse.....	65
5.2.2.2.3	Analyse von Tumormarkergenen	69
5.2.2.3	Immunhistochemischer Nachweis des Oxytocin-Rezeptors (OXTR).....	71
6	Diskussion.....	73
6.1	Gestagene Wirkung am Uterus	73
6.1.1	Charakterisierung gemeinsamer Substanzeffekte	73
6.1.2	Charakterisierung spezifischer Substanzeffekte	81
6.1.3	Substanzeffekte an ELT 3-Zellen	83
6.1.3.1	Bewertung der Methoden zur Genexpressionsanalyse.....	84
6.1.4	Bewertung speziesübergreifender Markergene	85
6.2	Bewertung unterschiedlicher Methoden der Materialgewinnung zur Analyse gestagenbedingter Genexpressionsprofile der Rattenmamma	85
6.2.1	Anwendungsmöglichkeiten der LCM	86
6.2.2	Sensitivität der Detektion differenziell exprimierter Gene.....	86

6.2.3	Bewertung von Einflussfaktoren auf das Genexpressionsprofil.....	88
6.2.4	Abschließende Bewertung der LCM	89
6.3	Gestagene Wirkung an der Mamma.....	89
6.3.1	Charakterisierung gemeinsamer Substanzeffekte	89
6.3.2	Charakterisierung spezifischer Substanzeffekte	92
6.3.2.1	Charakterisierung spezifischer Proliferationseffekte	94
6.4	Abschließende Diskussion	96
7	Literaturverzeichnis	98
8	Anhang.....	111
8.1	Abkürzungsverzeichnis	111
8.2	Verwendete Feinchemikalien	116
8.3	Verwendete Kits.....	120
8.4	Verwendete Gebrauchslösungen.....	121
8.5	Verwendete Verbrauchsmaterialien	123
8.6	Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	125
8.7	Wachstumsverhalten der ELT 3-Zellen	128
8.8	Zytotoxische Substanzeffekte an ELT 3-Zellen	129
8.9	Quantifizierung Biotin-markierter aRNA mittels NanoDrop	129
8.10	Qualitätskontrolle isolierter RNA mittels Bioanalyzer	130
8.11	quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	131
8.12	Angewendetes PCR-Temperaturprogramm	131
8.13	Durchführung des immunhistochemischen Nachweises.....	131
8.14	Überprüfung der Amplifizierungseffizienz der verwendeten TaqMan® Gene Expression Assays.....	133
8.15	Überprüfung der Stabilität der endogenen Kontrollgene.....	135
8.16	Tabellen.....	136
9	Publikationsliste.....	151
10	Danksagung	152

1 Zusammenfassung

Uterus und Mamma gehören zu den Reproduktionsorganen der Ratte und sind damit Zielorgane weiblicher Geschlechtshormone, insbesondere der ovariellen Hormone Estrogen (E2) und Progesteron (P4). Diese regulieren im Wesentlichen Wachstum und Differenzierung sowie die Funktion der Reproduktionsorgane und entfalten ihre Effekte dabei hauptsächlich über spezifische Rezeptoren, den Estrogen- (ER) bzw. Progesteron-Rezeptor (PR). Synthetische Gestagene (Progestine) wirken an Reproduktionsorganen progesteronähnlich und werden daher insbesondere zur oralen Kontrazeption oder Hormonersatztherapie beim Menschen angewendet. Als PR-Agonisten entfalten sie analog zu P4 ihre wesentlichen Effekte über diesen Rezeptor, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Affinität, an den PR zu binden. Außerdem können verschiedene Progestine zusätzlich an weitere Steroidhormonrezeptoren binden, worauf deren teilweise unterschiedlichen pharmakologischen Zweitwirkungen beruhen.

Vor diesem Hintergrund sollten die Wirkprofile verschiedener synthetischer Gestagene hinsichtlich gemeinsamer und unterschiedlicher Effekte an den Reproduktionsorganen Uterus und Mamma als pharmakologische und toxikologische Targetorgane der Ratte charakterisiert und mechanistisch interpretiert werden. Dazu wurde je sechs weiblichen Ratten einer Behandlungsgruppe über 28 Tage täglich eines von vier synthetischen Gestagenen (Progesteron-Rezeptor-Ligand, Promegeston, Medroxyprogesteronacetat, Progesteron) in zwei unterschiedlichen Dosierungen appliziert. Dabei entsprach die niedrigere Dosis der pharmakologisch wirksamen, die höhere dem 10-fachen dieser Dosis. Die Zielorgane Uterus und Mamma wurden schließlich zur Erfassung konventioneller toxikologischer Parameter (Organgewichte und Histologie) sowie für nachfolgende Genexpressionsanalysen herangezogen. Außerdem sollten ausgewählte Substanzeffekte mittels spezifischer Technologien eingehender untersucht werden. Abschließend sollte der Beitrag der molekularbiologischen Untersuchungen für eine pharmakologisch-toxikologische Charakterisierung der Testsubstanzen bewertet und mit dem Beitrag der konventionellen Parameter verglichen werden.

Neben der Erfassung der oben genannten konventionellen Parameter wurden zunächst Genexpressionsprofile des Uterus untersucht. Die erhobenen Daten verdeutlichten einen gemeinsamen Wirkmechanismus der vier Progestine bei pharmakologisch wirksamer Dosis, der die erwarteten und histologisch beobachteten Effekte widerspiegelte. Um diese näher charakterisieren und interpretieren zu können, wurde anhand der Genexpressionsdaten ein Set aus Markergenen, das diesen gemeinsamen Effekt am Rattenuterus beschreibt, zusammengestellt und biologisch plausibilisiert. Demnach entfalteten alle vier Gestagene im Wesentlichen einen inhibitorischen Effekt auf den Zellzyklus, was sich anhand der Repression zellzyklusrelevanter Gene wie *Ccna2* und *Ccnb2* zeigte. Dies resultierte in der Verminderung E2-vermittelter Proliferation, was beispielsweise durch die Induktion des Gens *Igfbp1* oder die Repression des Gens *Mmp7* belegt werden konnte und mit der histologisch beobachteten Atrophie des Uterus übereinstimmte. Gleichzeitig wurde die funktionelle Differenzierung zur Vorbereitung des Uterus auf eine mögliche Implantation stimuliert. Dies wurde beispielsweise durch die Repression des Gens *Tcfap2c* deutlich und zeigte sich histologisch anhand der gesteigerten Sekretion der Uterus-Drüsen. Dieser allen vier Substanzen gemeinsame gestagene Effekte konnte insbesondere auf die PR-vermittelte Signalgenerierung der Progestine zurückgeführt werden. Darüber hinaus wurden spezifische

Substanzeffekte von MPA insbesondere für die hohe Dosis deutlich. Diese zeigten sich histologisch anhand der beobachteten abweichenden Befunde verstärkter Atrophie und damit einhergehender verminderter Organgewichte sowie anhand der Genexpressionsprofile. Hinsichtlich relevanter Wirkmechanismen für die differenzierten Effekte von MPA scheinen dessen im Vergleich zu den übrigen drei Progestinen zusätzlicher androgener und glucocorticoider Partialeffekt von hoher Relevanz zu sein.

Im Rahmen der Entwicklung neuer Gestagene ist außerdem eine möglichst frühe Prädiktion deren pharmakologischer Wirkungen am Uterus von Interesse. Aufgrund begrenzter Substanzverfügbarkeit und den zunehmenden Bemühungen, die Anzahl an Tierexperimenten zukünftig zu reduzieren, sollte daher ein geeignetes In-vitro-Testsystem zur Prädiktion von Substanzeffekten in vivo identifiziert werden. Dazu wurden ELT 3-Zellen (uterine Leiomyomzellen der Eker-Ratte) über 6, 12 und 24 h mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der oben genannten vier Gestagene behandelt. Deren Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie vergleichbar zu den jeweiligen Dosierungen der entsprechenden In-vivo-Experimente waren. Anschließend wurden die anhand der In-vivo-Experimente an Ratten identifizierten Markergene sowie bekannte Humangene, die den gemeinsamen Effekt von Gestagenen am Uterus charakterisieren, zusammengestellt. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit dieser Markergene wurde deren Expression im ELT 3-Probenmaterial qualitativ mit der in den Uterus-Proben der Ratten verglichen, anhand derer die Markergene ursprünglich identifiziert wurden. Insgesamt 13 Gene erwiesen sich so als geeignet, um im Rahmen eines frühen In-vitro-Screeningsystems mit ELT 3-Zellen gestagene Effekte der vier Testsubstanzen am Rattenuterus anzuzeigen. Insbesondere die Expression der Gene *Sgk1*, *Spp1* und *Dnase1l3* scheint dabei zwischen diesem In-vivo- und In-vitro-Testsystem vergleichbar zu sein. Zwischen den Spezies Mensch und Ratte wies die Expression der Gene *Sgk1*, *Cyb5b*, *Cxcl14* und *Cldn4* die besten Übereinstimmungen auf.

Um die Wirkung der vier Gestagene an der Mamma zu untersuchen, wurde zunächst die Methode der Laser Capture Microdissection (LCM) zur Separierung und Analyse spezifischer Zielzellen von Gestagenen (Drüsenepithelien) aus dem komplexen Mamma-Gewebe etabliert. Dazu wurden die mittels LCM und aus Gesamtgeweben der gleichen Organproben generierten Transkriptionsprofile verglichen und charakterisiert. Die Aufarbeitungsmethode der LCM lieferte Proben mit hoher zielzellspezifischer Information, was sich anhand der wesentlich höheren Expressionslevel spezifischer epithelialer Differenzierungsmarker (*Wap*, *Lalba*, *Csn1s1*, *Csn3*) in diesen Proben verdeutlichte. Die Methode sollte daher zur Anwendung kommen, wann immer eine zelltypspezifische Genexpression für eine umfassende Bewertung erforderlich ist. Hinsichtlich der Analyse umfassender gestagenbedingter Genexpressionsprofile der Mamma war sie hingegen weniger geeignet als die Aufarbeitung von Gesamtgeweben. So beeinflussten neben den selektierten Drüsenepithelien auch die übrigen Zelltypen des Mamma-Gewebes dessen gestagenbedingtes Genexpressionsprofil und leisteten dadurch einen erheblichen Beitrag zur Beschreibung der gestagenen Effekte an der Mamma.

Zur Untersuchung der Wirkprofile der vier Progestine an der Mamma wurden daher neben der Erfassung der oben genannten konventionellen toxikologischen Parameter umfassende Genexpressionsprofile von Gesamtgeweben der Mamma untersucht. Dabei verdeutlichten auch die an der Mamma erhobenen Daten einen gemeinsamen Wirkmechanismus der vier Progestine, der im Wesentlichen in der Regulation von Wachstum und Differenzierung bestand und insbesondere auf deren gemeinsame Signalgenerierung über den PR zurückgeführt werden konnte. So ließ die übereinstimmende Induktion der Gene *Wap*,

Fabp3, *Aqp3* und *Muc1* auf eine Stimulation der Produktion und Sekretion der Muttermilch als physiologischer Funktion der Mamma schließen. Dies entsprach dem erwarteten Gestageneffekt und spiegelte sich in der histologisch beobachteten Sekretion und lobulären Hyperplasie wider. Außerdem wurden im Vergleich zum Uterus wesentlich ausgeprägtere Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzeffekten deutlich. Diese zeigten sich anhand der Deregulierung überwiegend unterschiedlicher Gene sowie des unterschiedlichen Ausmaßes der Induktion bzw. Repression gleicher Gene. Zurückzuführen ist sie vermutlich darauf, dass neben der Signalgenerierung ovarieller Hormone über den PR auch weitere, beispielsweise lactogene Hormone wie Prolactin zur Regulation der Genexpression in der Mamma beitragen. Abweichungen von den Wirkprofilen der übrigen Gestagene wurden im Wesentlichen für die hohe MPA-Dosis deutlich. So reflektierten die histologisch beobachteten hyperplastischen Lobuli der Mammæ zwar den proliferativen Zustand des Organs infolge von Gestageneinwirkung. Die Mehrschichtigkeit der Epithelien stellte jedoch einen deutlichen Unterschied zu den restlichen Progestinen dar. Anhand der Genexpressionsdaten wurde dieser zusätzliche Proliferationseffekt von MPA auf dessen androgenen und glucocorticoiden Partialeffekt zurückgeführt, durch die sich dieses Gestagen von den übrigen drei wesentlich unterscheidet. So wurden dadurch vermutlich intrazelluläre Signalwege wie der Jak/Stat- oder Wnt-Signalweg, die Schlüsselfunktionen zur Kontrolle der epithelialen Proliferation erfüllen, im Vergleich zu den anderen drei Progestinen unterschiedlich dereguliert, infolge dessen sich die Effekte von MPA deutlich von diesen unterscheiden.

Aufgrund der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnten die angewendeten molekularbiologischen Untersuchungen abschließend als wesentliche Ergänzung des Informationsgehalts der konventionellen toxikologischen Parameter bewertet werden. Sie lieferten zusätzliche Informationen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise der vier Testsubstanzen und konnten so einen zusätzlichen Beitrag zu deren pharmakologisch-toxikologischer Charakterisierung leisten.

2 Einleitung

2.1 Reproduktionsorgane der Ratte

Die weiblichen Reproduktionsorgane der Ratte umfassen wie bei allen Säugetieren die Ovarien, die Eileiter, den Uterus, die Cervix, die Vagina sowie die Mamma. Dabei variiert das makroskopische und mikroskopische Erscheinungsbild mit dem jeweiligen Stadium des Reproduktionszyklus (1-3). Der Schwerpunkt der Charakterisierung der gestagenen Wirkung wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation auf die Organe Uterus und Mamma gelegt.

2.1.1 Der Uterus

Anatomisch besteht der Uterus der Ratte aus zwei langen paarigen Hörnern, die in einen kurzen Corpus mit einfacher Cervix münden. Histologisch setzt er sich aus dem luminalen Endometrium (Schleimhaut), dem darunter liegenden Myometrium (Muskelschicht) und bauchhöhlenseitig aus dem Perimetrium (Bauchfellüberzug) zusammen. Das Endometrium besteht dabei aus dem Oberflächenepithel und der darunterliegenden Bindegewebsschicht (Lamina propria). Im Propriagewebe enthalten sind die endometrialen Drüsen und lymphoretikuläres Bindegewebe, an das sich das Myometrium in Form einer inneren Kreismuskelschicht und einer äußeren Längsmuskelschicht anschließt (1). Das Epithel des luminalen Endometriums und der uterinen Drüsen ist ein iso- bis hochprismatisches Zylinderepithel, wobei die Morphologie der Zylinderepithelien infolge zyklischer Hormonschwankungen Veränderungen von flach und breit bis schmal und hoch unterliegt (2).

Physiologisch ist der Uterus der Ratte wie bei allen Säugetieren für die Fertilität und Gesundheit des Weibchens sowie der Nachkommen von wesentlicher Bedeutung. Dazu erfüllt er verschiedene Funktionen wie den Transport, die Speicherung und Reifung der Spermien, die Bereitstellung einer embryotrophen Umgebung für Wachstum und Entwicklung der befruchteten Eizelle sowie die Erleichterung deren Implantation. Zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit wird schließlich auch die myometriale Kontraktion unterdrückt und letztlich zur Entbindung des Fetus zur Geburt stimuliert (1; 4).

Die funktionelle Differenzierung des Säugeruterus wird insbesondere durch ovarielle Hormone reguliert. Darüber hinaus gehören aber auch Prolactin, Wachstumsfaktoren, wie Insulin-Like Growth Factors (IGFs), Zielgene verschiedener regulatorischer Signalwege sowie epitheliale-stromale Interaktionen, beispielsweise über Matrix Metalloproteinasen, zu den essenziellen Regulatoren uteriner Funktionen (1; 4).

2.1.2 Die Mamma

Ratten verfügen über insgesamt sechs paarige Mammae, die sich von den Speicheldrüsen bis hin zur Perianalregion erstrecken und dementsprechend je nach anatomischer Lage als cervical, cranial thoracal, caudal thoracal, abdominal, cranial inguinal und caudal inguinal bezeichnet werden. Das Drüsengewebe jeder einzelnen Mamma ist dabei in ein Bindegewebsstroma im Fettgewebe eingebettet und in Lobuli angeordnet. Es besteht aus

terminalen sekretorischen Alveolen, die über ein System von verzweigten Kanälchen mit Hauptgängen verbunden sind, die wiederum in die Brustwarze münden (5). Histologisch ist das Kanalsystem durch zweischichtiges, die terminalen Kanäle und Alveolen durch einschichtiges kuboidales Epithel ausgekleidet, wobei deren Morphologie analog zum Uterus der Ratte infolge zyklischer Hormonschwankungen von flach und breit bis schmal und hoch variiert (Abbildung 1) (3; 6). Für die Synthese und Sekretion der Milch verantwortlich sind dabei die luminalen Epithelien der Alveolen, die das funktionell differenzierte, sekretorische Epithel der Mamma darstellen. Umgeben werden diese dazu ebenso wie die luminalen Epithelien des Kanalsystems von einer diskontinuierlichen Schicht sternförmiger Zellen, den Myoepithelzellen. Deren dendritische Arme umgeben die basale Membran der alveolären Epithelien und führen auf Oxytocin-Stimulation hin zur Kontraktion der Alveolen und damit dem Milcheinschießen während des Säugens (3; 7).

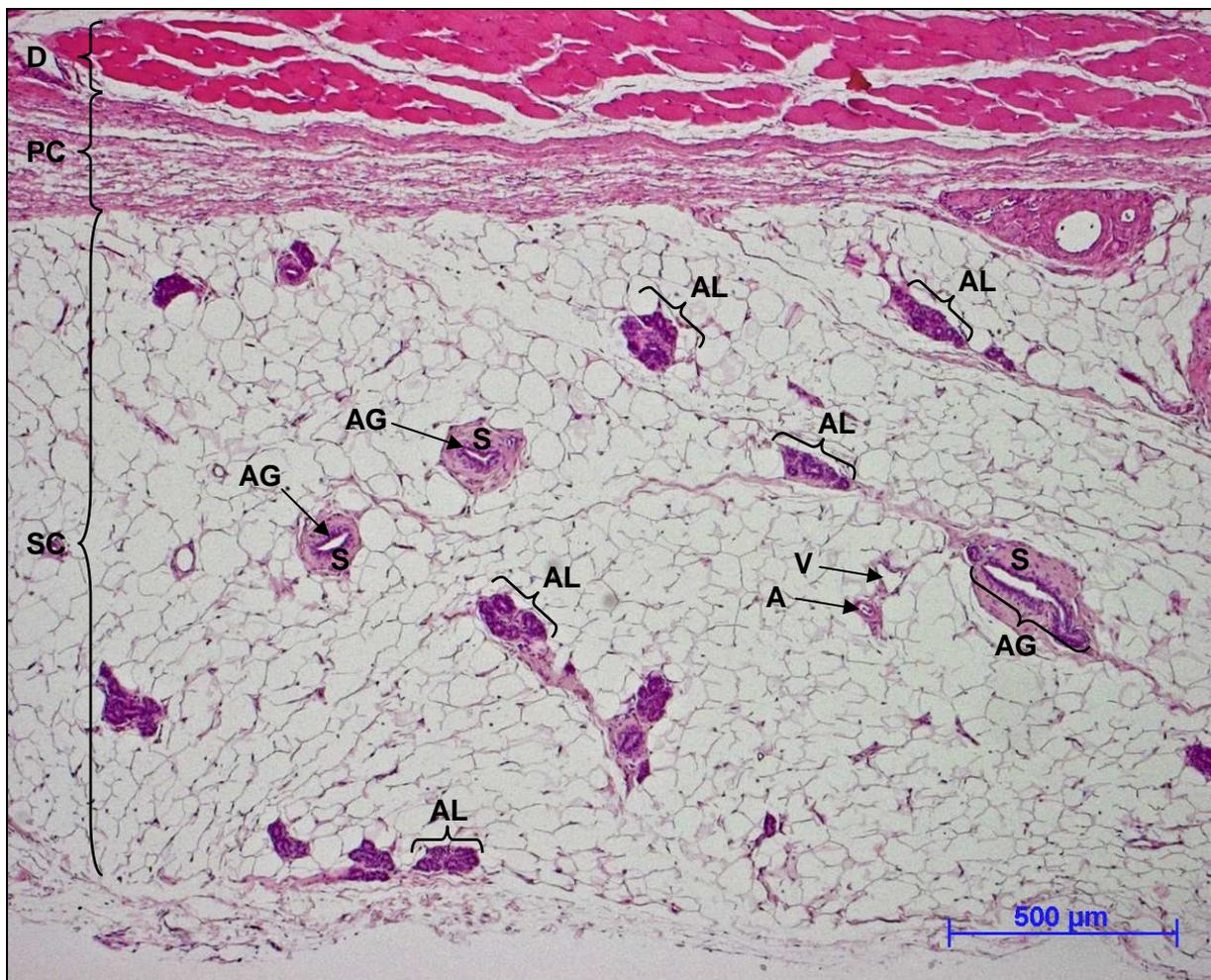


Abbildung 1 – Gewebeschnitt (HE-Färbung) der Mamma einer weiblichen Ratte (Vehikelkontrolle der In-vivo-Experimente, siehe 4.2). D: Dermis (Lederhaut); PC: Panniculus carnosus (Muskelschicht des subcutanen Gewebes); SC: Subcutis (Unterhaut), hauptsächlich aus Fettgewebe bestehend; AG: Ausführungsgang; AL: Alveolen, gebildet von Drüsenepithelien; S: Stroma, bindegewebsreich; A: Arteriole; V: Venole

Als modifizierte Hautdrüse werden die Mammae sowohl in männlichen wie auch in weiblichen Säugetieren ausgebildet (6). Während die Mammae der Männchen jedoch rudimentär bleiben (5), besteht deren wesentliche physiologische Funktion in Weibchen in

der Synthese, Speicherung und Sekretion der Milch, die zur Ernährung und Immunabwehr der Nachkommen essenziell ist (8; 9).

Die Regulation der Proliferation, funktionellen Differenzierung sowie des Remodeling und apoptotischer Prozesse in der Rattenmammary erfolgt insbesondere durch ovarielle Hormone, aber auch durch mammaryogene Hormone wie Insulin, Corticoide und Prolactin (5; 8; 10).

2.2 Ovarielle Hormone

Als biochemische Botenstoffe übermitteln Hormone Informationen von einem Organ oder Gewebe zum anderen. Geschlechtshormone stellen dabei eine Klasse von Hormonen dar, die von spezialisierten Zellen der weiblichen bzw. männlichen Geschlechtsorgane gebildet werden. So werden Androgene wie Testosteron in den Leydig-Zellen der Hoden synthetisiert, Estrogene und Gestagene hingegen in den Theca- und Granulosa-Zellen der Ovarien. Zu den wesentlichen ovariellen Hormonen von Säugern gehören dabei das folliculäre Hormon Estrogen (E2) und das Gelbkörperhormon Progesteron (P4), die für die Fortpflanzung und Entwicklung des Organismus essenziell sind. Reguliert wird die Produktion dieser Sexualsteroiden in den entsprechenden Zielgeweben durch die Gonadotropine Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH), die nach Stimulation durch das hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon vom Hypophysenvorderlappen sezerniert werden.

Zu den wichtigsten weiblichen Geschlechtshormonen aus der Klasse der Steroidhormone gehört E2, das insbesondere im Follikel und Corpus Luteum der Ovarien, der Placenta und zu einem geringen Anteil auch in der Nebennierenrinde synthetisiert wird. Die vielfältigen Wirkungen des Follikelhormons umfassen im Wesentlichen die Regulation von Wachstum, Differenzierung und der Funktion der Reproduktionsorgane Uterus, Vagina, Ovarien und der Mammary, betreffen darüber hinaus aber auch das Knochengewebe, Herz-Kreislauf-System und Gehirn (4; 11). Die zweite wichtige Klasse weiblicher Geschlechtshormone stellen die Gestagene dar. Zu diesen gehört auch das Steroidhormon P4, das hauptsächlich im Corpus Luteum des Ovars, darüber hinaus aber auch in den Nebennieren, dem Gehirn und der Placenta synthetisiert wird. Zu den Zielorganen physiologischer Wirkungen dieses Gestagens in Säugern gehören dabei nicht nur die Reproduktionsorgane Uterus, Ovarien oder die Mammary, sondern auch das Gehirn. In der komplexen Regulation der weiblichen Reproduktionsfunktion stellt P4 somit eine Schlüsselkomponente dar und beeinflusst als solche die Regulation von Entwicklung und Differenzierung sowie die Fertilität, Implantation und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit (4; 12).

Während des Reproduktionszyklus unterliegen die zirkulierenden Level der ovariellen Hormone zyklischen Veränderungen. Bei der weiblichen Ratte wird dieser als Estrus-Zyklus bezeichnet und beinhaltet die vier Phasen Di-Estrus (55-57 h), Pro-Estrus (12-14 h), Estrus (25-27 h) und Met-Estrus (6-8 h) (2). Der hormonelle Verlauf ist dabei im Wesentlichen durch hohe E2-Level während des Pro-Estrus und hohe P4-Level während des Pro-Estrus und Estrus charakterisiert. Ihr maximales Level erreichen letztere infolge des deutlichen LH-Peaks während des Pro-Estrus beim Übergang zum Estrus, dem Zeitpunkt der Ovulation. Zum Ende des Estrus bildet sich der Corpus Luteum wieder zurück infolge dessen die zirkulierenden P4-Level deutlich abnehmen. Damit entspricht der Estrus-Zyklus der Ratte weitgehend dem Menstruationszyklus der Frau mit der E2-reichen Follikel-Phase (10 Tage), der P4-reichen Luteal-Phase (14 Tage) und der hormondefizienten Menstruations-Phase (4 Tage) (zusammengefasst in (13)).

2.3 Mechanismen steroidaler Hormonrezeptorwirkungen

Die in den Ovarien synthetisierten Hormone erreichen über das Blut oder die Gewebeflüssigkeiten das jeweilige Zielgewebe. Hier gelangen sie aufgrund ihrer geringen Größe und lipophilen Eigenschaften durch einfache oder erleichterte Diffusion ins Zellinnere, wo sie an die entsprechenden Hormonrezeptoren binden. Steroidhormone wie E2 und P4 entfalten ihre wesentlichen Effekte dabei durch Bindung an Steroidhormonrezeptoren, wie den Estrogen- (ER) bzw. Progesteron-Rezeptor (PR) (7; 14). Diese gehören zur Superfamilie nukleärer Rezeptoren von Transkriptionsfaktoren und werden in den Zielorganen der Wirkung ovarieller Hormone, wie dem Uterus und der Mamma, stark exprimiert (7; 14; 15). Hier sind sie im Zytosol oder Zellkern lokalisiert und liegen in Abwesenheit des entsprechenden Liganden in einem inaktiven Komplex mit Hitzeschockproteinen vor. Nach Bindung des entsprechenden Liganden kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, infolge dessen das Hitzeschockprotein dissoziiert und der ligandgebundene Steroidhormonrezeptor dimerisiert. Dabei werden in der Regel Homodimere gebildet. In dieser aktivierten Form kann der Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern translozieren, wo er als Transkriptionsfaktor an die entsprechenden Hormon-Response-Elemente (HRE) in der Promotorregion entsprechender Zielgene bindet und die Transkription nach Rekrutierung verschiedener weiterer Transkriptionsfaktoren und Coregulatoren moduliert (14; 15).

Darüber hinaus können Steroidhormonrezeptoren auch die Transkription von Zielgenen regulieren, deren Promotorregion keine HREs aufweisen. Dieser Mechanismus erfordert die Interaktion zwischen dem ligandgebundenen Rezeptor und weiteren sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5). So kann die Transkription entsprechender Zielgene erleichtert werden, ohne dass der ligandgebundene Rezeptor direkt an die DNA bindet (15).

Zusätzlich zu solchen direkten rezeptorvermittelten Wirkungen, können die Effekte der ovariellen Hormone auch indirekt über die Synthese autokriner und/oder parakriner Faktoren vermittelt werden (1; 4). Diese können beispielsweise hinsichtlich der Regulation zellulärer Proliferation und Differenzierung von Bedeutung sein, da die Expression des ER und PR physiologischerweise während des Estrus-Zyklus variiert (14) und in proliferierenden Zellen deutlich reprimiert wird (16). So kann P4 beispielsweise infolge direkter Signalgenerierung über den PR zur Induktion von Wnt-Proteinen führen. Über parakrine Mechanismen können diese schließlich den Wnt-Signalweg in benachbarten Zellen aktivieren und damit zur Modulation verschiedener Zielgene zur Kontrolle der Embryonalentwicklung wie auch der epithelialen Proliferation und Differenzierung der Mamma führen (10).

Neben diesen genomischen Wirkungen von Steroidhormonrezeptoren weisen einige zusätzlich auch nicht-genomische Wirkungen auf. Gekennzeichnet sind diese dabei durch wesentlich schnelleres Auftreten physiologischer Effekte, da im Gegensatz zur genomischen Wirkung weder Transkription noch Translation erfolgen. Vermittelt werden solche Mechanismen, indem das Steroidhormon den entsprechenden Rezeptor im Zytoplasma bindet und dadurch zur Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade führt. Über eine solche Rezeptorbindung kann P4 beispielsweise zu einer Interaktion des PR mit der Src/Ras/Erk-Signalkaskade sowie dem PI-3-K/PKB(AKT)-Signalweg führen, die für zelluläre Funktionen wie die Proliferation bedeutend sind (15).

2.3.1 Der Progesteron-Rezeptor (PR)

P4 vermittelt seine wesentlichen physiologischen Effekte in Zielzellen über den steroidalen PR und interagiert dazu mit beiden existierenden natürlichen Isoformen, PR-A und PR-B. Codiert durch dasselbe Gen unterscheiden sich die beiden Rezeptortypen durch zusätzliche 160 aminoterminalen Aminosäuren des PR-B und damit teilweise in ihrer funktionellen Aktivität (4; 17). So fungiert der PR-B als deutlich stärkerer Aktivator von Zielgenen, während der PR-A als dominanter Repressor des PR-B und damit gestagener Wirkung agieren kann. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Rezeptorsubtypen hinsichtlich ihrer Gewebsspezifität. Dass die Expression des PR-A bei Nagern die des PR-B dominiert (4) (3:1 im Uterus der Ratte (18) bzw. 2:1 in der Mamma der Maus (17)), hat damit beispielsweise gewebsspezifische Effekte von Gestagenen zur Folge. Dass beide PR-Isoformen demgegenüber im humanen Uterus beispielsweise äquimolar exprimiert werden, kann speziesspezifische Unterschiede gestagener Wirkungen erklären. Die Sensitivität eines Gewebes gegenüber Gestagenen scheint damit auch vom jeweiligen Verhältnis der beiden PR-Isoformen abhängig zu sein (4).

2.4 Synthetische Gestagene

Synthetische Gestagene (Progestine) werden seit Anfang der 1960er Jahre weit verbreitet in der Hormontherapie bei der Frau eingesetzt. So finden sie beispielsweise zur Behandlung postmenopausaler Symptome allein oder in Kombination mit Estrogenen Anwendung in der Hormonersatz-Therapie (Hormone Replacement Therapie, HRT). Aufgrund ihrer hemmenden Eigenschaften auf die Ovulation und die E2-induzierte Proliferation des Uterus-Epithels werden sie außerdem zur oralen Kontrazeption bei der Frau angewendet (19; 20). Abgeleitet werden die synthetischen steroidalen Gestagene von den natürlichen Sexualsteroiden P4 oder Testosteron sowie Spironolacton. In Abhängigkeit davon variieren die einzelnen Progestine in ihrer chemischen und räumlichen Struktur und werden dementsprechend klassifiziert (21-23). Zu den P4-Derivaten gehören die Norpregnan-Derivate wie das Promegeston (R5020) und die Pregnan-Derivate wie das Medroxyprogesteronacetat (MPA). Testosteron-Derivate werden außerdem in nicht-acetylierte und acetylierte Derivate unterteilt, wobei letztere die Gruppe der Gonane wie das Levonorgestrel (LNG) und die Gruppe der Estrane umfassen, zu denen auch das erste synthetisierte Progestin Norethynodrel gehört (21; 23). Zu einer neuen Generation von Progestinen mit differenziertem Wirkprofil gehören die Spironolacton-Derivate wie das Drospirenon (23; 24). Zunehmend werden neben diesen steroidalen Progestinen außerdem nicht-steroidale PR-Agonisten synthetisiert, zu denen auch der im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchte Progesteron-Rezeptor-Ligand (PRL) gehört. Deren Entwicklung befindet sich jedoch noch in einer sehr frühen Phase (25).

2.4.1 Pharmakologische Zweitwirkung

Im Wesentlichen werden die Effekte synthetischer Gestagene über den PR vermittelt und sind daher größtenteils vergleichbar (19). Neben dieser gemeinsamen Wirkung zeichnen sich die verschiedenen Progestine jedoch auch durch unterschiedliche pharmakologische Zweitwirkungen aus. So variieren sie in Abhängigkeit von ihrer jeweils zu Grunde liegenden chemischen Kernstruktur (P4, Testosteron oder Spironolacton) und gemäß ihrer spezifischen

räumlichen Struktur hinsichtlich ihrer Spezifität zum PR und der Interaktion mit weiteren Steroidhormonrezeptoren (Tabelle 1), wie auch in Hinblick auf die jeweilige relative Bindungsaffinität zu diesem Rezeptor (Tabelle 2) (19; 23; 25). Da die verschiedenen Liganden einen unterschiedlichen Einfluss auf aktivierte Coregulatoren haben, ist auch das Gleichgewicht zwischen den durch das Progestin rekrutierten Coaktivatoren und Corepressoren im jeweiligen Zielorgan entscheidend dafür, ob der insgesamt Effekt des Moleküls agonistisch oder antagonistisch ist (15; 25).

Tabelle 1 – Steroidhormonrezeptor-Spezifitäten von R5020, MPA, P4, LNG und PRL.

Progestin	PROG	ESTR	AESTR	ANDR	AANDR	GLUC	AGLUC	AMC
R5020	+	-	+	-	-	-	+	+/-
MPA	+	-	+	+	-	+	+	-
P4	+	-	+	-	+	+/-	+	+
LNG	+	-	+	+	-	-	+/-	+/-
PRL*	+	n.b.	n.b.	-	-	-	n.b.	-

PROG: progestagen; ESTR: estrogen; AESTR: antiestrogen; ANDR: androgen; AANDR: antiandrogen; GLUC: glucocorticoid; AGLUC: antiglucocorticoid; AMC: antimineralcorticoid; Biologische Aktivität am Steroidhormonrezeptor: + vorhanden; - nicht vorhanden (19; 20; 26-30) * In-house-Daten; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 2 – Relative Bindungsaffinitäten von R5020, MPA, P4, LNG und PRL zu verschiedenen Steroidhormonrezeptoren.

Progestin	Relative Bindungsaffinität (%)				
	PR	ER	AR	GR	MR
R5020	100	0	0	5	53
MPA	115	0	5	29	160
P4	50	0	0	10	100
LNG	150	0	45	1	75
PRL*	148 ^a	0 ^b , 1 ^c	14	238	126

Angegeben sind die prozentualen Bindungsaffinitäten der Progestine bezogen auf das jeweilige Referenzsteroid. PR: Progesteron-Rezeptor (Promegeston = 100 %, ^aProgesteron = 100 %), ER: Estrogen-Rezeptor, ^balpha / ^cbeta (17 β -Estradiol = 100 %), AR: Androgen-Rezeptor (Metribolon = 100 %), GR: Glucocorticoid-Rezeptor (Dexamethason = 100 %), MR: Mineralcorticoid-Rezeptor (Aldosteron = 100 %) (19) * In-house-Daten

Progestine wie R5020, MPA, P4, LNG oder PRL können daher nicht nur mit dem PR interagieren und gestagene Effekte vermitteln, sondern teilweise auch an verschiedene weitere Steroidhormonrezeptoren wie den ER, Androgen-Rezeptor (AR), Glucocorticoid-Rezeptor (GR) oder Mineralcorticoid-Rezeptor (MR) binden und zu dessen Aktivierung oder Inhibition führen (19; 20; 25-30). In Abhängigkeit von diesen verschiedenen Interaktionen können die einzelnen Progestine unterschiedliche pharmakologische Zweitwirkungen entfalten (21). So zeichnet sich R5020 wie alle Norpregnan-Derivate durch eine vergleichsweise selektivere Bindung an den PR und nur sehr geringe Interaktionen mit weiteren Steroidhormonrezeptoren aus. Aufgrund dieser Eigenschaften wird R5020 auch als reines Progestin bezeichnet (21) und als Referenzsubstanz eingesetzt. Für den humanen Gebrauch ist es nicht zugelassen. MPA hingegen ist als P4-Derivat einerseits ein potentes Progestin und Antiestrogen, zeichnet sich außerdem jedoch durch androgene und starke glucocorticoidale Partialeffekte aus (19; 26). Damit umfasst das Wirkprofil von MPA beispielsweise zusätzliche Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel oder das verstärkte Auftreten von Akne, was auf dessen androgenen Partialeffekt zurückgeführt werden kann. Vermehrte Salz- und Wasserretention mit Auswirkung auf Gewicht und Blutdruck resultieren hingegen aus der aktivierenden Bindung an den GR. Anwendung findet MPA zur Kontrazeption bei der Frau, in der HRT nach der Menopause wie auch bei

Menstruationsbeschwerden oder zur Behandlung von Endometriose (23). Als natürliches Gelbkörperhormon entfaltet P4 hauptsächlich agonistische Effekte am PR und antagonistische Effekte am ER und AR. Das resultierende Wirkprofil umfasst daher insbesondere typisch gestagene Effekte. Die Interaktion mit dem AR (19) wirkt sich dabei günstig bei der Behandlung von Akne oder Hirsutismus aus. Die antagonistische Bindung an den MR und GR führt zu einer verminderten Wasserretention (19; 23). Auch LNG findet Anwendung zur oralen Kontrazeption bei der Frau. Neben gestagene Effekten am PR und antiestrogenen Effekten am ER zeichnet sich dieses Testosteron-Derivat (Gonon) aufgrund seiner chemischen und räumlichen Struktur durch zusätzliche agonistische Effekte am AR aus. Glucocorticoide Effekte und damit einen Einfluss auf den Salz- und Wasserhaushalt hat es jedoch nicht (19; 23). Auch PRL stellt einen potenten Agonisten am PR dar. Zusätzliche Effekte am AR sowie agonistische Effekte am GR oder antagonistische Effekte am MR vermittelt dieses Progestin jedoch nicht. Ob Interaktionen mit dem ER erfolgen oder antagonistische Effekte am GR vermittelt werden, ist nicht bekannt. Bestimmt war dieses nicht-steroidale Progestin aus einer frühen Entwicklungsphase zur E2-freien oralen Kontrazeption bei der Frau (In-house-Daten).

2.4.2 Neue Progestine

Vor dem Hintergrund unterschiedlicher pharmakologischer Zweitwirkungen, steht für die Entwicklung neuer Progestine zur hormonellen Therapie zunehmend die Entwicklung von synthetischen Gestagenen mit verbesserter Selektivität im Vordergrund, deren Aktivität auf bestimmte Rezeptoren optimiert bzw. ähnlich zu der physiologischen Progesterons ist. Obwohl bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob Progestine in der Lage sind, an die beiden PR-Isoformen spezifisch zu binden und ob dies hinsichtlich der zellulären Proliferation in der Brust von klinischer Relevanz ist (25), könnte in diesem Zusammenhang für die Entwicklung neuer Progestine beispielsweise von Bedeutung sein, dass die Proliferationsaktivität des PR-A in der murinen Mamma beispielsweise im Vergleich zum PR-B geringer ist und eine PR-A-selektive Aktivierung über PR-A-selektive Liganden und Agonisten daher adverse Proliferationswirkungen an der Mamma einschränken könnte (17). Vor diesem Hintergrund sollte beispielsweise der nicht-steroidale PRL als PR-A-selektiver Ligand zur E2-freien oralen Kontrazeption bei der Frau entwickelt werden. Dessen nähere Charakterisierung hat jedoch gezeigt, dass diese gewünschte Spezifität nicht gegeben war.

2.5 Präklinische Charakterisierung von Progestinwirkungen

2.5.1 Die Ratte als In-vivo-Modellsystem

Die Ratte ist eine etablierte Nager-Spezies für die präklinische Charakterisierung von Arzneimittelkandidaten und wird deshalb als gängige Versuchstierspezies zur Bewertung deren pharmakologischer und toxikologischer Eigenschaften eingesetzt. So wird zur In-vivo-Charakterisierung von Progestinwirkungen beispielsweise insbesondere der Schwangerschaftserhaltungssassay als Pharmakologie-Modell angewendet (31), da die Schwangerschaftserhaltung in Säugetieren entscheidend von gestagener Aktivität abhängt. Dazu werden weibliche Ratten zunächst mit männlichen verpaart. An Tag acht der

Trächtigkeit werden sie ovariectomiert und bis Tag 18 täglich mit unterschiedlichen Dosierungen des entsprechenden Gestagens in Kombination mit einer konstanten E₂-Konzentration behandelt. An Tag 18 der Trächtigkeit werden die Tiere getötet und die Anzahl lebender Embryos gezählt. Als Effektivdosis 50 % (ED₅₀) der Schwangerschaftserhaltung wird dabei diejenige Dosis bezeichnet, bei der 50 % der Embryos im Vergleich zur scheinovariectomierten Vehikelkontrolle lebendig waren. Ergebnisse dieses Pharmakologie-Modells wurden beispielsweise zur Dosisauswahl bei den verwendeten Gestagenen für die In-vivo-Experimente an Ratten im Rahmen der vorliegenden Dissertation herangezogen.

Des Weiteren ist die Ratte eine anerkannte Versuchstierspezies zur toxikologischen Charakterisierung neuer Arzneimittelkandidaten, zu der bereits langjährige Erfahrungen hinsichtlich toxikologisch-relevanter Parameter vorliegen. So verfügt die Ratte über ein ausreichendes Blutvolumen, um toxikologische Substanzeffekte anhand klassischer Laborparameter (klinische, klinisch-chemische, hämatologische, gerinnungsphysiologische Untersuchungen), Harnuntersuchungen und letztlich histologischen Untersuchungen identifizieren und charakterisieren zu können.

Hinsichtlich der Übertragbarkeit erhobener Daten an der Ratte für eine fundierte Risikobewertung beim Menschen sind jedoch speziesspezifische Unterschiede zu berücksichtigen. So weicht beispielsweise die Morphologie des Uterus dieser beiden Säuger voneinander ab, da der Mensch infolge der vollständigen Verschmelzung der paarigen Müller'schen Gänge während der Embryonalentwicklung gegenüber den paarigen Uterus-Hörnern der Ratte einen unpaarigen Uterus (Uterus simplex) aufweist. Außerdem bestehen Unterschiede zwischen den Reproduktionszyklen dieser beiden Spezies. Auch die Mamma weist speziesspezifische Unterschiede auf. So variiert beispielsweise nicht nur die Anzahl pro Spezies zwischen bis zu sechs bei der Ratte und zwei beim Menschen, sondern infolge unterschiedlich ausgeprägten Fettgewebes unterscheidet sie sich auch durch ihr optisches Erscheinungsbild.

2.5.2 Uterine In-vitro-Modellsysteme

Im Rahmen der Entwicklung neuer Gestagene ist deren möglichst frühe Charakterisierung hinsichtlich pharmakologischer und toxikologischer Wirkungen am Zielorgan von Bedeutung. Vor dem Hintergrund begrenzter Substanzverfügbarkeit und den zunehmenden Bemühungen, die Anzahl an Tierexperimenten zukünftig zu reduzieren (3R-Prinzip von Russell und Burch (32)), können in diesem Zusammenhang beispielsweise In-vitro-Systeme eine Möglichkeit zur Substanzauswahl und Prädiktion von Substanzeffekten in vivo bieten.

Hinsichtlich der Anwendbarkeit eines In-vitro-Modellsystems im Rahmen eines frühen In-vitro-Screeningsystems zur Charakterisierung pharmakologischer Wirkungen am Rattenuterus scheint die ELT 3-Zelllinie (Eker leiomyoma / myosarcoma tumor-derived) geeignet zu sein. So repräsentiert diese eine der aus benignen Tumoren in der glatten Muskulatur des Uterus der Eker-Ratte (33) isolierten stabilen Zelllinien, deren myometrialer Ursprung durch die Expression von für glatte Muskelzellen charakteristischen Aktins (α und γ) und Desmins belegt ist (34). Weitere Charakteristika der ELT 3-Zellen (35) wie insbesondere die Expression von ER und PR (34; 36), ähnlich zu der im normalen Rattenuterus (37-39) sowie deren Ansprechbarkeit auf Progesterone (39), qualifizieren dieses Modellsystem für Untersuchungen molekularer Mechanismen und des hormonellen Einflusses auf die myometriale Tumorigenese (40).

3 Fragestellung

Synthetische Gestagene finden aufgrund ihrer progesteronähnlichen Wirkung an Reproduktionsorganen als Kontrazeptivum sowie in der HRT Anwendung bei der Frau. Im Rahmen der Entwicklung neuer Arzneimittelkandidaten ist daher die präklinische Bewertung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften in relevanten Spezies von Bedeutung, um eine fundierte Risikoabschätzung für die Anwendung beim Menschen zu ermöglichen.

Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Wirkprofile verschiedener Progestine auf die Reproduktionsorgane Uterus und Mamma der Ratte anhand konventioneller toxikologischer Parameter und molekularbiologischer Untersuchungen charakterisiert werden. Dazu sollten gemeinsame und unterschiedliche Gestageneffekte identifiziert und hinsichtlich relevanter Wirkmechanismen interpretiert werden. Abschließend sollte der Beitrag der molekularbiologischen Untersuchungen für eine pharmakologisch-toxikologische Charakterisierung der Progestine bewertet und mit dem der konventionellen Parameter verglichen werden.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden zunächst basierend auf Organmaterialien aus In-vivo-Experimenten an weiblichen Ratten nach Behandlung mit verschiedenen synthetischen Gestagenen neben der Beurteilung von Organgewichten und der Histologie auch die Genexpressionsprofile der entsprechenden Targetorgane Uterus und Mamma herangezogen. Dazu wurde die umfassende Genexpression mittels Microarrays analysiert. Die erhobenen Genexpressionsdaten wurden schließlich bezüglich der signifikanten Änderungen statistisch ausgewertet und biologisch hinsichtlich relevanter Wirkmechanismen der Testsubstanzen interpretiert.

In einem nächsten Schritt wurden identifizierte Markergene, die auf eine bestimmte Gestagenwirkung hindeuten, mittels spezifischer Technologien eingehender untersucht. Dabei kamen Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) zur Anwendung. In diesem Zusammenhang wurde auch ein In-vitro-Testsystem identifiziert, das eine möglichst frühe Prädiktion der pharmakologischen Wirkungen der untersuchten Progestine am Rattenuterus ermöglicht.

Als wesentlicher methodischer Aspekt wurden darüber hinaus unterschiedliche Probennahmen und Probenaufarbeitungen für nachfolgende Genexpressionsanalysen an der Mamma näher charakterisiert. Dazu wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den mittels Laser Capture Microdissection (LCM) und den aus Gesamtgeweben der gleichen Organproben generierten Transkriptionsprofilen charakterisiert, um eine Bewertung der verschiedenen Methoden hinsichtlich Aufwand und Informationsgehalt formulieren zu können.

4 Material und Methoden

Die verwendeten Feinchemikalien, Kits und Gebrauchslösungen sowie Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel sind im Anhang verzeichnet.

4.1 Testsubstanzen

Bei den verwendeten Testsubstanzen handelte es sich um steroidale und nicht-steroidale synthetische Gestagene. Im Folgenden sind die fünf Progestine mit ihrem jeweiligen generischen und chemischen Namen (IUPAC), Molekulargewicht, Hersteller, Indikation und Strukturformel aufgeführt. Die Reinheitsstufe aller Testsubstanzen entsprach Analysequalität.

4.1.1 Progesteron-Rezeptor-Ligand (PRL)

Generischer Name:	N/A
Chemischer Name (IUPAC):	(R)-3-(41)-2-hydroxy-N-(phthalid-5-yl)-2-(trifluoromethyl)propanamide
Molekulargewicht:	491,36 g/mol
Hersteller:	Bayer Schering Pharma AG (Berlin)
Indikation:	Estrogenfreie orale Kontrazeption bei der Frau

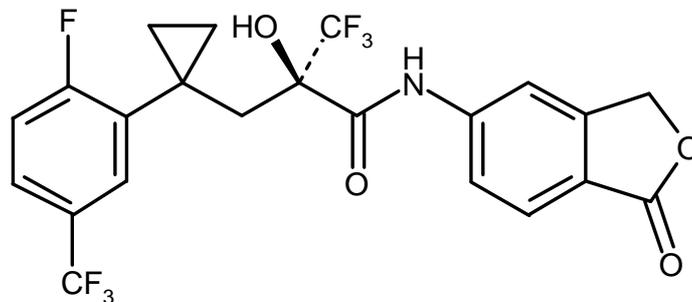


Abbildung 2 – Strukturformel des Progesteron-Rezeptor-Liganden (PRL).

4.1.2 Promegeston (R5020)

Generischer Name:	Promegeston
Chemischer Name (IUPAC):	17 α ,21-Dimethyl-19-nor-4,9-pregnadiene-3,20-dione
Molekulargewicht:	326,50 g/mol
Hersteller:	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Indikation:	Referenzsubstanz, für den humanen Gebrauch nicht zugelassen

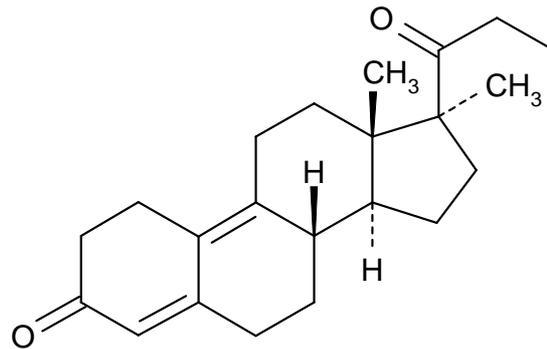


Abbildung 3 – Strukturformel von Promegeston (R5020).

4.1.3 Medroxyprogesteronacetat (MPA)

Generischer Name:	Medroxyprogesteronacetat
Chemischer Name (IUPAC):	17-Acetoxy-6 α -methyl-4-pregnene-3,20-dione
Molekulargewicht:	386,52 g/mol
Hersteller:	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Indikation:	Kontrazeption bei der Frau (Depotpräparat), Hormonersatztherapie, Menstruationsbeschwerden, Endometriose, Krebs

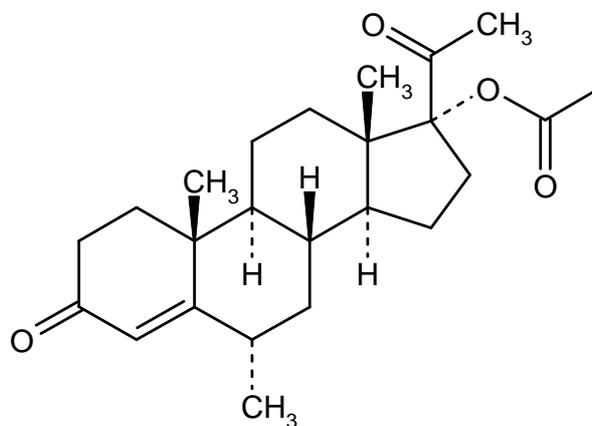


Abbildung 4 – Strukturformel von Medroxyprogesteronacetat (MPA).

4.1.4 Progesteron (P4)

Generischer Name:	Progesteron
Chemischer Name (IUPAC):	4-Pregnene-3,20-dione
Molekulargewicht:	314,47 g/mol
Hersteller:	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Indikation:	Natürliches Gelbkörperhormon

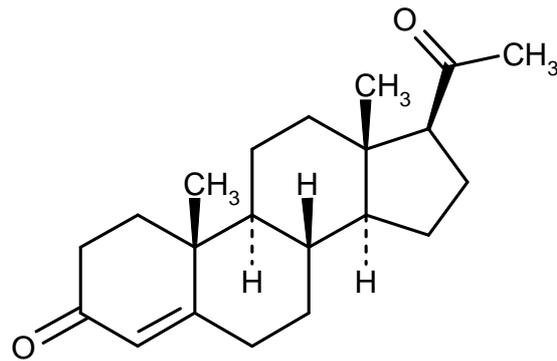


Abbildung 5 – Strukturformel von Progesteron (P4).

4.1.5 Levonorgestrel (LNG)

Generischer Name:	Levonorgestrel
Chemischer Name (IUPAC):	(-)-13-Ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -pregn-4-en-20-yn-3-one
Molekulargewicht:	312,46 g/mol
Hersteller:	Bayer Schering Pharma AG (Berlin)
Indikation:	Orale Kontrazeption bei der Frau

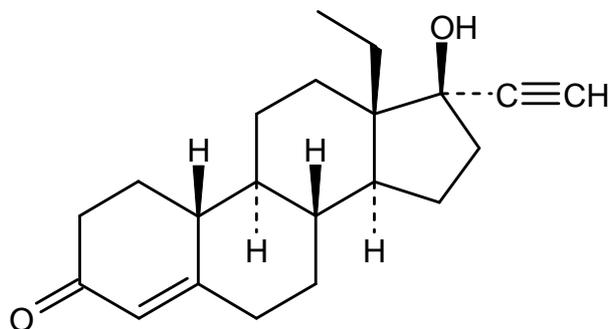


Abbildung 6 – Strukturformel von Levonorgestrel (LNG).

4.2 In-vivo-Experimente

Zur Charakterisierung der Wirkung der Gestagene auf den Uterus und / oder die Mamma wurden Ratten für 28 Tage mit diesen behandelt. Die Versuche erfolgten entsprechend des Tierschutzgesetzes und im Einklang mit den entsprechenden Anzeigen der Bayer Schering Pharma AG (Berlin).

4.2.1 Versuchstiere

Als etablierte Nager-Spezies für nicht-klinische Sicherheitsstudien mit Arzneimittelkandidaten wurde die Ratte als Versuchstierspezies eingesetzt. Bei den Versuchstieren handelte es sich

ausschließlich um weibliche Ratten vom Stamm Crl:Wi(Han) des Züchters Charles River (Charles River Laboratories, Sulzfeld) bzw. Wistar Hsd CpB:WU der Harlan GmbH (Niederlande). Pro Testsubstanz, Dosis und Applikationsdauer wurden sechs Tiere gehalten, die zu Behandlungsbeginn etwa acht Wochen alt waren und deren Körpergewichte zwischen 150 und 200 g lagen.

4.2.2 Haltungsbedingungen

Die Akklimatisation der Tiere vor Behandlungsbeginn betrug mindestens sieben Tage, die Kennzeichnung erfolgte per Ohrmarke. Bei standardisiertem Klima und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus wurden die Tiere einzeln oder zu dritt konventionell in Makrolon®-Käfigen Typ IV bzw. III (Tecniplast Deutschland GmbH) mit Einstreu, Nagerhäuschen und Nageknochen gehalten. Als Tierfutter wurde pulverisiertes Ssniff® R/M - H bzw. KLIBA NAFAG 3883 (Provimi Kliba AG) in Metallbehältern verfüttert, feinfltriertes Trinkwasser in Tränkflaschen. Futter- und Wassergaben waren ad libitum. Beeinträchtigungen der Prüfergebnisse durch Formulierungshilfsstoffe und / oder Schadstoffe in Futter oder Trinkwasser waren nicht zu erwarten.

4.2.3 Substanzapplikation

Die Substanzapplikation erfolgte einmal täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen. Um vergleichbare Gestagenwirkungen zu erhalten, wurde von jeder Testsubstanz die ED₅₀ der dem jeweiligen Applikationsweg entsprechenden Schwangerschaftserhaltungsdosis eingesetzt. Gegebenenfalls wurde außerdem das 10-fache dieser Dosis appliziert. Damit ergaben sich für die einzelnen Testsubstanzen folgende Dosierungen:

Progesteron-Rezeptor-Ligand (PRL):	10 und 100 µg/kg/d
Promegeston (R5020):	100 und 1000 µg/kg/d
Medroxyprogesteronacetat (MPA):	1 und 10 mg/kg/d
Progesteron (P4):	15 und 150 mg/kg/d
Levonorgestrel (LNG)	0,1 mg/kg/d

Die Applikation des PRL erfolgte intragastral (i.g.), da diese dem Applikationsweg für die angestrebte Indikation entsprach; die Formulierungsgrundlage war Cremophor EL 2 % in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung. R5020, MPA, P4 und LNG wurden subcutan (s.c.) appliziert, da die pharmakologischen Daten auf dieser Applikationsart basierten; die Formulierungsgrundlage war Benzylbenzoat / Rhizinusöl (1+4). Übereinstimmend zu den substanzbehandelten Tieren wurden für jeden Applikationsweg drei bis neun Kontrolltiere mitgeführt, denen das jeweilige Vehikel analog zu den substanzbehandelten Tieren appliziert wurde.

4.2.4 Organentnahme und Asservierung

Am Ende der jeweiligen Behandlungsdauer wurden die Zielorgane Uterus und / oder Mamma entnommen und die Organgewichte der Uteri für eine umfassende Charakterisierung der gestagenen Wirkung der Testsubstanzen an diesem Zielorgan ermittelt. Anschließend erfolgte die für die nachfolgenden Aufarbeitungen entsprechende

Asservierung der Organe. Für histologische Gewebeschnitte wurde jeweils ein Teil des Uterus mit Horn, Corpus und Cervix sowie die linke inguinale Mamma für 24 h in 10 % Neutral gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (Formalin-fixed, Paraffin-embedded, FFPE). Zur Durchführung von Genexpressionsanalysen wurde ein Uterus-Horn und ein Teil der entnommenen rechten thoracalen Mamma bzw. die inguinale Mamma in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der übrige Teil der rechten thoracalen Mamma wurde in Tissue-Tek O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) Einbettmedium eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung der Organe erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 In-vitro-Experimente

Zur Untersuchung der gestagenen Wirkung von vier der in den In-vivo-Experimenten applizierten Testsubstanzen in vitro, wurden Zellkulturversuche mit ELT 3-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie wurde von C. Walker (University of Texas MD Anderson Cancer Center, Smithville, TX, USA) bezogen und freundlicherweise von der Abteilung GTR TRG Womens Healthcare der Bayer Schering Pharma AG (Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Replizierbarkeit des Versuchsansatzes wurde durch zwei technische und jeweils drei biologische Replikate sichergestellt, von denen letztere für nachfolgende Genexpressionsanalysen zu je $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA gepoolt wurden.

4.3.1 Zellkultivierung

Die ELT 3-Zellen wurden als Monolayer in 162er Zellkulturflaschen in je 30 mL Kulturmedium (8.4) kultiviert und standardmäßig alle zwei bis drei Tage passagiert. Für Substanztestungen wurden sie in Passage 43 eingesetzt und in 6-Well-Mikrotiterplatten in je 3 mL Basalmedium (8.4) pro Well gehalten. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gemäß den allgemein üblichen Vorgehensweisen.

4.3.2 Ermittlung des Wachstumsverhaltens

Zur Ermittlung der geeigneten Zellzahl für Substanztestungen und des Zeitraums der Wachstumsphase der ELT 3-Zellen wurde deren Wachstumsverhalten mittels MTT-Assay (beschrieben unter 8.7) bestimmt (42). Hierzu wurden 3 , 5 und 8×10^4 Zellen der Passage 43 pro mL Kulturmedium (8.4) in 6-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Auf Grundlage der Viabilität dieser unbehandelten Zellen verschiedener initialer Zellzahlen nach 24, 48, 72 und 96 h konnte schließlich deren Wachstumsverhalten ermittelt werden (Abbildung 30, 8.7).

4.3.3 Beurteilung der Zytotoxizität

Um eine zytotoxische Wirkung der vier Testsubstanzen und des Lösungsmittels an den ELT 3-Zellen im getesteten Konzentrationsbereich und über die maximale Inkubationsdauer ausschließen zu können, wurde ebenfalls ein MTT-Assay (beschrieben unter 8.7) durchgeführt (42). Dazu wurden 5×10^4 ELT3-Zellen der Passage 43 pro mL Kulturmedium (8.4) in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen über Nacht wurden

sie zweimalig mit D-PBS gewaschen und anschließend mit Basalmedium (8.4) versehen. Nach hormoneller Auszehrung der Zellen über 18 h wurden dem Medium für 24 h aufsteigende Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen zwischen 0,5 und 1000 nM sowie 0,01 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle zugesetzt. Auf Grundlage der Viabilität der Zellen konnte schließlich die zytotoxische Wirkung der vier Gestagene im getesteten Konzentrationsbereich beurteilt werden (Abbildung 31, 8.8).

4.3.4 Substanzinkubation für Genexpressionsanalysen

Für Substanztestungen wurden 5×10^4 ELT 3-Zellen/mL Kulturmedium (8.4) in 6-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen über Nacht wurden sie zweimalig mit D-PBS gewaschen und anschließend mit Basalmedium (8.4) versehen. Nach hormoneller Auszehrung der Zellen über 18 h wurde dem Medium für jeweils 6, 12 und 24 h eine der folgenden Substanzkonzentrationen bzw. 0,01 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle hinzugefügt:

Progesteron-Rezeptor-Ligand (PRL):	10 und 100 nM
Promegeston (R5020):	10 und 100 nM
Medroxyprogesteronacetat (MPA):	100 und 1000 nM
Progesteron (P4):	100 und 1000 nM

Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden dabei so gewählt, dass sie vergleichbar zu den jeweiligen Dosierungen der entsprechenden In-vivo-Experimente waren. Als In-vitro-Bezugspunkt dienten In-house-Daten aus Transaktivierungsassays.

Am Ende der jeweiligen Inkubationszeitpunkte wurden die Zellen jedes Wells separat gesammelt, um die RNA für nachfolgende Genexpressionsanalysen aus den Zelllysaten zu isolieren. Erfolgte die weitere Aufarbeitung der Proben nicht sofort im Anschluss, wurden diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Zur Aufarbeitung des gestagenbehandelten Probenmaterials der In-vivo- und In-vitro-Experimente für nachfolgende Genexpressionsanalysen kamen verschiedene molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Zur Analyse spezifischer Zielzellen von Gestagenen in der Mamma wurden diese zunächst mittels LCM aus dem umliegenden Gewebeverband herausgelöst und anschließend die darin enthaltene RNA isoliert. Zur Analyse des gesamten Zielgewebes von Gestagenen wurde die RNA aus Homogenaten des Uterus und der Mamma bzw. der ELT 3-Zellen isoliert. Anschließend wurde die mRNA-Fraktion der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben und im Falle der LCM-Proben linear amplifiziert, um ausreichende RNA-Ausbeuten für Microarray-Experimente zu erhalten. Zur Untersuchung umfassender gestagenbedingter Genexpressionsprofile wurden letztlich Affymetrix GeneChips[®] verwendet, zur Analyse der Expressionslevel einzelner Gene qRT-PCR im TLDA-Format.

4.4.1 Laser Capture Microdissection (LCM)

Die Heterogenität von Geweben erschwert es häufig, exprimierte Gene spezifischen Zellpopulationen zuzuordnen, sofern die untersuchte RNA aus dem gesamten Gewebeextrakt stammt. Um homogene, morphologisch identische Zellpopulationen von Drüsenepithelien für Genexpressionsanalysen aus dem komplexen, heterogenen Mamma-Gewebe zu isolieren, wurde die Methode der lasergestützten Mikrodisektionstechnik (LCM) angewendet (43; 44). Sie ermöglicht die Separierung von einzelnen Zielzellen, so dass nachfolgende Genexpressionsanalysen anhand reiner Zellpopulationen durchgeführt werden können (45). Dazu wurden zunächst Gefrierschnitte von den in Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium eingefrorenen Mammae angefertigt und die Zielstrukturen angefärbt. Nach der vollständigen Entwässerung und Fixierung der Gewebeschnitte wurden die Drüsenepithelien schließlich mittels Mikrodisektion aus dem umliegenden Gewebeverband herausgehoben.

4.4.1.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Mittels Cryostat Leica CM 1950 wurden bei einer Kammer- und Objektträgertemperatur von -27 °C jeweils 10 µm dicke Gefrierschnitte von den Proben angefertigt. Um für nachfolgende Genexpressionsanalysen ausreichende RNA-Ausbeuten zu erhalten, wurden von jeder Mamma drei aufeinanderfolgende Gewebeschnitte auf einem Objektträger platziert. Die Lagerung der Gefrierschnitte erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C.

4.4.1.2 Anfärben der Zielstrukturen

Um die Zielpopulationen mikroskopisch identifizieren zu können, wurden die Gewebeschnitte angefärbt. Dies erfolgte unter Verwendung des HistoGene™ LCM Frozen Section Staining Kit (Arcturus) mit dem Farbstoff HistoGene Stain bzw. Cresyl Violet aus dem LCM Staining Kit (Ambion). Dazu wurden die Gefrierschnitte vollständig aufgetaut und in einer aufsteigenden Alkoholreihe anschließend vollständig dehydriert. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die einzelnen Schritte zum Anfärben und Entwässern der Gewebeschnitte dabei für jeweils genau 30 s ausgeführt.

Um die Gewebeschnitte auf dem Objektträger zu fixieren, wurden diese zunächst in 75 %-iges Ethanol gegeben. Anschließend wurde das Einbettmedium mittels destillierten Wassers vollständig entfernt. Mit 50 µL der entsprechenden Färbelösung wurden die Gewebeschnitte vollständig bedeckt und die überschüssige Lösung in destilliertem Wasser entfernt, bevor die Färbung durch 75 %-iges Ethanol fixiert wurde. Um das Gewebe schließlich restlos zu entwässern, was für die anschließende Adhärenz der Zielzellen auf den CapSure Macro LCM Caps (Arcturus) entscheidend war, wurde dieses schrittweise in 95 %-igem Ethanol, 100 %-igem Ethanol und für 2 min erneut in 100 %-igem Ethanol dehydriert. Aufbewahrt wurden die Gewebeschnitte letztlich für mindestens 5 min, maximal 4 h, in Xylen und erst unmittelbar vor dem Mikrodisektionsschritt für 5 min an der Luft getrocknet, um das Xylen vollständig verdampfen zu lassen.

4.4.1.3 Mikrodisektion spezifischer Zellpopulationen

Die Mikrodisektion der Drüsenepithelien erfolgte mittels AutoPix™ Automated Laser Capture Microdissection System (Arcturus). Die Funktionsweise der LCM ist schematisch in

Abbildung 7 dargestellt. Sie basiert auf der selektiven Adhärenz visuell definierter Zellen und Gewebefragmente auf einem thermoplastischen Transferfilm, der einem dehydrierten Gewebeschnitt aufliegt und durch das Auslösen eines energiearmen Infrarot-Laserpulses (~ 800 nm) fokal geschmolzen wird (44; 46). Das Absorptionsmaximum der auf einem optisch durchsichtigen Cap befindlichen Ethylen-Vinyl-Acetat-Membran befindet sich nahe der Wellenlänge des Lasers (44), da er spezielle Infrarot absorbierende Farbstoffe enthält (47). Der gepulste Laserstrahl wird innerhalb eines konkreten Punktes auf dem Transferfilm direkt oberhalb der Zielzellen absorbiert, infolge dessen der Film an diesem definierten Punkt schmilzt. Da dessen Viskosität mit steigender Temperatur steil abnimmt, reicht eine leichte fokale Erhitzung aus, damit er in die Zwischenräume des Zielgewebes einfließen und mit den darunter liegenden ausgewählten Zellen sofort eine Bindung eingehen kann, die stärker ist als die Bindung zwischen dem Gewebeschnitt und dem Objektträger (47). Da die meiste Energie durch die Membran absorbiert wird, liegt die durch die Laseraktivierung erreichte Maximaltemperatur des Gewebes für einige Millisekunden um 90 °C, was weder DNA, cDNA oder mRNA noch Proteine beschädigt (43; 46). Die thermoplastische Klebung verhindert dabei chemische Reaktionen, die zu Quervernetzungen biologischer Moleküle im Gewebe führen können und nachfolgende molekulare Untersuchungen beeinträchtigen (47). Die mikroskopische Verifikation der Spezifität des gesammelten Materials wird dadurch ermöglicht, dass die ursprüngliche Morphologie sowohl des transferierten Gewebes als auch der umliegenden Zellen erhalten bleibt (43). Wird der Transferfilm schließlich vom Gewebeschnitt entfernt, bleiben die ausgewählten Zellen an der Oberfläche des Films gebunden, während das übrige Gewebe zurück bleibt (47). Mittels eines entsprechenden Puffers werden die Zielzellen anschließend zur weiteren Aufarbeitung vom Transferfilm gelöst (43).

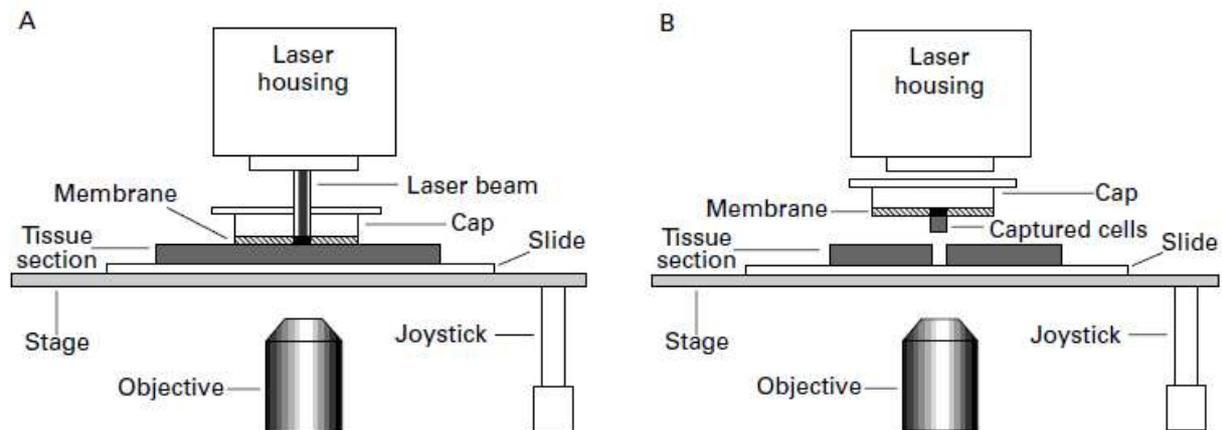


Abbildung 7 – Schematische Darstellung der Laser Capture Microdissection. A: Durch Aktivierung des Lasers wird der thermoplastische Transferfilm fokal geschmolzen. B: Die Anhebung des Caps löst selektiv die an der Membran adhärenen Zellen aus dem umliegenden Gewebeverband heraus (44).

Zur Mikrodissektion der Drüsenepithelien aus dem Gewebeverband der Mamma wurden zunächst ein gefärbter, entwässerter Gewebeschnitt sowie ein CapSure Macro LCM Cap (Arcturus) in die Öffnung der LCM-Apparatur eingeführt (Abbildung 8). Anschließend wurde das Gewebe mittels eines inversen Mikroskops auf dem Computerbildschirm visualisiert und der Laser mit Hilfe der verfügbaren Software-Tools nach folgenden Einstellungen justiert:

Power: 70 mV
Pulse: 2500 μ s
Hits: 1
Delay: 0 ms
Intensity: 200 mV
Spot Size: 45,0 μ m

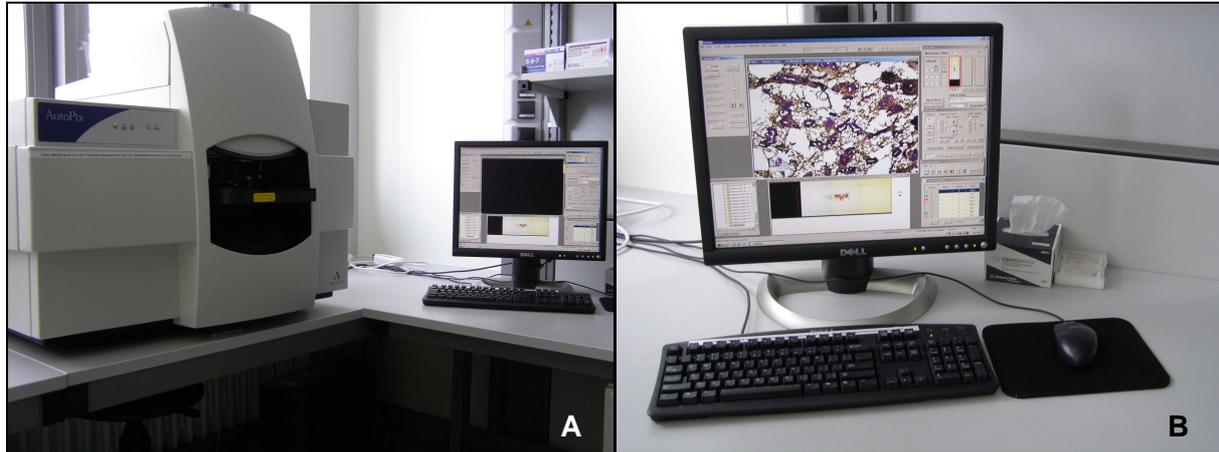


Abbildung 8 – AutoPix™ Automated Laser Capture Microdissection System (Arcturus).
A: Computergestützte LCM-Apparatur mit Öffnung zum Einführen der Gewebeschnitte und CapSure Macro LCM Caps (Arcturus). B: Ansicht der zugehörigen Software.

Um die spezifischen Zielpopulationen aus dem umliegenden Gewebeverband herauslösen zu können, wurden diese zunächst mikroskopisch identifiziert (Abbildung 9). Daraufhin wurde im Gerät ein Cap auf dem jeweiligen Bereich des Gewebes platziert und die zu isolierenden Drüsenepithelien markiert. Anschließend wurde der entsprechende Befehl zur Mikrodissektion des selektierten Bereiches gegeben, woraufhin der Laser aktiviert und die Zielzellen aus dem Gewebeverband herausgehoben wurden. Dieser Vorgang wurde mit den Gewebeschnitten auf einem Objektträger jeder Probe so oft wiederholt, bis das größtmögliche Areal zwischen 0,5 und 2,0 mm² Drüsenepithel auf dem Cap gesammelt wurde. Um eine Degradierung der RNA und damit eine Minderung der RNA-Qualität zu verhindern, dauerte dieser Schritt pro Objektträger maximal 15 min.

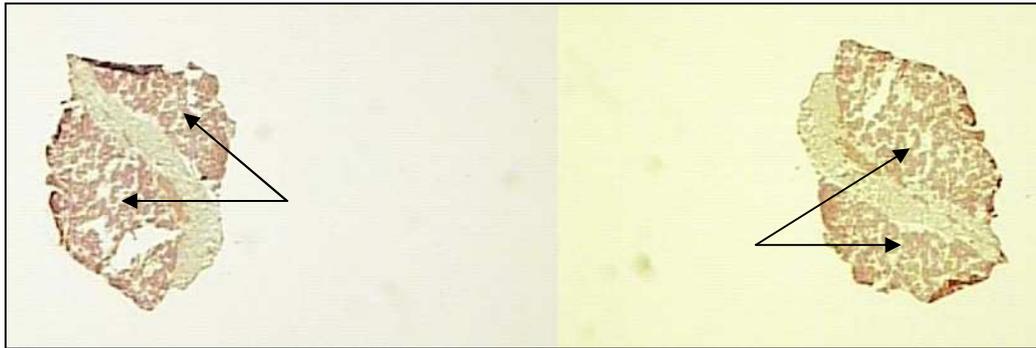


Abbildung 9 – Ausschnitt aus der Übersicht über die auf einem Objektträger einer Probe platzierten Gewebeschnitte. Dargestellt sind zwei Gewebeschnitte der Mamma einer weiblichen Ratte der In-vivo-Experimente, wie sie über die LCM-Apparatur zu Übersichtszwecken dargestellt werden. Deutlich zu erkennen sind die ausgeprägten Bereiche des Drüsenepithels (Pfeile) der beiden aufeinanderfolgenden Schnitte desselben Organs.

Nach Beendigung des Sammelvorgangs wurde der Transferfilm des verwendeten Caps innerhalb der LCM-Apparatur betrachtet und bewertet, ob die Zielzellen wie gewünscht aus dem Gewebeverband herausgehoben wurden. Danach wurde das Cap der Apparatur entnommen und die isolierten Zellen durch Zugabe von 50 μ L Extraktionspuffer und eine 30-minütige Inkubation bei 42 $^{\circ}$ C letztlich von der Membran des Caps gelöst. Erfolgte die weitere Aufarbeitung der Proben nicht sofort im Anschluss, wurden die Lysate bei -80 $^{\circ}$ C gelagert.

4.4.2 RNA-Isolierung

Zur Analyse der Genexpression im jeweiligen Zielgewebe wurde die enthaltene RNA zunächst isoliert. Dies erfolgte im Falle der Zelllysate von Gefrierschnitten mittels PicoPureTM RNA Isolation Kit (Arcturus), im Falle des stark fetthaltigen Mamma-Gewebes mittels RNeasy[®] Lipid Tissue Mini-Kit (Qiagen) und im Falle des Uterus-Gewebes sowie der ELT 3-Zelllysate mittels RNeasy[®] Mini-Kit (Qiagen) gemäß des jeweiligen Herstellerprotokolls.

Um einen maximalen Zugang zur RNA zu gewährleisten, wurde das entsprechende Probenmaterial zunächst lysiert. Die ELT 3-Zellen wurden hierfür zu den entsprechenden Zeitpunkten separat gesammelt, indem sie zunächst mit D-PBS gewaschen und anschließend in jeweils 600 μ L Lysis-Puffer (8.4) vollständig aufgeschlossen wurden. Anschließend erfolgte deren Homogenisierung mittels QIAshredder. Von den Organgeweben wurden hierfür zunächst im gefrorenen Zustand 25-35 mg Uterus-Gewebe bzw. 70-90 mg Mamma-Gewebe abgeteilt. Das Uterus-Gewebe wurde anschließend sofort in eisgekühlten Lysis-Puffer (8.4) überführt, das Mamma-Gewebe in eisgekühltes QIAzol Lysis Reagenz. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mittels Rotor-Homogenizer.

Um schließlich die in den Lysaten enthaltene gesamte zelluläre RNA zu isolieren, wurde zunächst deren Bindungsfähigkeit an die Kieselerde-Gel-Membran der verwendeten Säulen durch Zugabe von Alkohol erhöht, bevor sie durch mehrere aufeinander folgende Waschschrte schnell und effizient gereinigt wurde. Um eine Verunreinigung der so isolierten Gesamt-RNA durch genomische DNA auszuschließen, wurde durch Zugabe von 80 μ L DNase-Lösung (8.4) ein integrierter DNase-Verdau jeder Probe durchgeführt bevor die letztlich eluierte RNA in weiterführende Anwendungen eingesetzt wurde. Erfolgte die weitere Aufarbeitung der Proben nicht sofort im Anschluss, wurde die isolierte RNA bei -80 $^{\circ}$ C gelagert.

4.4.2.1 Quantifizierung

Die Reinheit und Quantität der isolierten Gesamt-RNA wurde mittels BioPhotometer® (Eppendorf) bestimmt. Dazu wurde diese mit RNase-freiem Wasser 1:50 verdünnt und die Absorption (optische Dichte, OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Der aus der $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{280\text{ nm}}$ bestimmte Quotient sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen, um eine Verunreinigung durch Proteine ausschließen zu können. Weiteres Akzeptanzkriterium für die nachfolgende Aufarbeitung war eine Mindestmenge von 122 µg RNA/mL. Zur Berechnung der RNA-Konzentration (c) wurde die folgende Formel zu Grunde gelegt: $c [\mu\text{g/mL}] = OD_{260\text{ nm}} \times 40 \mu\text{g/mL} \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

Aufgrund der zu erwartenden geringen RNA-Ausbeute der LCM-Proben erfolgte deren Quantifizierung nicht im Anschluss an die RNA-Isolierung mittels BioPhotometer® (Eppendorf), sondern erst im Zuge der Quantifizierung der Biotin-markierten aufgereinigten antisense RNA (aRNA) (4.4.3.1.1 Labeling und Hybridisierung) mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (8.9). Einen ersten Anhaltspunkt lieferte jedoch die Konzentrationsangabe im Zuge der Qualitätskontrolle mittels Agilent-2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies) (4.4.2.2 / 8.10). Angestrebt wurde dabei eine Mindestmenge von 0,5 bis 5,0 ng Gesamt-RNA.

4.4.2.2 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle wurde die Integrität der isolierten RNA mittels Agilent-2100-Bioanalyzer (8.10) unter Verwendung des RNA-6000-Pico bzw. -Nano LabChip Kit Series II (Agilent Technologies) gemäß des Herstellerprotokolls ermittelt.

Als Algorithmus zur Zuordnung von Integritätswerten zur gemessenen RNA (48) stellt die RNA-Integritäts-Nummer (RNA Integrity Number, RIN) einen objektiven Messwert der RNA-Qualität dar (49). Um den Anforderungen der nachfolgenden Genexpressionsanalysen gerecht zu werden, wurde daher für die RNA aus den homogenisierten Gesamtorganen und ELT 3-Zelllysaten eine $RIN \geq 6$ als Akzeptanzkriterium festgelegt. Für die RNA aus Lysaten von Gefrierschnitten nach LCM wurde eine $RIN \geq 5$ angestrebt.

4.4.2.3 cDNA-Synthese

Für nachfolgende Genexpressionsanalysen wurde die mRNA-Fraktion der isolierten Gesamt-RNA zunächst in doppelsträngige cDNA (ds cDNA) umgeschrieben. Für die Analyse mittels Affymetrix GeneChips® erfolgte die cDNA-Synthese dabei aus 1 µg RNA unter Verwendung der One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix) gemäß des Herstellerprotokolls. Für die Analyse mittels qRT-PCR im TaqMan® Low Density Array (TLDA)-Format (Applied Biosystems) erfolgte die cDNA-Synthese aus 2 µg RNA unter Verwendung des 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Applied Science) gemäß des Herstellerprotokolls. Erfolgte die weitere Aufarbeitung der Proben nicht sofort im Anschluss, wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

4.4.2.4 Lineare Amplifizierung

Aufgrund der erwarteten zu geringen RNA-Ausbeuten der LCM-Proben für Microarray-Experimente, wurde die mRNA-Fraktion des jeweiligen gesamten RNA-Eluats unter Verwendung des RiboAmp® HS^{Plus} RNA Amplification Kit (Arcturus) in zwei

aufeinanderfolgenden Amplifizierungsrunden gemäß des Herstellerprotokolls linear amplifiziert. Zusätzlich sollte anhand von zwölf RNA-Proben homogenisierten Mamma-Gewebes untersucht werden, welchen Einfluss diese lineare Amplifizierung auf das Genexpressionsprofil hat. Dazu wurde die RNA von sechs Vehikelkontrollen und sechs Tieren nach 28-tägiger P4-Behandlung (150 mg/kg/d) auf die durchschnittliche RNA-Konzentration der LCM-Proben von 4 µg/mL verdünnt und analog zu diesen linear amplifiziert.

Die mRNA-Fraktion der Gesamt-RNA (durchschnittlich 0,04 µg) jeder Probe wurde hierfür zunächst in einer 1st Strand-Synthese unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern und einer nachfolgenden 2nd Strand-Synthese unter Verwendung von random hexamer-Primern mittels Reverser Transcriptase in ds cDNA umgeschrieben. Nach Aufreinigung der ds cDNA unter Verwendung des Purification Components Amplification Kit (Arcturus) gemäß des Herstellerprotokolls wurde diese in vitro in aRNA umgeschrieben. An die erste Amplifizierungsrunde schloss sich schließlich eine zweite an, die nun eine 1st Strand-Synthese unter Verwendung von random hexamer-Primern und eine 2nd Strand-Synthese unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern sowie die sich anschließende Aufreinigung der ds cDNA umfasste.

4.4.3 Genexpressionsanalysen

4.4.3.1 Affymetrix GeneChip[®]-Experimente

Die differenzielle Genexpression im Probenmaterial wurde mittels Affymetrix Rat Genome 230A 2.0 GeneChip[®] Microarrays analysiert. Insgesamt wurden 152 Microarrays durchgeführt, bestehend aus 29 mittels LCM gewonnener Mamma-Proben, 57 nicht amplifizierten Mamma-Proben aus dem homogenisierten Gesamtorgan, 12 linear amplifizierten Mamma-Proben aus dem homogenisierten Gesamtorgan sowie 54 nicht amplifizierten Uterus-Proben aus dem homogenisierten Gesamtorgan.

Jeder Affymetrix Rat Genome 230A 2.0 GeneChip[®] umfasst 31.099 Probe Sets, die rund 30.000 Transkripte und Varianten einschließlich 28.000 gut charakterisierter Gensequenzen der Ratte repräsentieren. Ihre Herstellung erfolgt photochemisch. Mittels Kombination von Photolithographie und Fest-Phase-Synthesemethoden werden etwa 7×10^{12} verschiedene je 25 Basenpaar (bp) lange Oligonukleotide bekannter Sequenz, so genannte Probes oder Sequenzen, direkt auf der Oberfläche des Biochips kontrolliert synthetisiert. Zum Nachweis eines jeden Transkripts dienen so genannte Reference Probes, deren Sequenz exakt komplementär zur jeweiligen Zielsequenz ist (perfect match). Um die Spezifität von Signalen zu gewährleisten und Kreuzhybridisierungen ausschließen zu können, wird direkt benachbart zu jeder Reference Probe eine so genannte Partner Probe positioniert, die genau im Zentrum des Oligonukleotids eine einzelne Mismatch-Base zur selben Zielsequenz wie die Reference Probe enthält (mismatch). Von diesen Sequenzen bilden je 22, elf perfect match und elf mismatch Basen, ein so genanntes Probe Set, die elf unterschiedliche Bereiche eines jeden Transkripts abdecken (elf Reference Sequences). Dabei wird ein Transkript von bis zu fünf verschiedenen Probe Sets repräsentiert. Ein jedes Probe Set ist dabei in so genannten Features, 11 x 11 µm großen spezifischen Bereichen, lokalisiert, die je 10^7 - 10^8 Oligonukleotide enthalten. Durch diese hohe Anzahl an Oligonukleotiden pro Feature soll eine Absättigung durch komplementäres Probenmaterial verhindert werden. Um

unterschiedliche Genexpressionssignale als Folge unterschiedlicher Behandlungen verschiedener Chip-Bereiche auszuschließen, sind pro Probe Set 22 dieser identischen Features in verschiedenen Bereichen über den Chip verteilt und dienen so der Erfassung quantitativer Informationen sowie der Gleichmäßigkeit der Behandlung der Chips (50).

4.4.3.1.1 Labeling und Hybridisierung

Das Labeling und die Hybridisierung des Probenmaterials auf Affymetrix GeneChips® erfolgte in der Funktion Translational Sciences der Bayer Schering Pharma AG (Berlin) unter Verwendung der One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix) gemäß des Herstellerprotokolls.

Die aufgereinigte ds cDNA des Probenmaterials wurde durch den Einsatz Biotin-markierter Ribonukleotide in vitro in einzelsträngige aRNA transkribiert und markiert. Nach Aufreinigung mittels RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) gemäß des Herstellerprotokolls wurde die Quantität und Reinheit der aufgereinigten Biotin-markierten aRNA mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt (8.9), die Integrität der Biotin-markierten aRNA mittels Agilent-2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies) (8.10). Als Akzeptanzkriterien wurden eine Mindestmenge von 10 µg aRNA und eine aRNA-Größe zwischen 500 und 3.000 bp festgelegt.

Nach anschließender Fragmentierung von jeweils 15 µg aRNA erfolgte die separate Hybridisierung der einzelnen Proben auf die Microarrays im GeneChip Hybridisation Oven 640 (Affymetrix) für 16 h bei 45 °C und 60 rpm. Das kontrollierte Waschen und Anfärben durch biotinylierte Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugate erfolgte unter Verwendung des Wash and Stain Kits (Affymetrix) mittels GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) gemäß des Herstellerprotokolls. Die Reproduzierbarkeit der erhobenen Daten wurde dabei durch das kontrollierte Waschen sowie die automatisierte, Software-kontrollierte Hybridisierung sichergestellt (50).

4.4.3.1.2 Datengenerierung

Unter Verwendung des Affymetrix GeneChip-3000 Scanner (Affymetrix) wurden die Microarrays bei 570 nm gescannt und die Intensität der Fluoreszenzsignale jeder Position ausgelesen. Die Quantifizierung der resultierenden *.DAT-files erfolgte mittels GCOS-Software (Affymetrix), wobei die Intensität des Hybridisierungssignals mit dem Expressionsniveau des jeweiligen Transkripts korreliert (51). Die so aufbereiteten *.CEL-files wurden schließlich durch Anwendung des Affymetrix MAS 5.0 Algorithmus kondensiert (One-sided Wilcoxon's Signed Rank Test, p-value < 0,04).

4.4.3.1.3 Qualitätskontrolle

Um die Qualität der generierten Genexpressionsdaten mittels Affymetrix GeneChips® und deren Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Noise, Scaling Factor, Background, Percent Present Calls und das 3'/5' *Gapdh*-Verhältnis als Qualitätskriterien bewertet. Zur Evaluierung der Effizienz der Proben-Hybridisierung dienten Hybridisierungskontrollen (bioB, bioC, bioD, cre). Um den Prozess des Labelings zu kontrollieren, wurden so genannte Poly-A Kontrollen (lys, phe, thr, dap) verwendet. Die festgelegten Akzeptanzkriterien der einzelnen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 – Akzeptanzkriterien der Affymetrix GeneChip®-Daten.

Qualitätskriterium	Beschreibung	pro GeneChip	zwischen GeneChips
Noise	Messgröße der Pixel-zu-Pixel-Variation von Probe Sets eines GeneChips	< 4	vergleichbar
Scaling Factor	Multiplikationsfaktor; erforderlich zur Normalisierung	-	vergleichbar; Variation < 3-fach
Background	Erfassung der Hintergrund-Signalintensität	< 100	vergleichbar
Percent Present Calls	Prozentualer Anteil detektierter Probe Sets ($p < 0,04$)	> 25 %	vergleichbar
3'/5' <i>Gapdh</i> ratio	Bewertung der Effizienz der cDNA-Synthese und Integrität der Proben-RNA	< 3	vergleichbar
Hybridization controls	Evaluierung der Effizienz der Proben-Hybridisierung	bioB 50 % detektiert; bioB < bioC < bioD < cre	-
Poly A controls	Kontrolle des Labeling-Prozesses	alle detektiert; lys < phe < thr < dap	-

4.4.3.1.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der kondensierten Genexpressionsdaten erfolgte mittels Expressionist Analyst Pro Software (Versionen 5.3 - 6.1; GeneData AG) nach dem in Abbildung 10 dargestellten Flussdiagramm. Nicht berücksichtigt wurden dabei Gene, die auf Expressed Sequence Tags beruhten, als „hypothetical protein“, „hypothetical LOC“, „similar to“, „gb:“ oder „Transcribed locus“ bezeichnet wurden, da diesen keine eindeutige biologische Funktion zugeordnet werden kann.

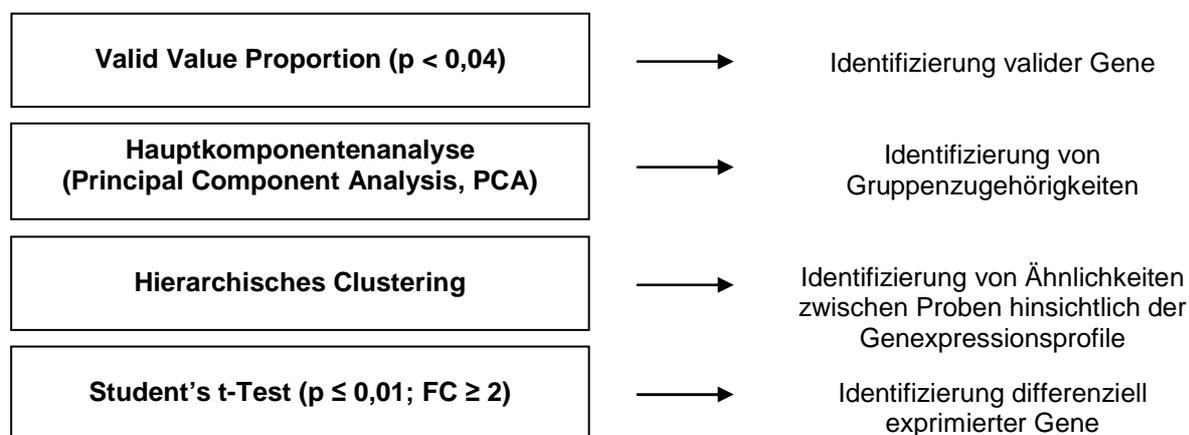


Abbildung 10 – Flussdiagramm zur statistischen Auswertung der Affymetrix GeneChip® Genexpressionsdaten.

Die kondensierten Genexpressionsdaten wurden zunächst hinsichtlich ihrer Validität gefiltert (Valid Value Proportion, p -value < 0,04). Dabei wurden nur diejenigen Gene als valide betrachtet und zur nachfolgenden statistischen Auswertung herangezogen, die in mindestens zwei aller zu Grunde liegenden Proben detektiert wurden.

Um eine generelle Übersicht über die Datensätze zu erhalten und diese zu visualisieren, wurden Gene ähnlicher Merkmale mittels multivariater Analysen wie der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) und Hierarchischem Clustering gruppiert. Die PCA ist eine Projektions-Methode, die angewendet wird, um die Dimensionalität von Daten zu reduzieren und multivariate Daten zu visualisieren, indem

entscheidende Beziehungen zwischen individuellen Proben oder Gruppen von Proben sichtbar gemacht werden. Mithilfe eines mathematischen Verfahrens wird hierbei eine Vielzahl möglicher korrelierter Variablen in nicht-korrelierte Variablen, so genannte Hauptkomponenten (Principal Components, PC), überführt, wobei die erste Hauptkomponente die größtmögliche Variabilität der Daten berücksichtigt und jede nachfolgende Komponente die größtmögliche noch verbleibende Variabilität. In Abhängigkeit davon, welchen Beitrag dabei jedes, der zu Grunde liegenden Gene zur Separierung entlang der Hauptkomponenten leistet, wird diesen ein Wert zwischen Null und Eins zugeordnet.

Das Hierarchische Clustering stellt eine Hierarchie mit individuellen Elementen auf der einen und einem einzelnen Cluster, das alle Elemente in Form eines so genannten Dendrogramms beinhaltet, auf der anderen Seite graphisch dar. In einem ersten Schritt wird dazu eine paarweise Distanzmatrix zwischen all denjenigen Experimenten berechnet, die für ein Cluster mit einem Element in Betracht gezogen werden. Letztlich stellt das Dendrogramm die Agglomerations-Distanzen in einem hierarchischen Baum anschaulich dar.

Um die Genregulation in unterschiedlichen Klassen zu untersuchen, wurde der Student's t-Test als univariate Analyse durchgeführt. Dieser prüft Unterschiede im arithmetischen Mittel und setzt voraus, dass die Daten innerhalb jeder Gruppe mit identischer Varianz normalverteilt sind. Zwei Gruppen werden dabei als signifikant unterschiedlich erachtet, wenn die Unterschiede im arithmetischen Mittel relativ zur beobachteten Varianz groß sind. Hierzu wurde jeweils der paarweise Vergleich zwischen den Proben der gestagenbehandelten Tiere und denen der entsprechenden Vehikelkontrollen angestellt, wobei auf alle Daten ein $p\text{-value} \leq 0,01$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 1\%$) angewendet wurde. Als weiteres Akzeptanzkriterium wurde festgelegt, dass nur diejenigen Gene zur Auswertung herangezogen werden sollten, deren Fold Change (FC) ≥ 2 war. Als Ergebnis wurde so für jede Behandlungsgruppe der gemittelte FC für diejenigen Gene erhalten, die im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant und mindestens zweifach unterschiedlich exprimiert waren.

4.4.3.1.5 Ermittlung der Lage eines Probe Sets innerhalb des entsprechenden Transkripts

Probe Sets relevanter Gene und deren zugehörige Gensequenzen wurden mittels Affymetrix' NetAffx (2009) identifiziert, die NCBI Reference Sequences von Affymetrix angegeben. Neben der Ermittlung der Länge des durch alle elf Sequenzen eines Probe Sets abgedeckten Bereichs wurde die Distanz vom 3'-Ende einer jeden letzten Sequenz eines Probe Sets zum 3'-Terminus des entsprechenden Transkripts, abzüglich des terminalen Poly-A-Schwanzes, berechnet.

4.4.3.2 TaqMan[®] Low Density Arrays (TLDA)

Um eventuelle Fehlhybridisierungen auf den Affymetrix GeneChips[®] für 96 spezifizierte Gene zu überprüfen und deren Expression in ausgewähltem Probenmaterial zu analysieren, wurden deren Expressionslevel durch qRT-PCR (8.11) im TLDA-Format verifiziert. Dazu wurden auf TaqMan[®] Array Micro Fluidic Cards vorkonstruierte TaqMan[®] Gene Expression Assays und das 7900HT Fast-Real-Time PCR System von Applied Biosystems genutzt. Insgesamt wurden 76 Proben anhand von 38 TLDA durchgeföhrt, bestehend aus 24 Uterus-Proben der In-vivo-Experimente und 52 ELT 3-Proben der In-vitro-Experimente. Diese setzten sich aus jeweils drei Uterus-Proben der In-vivo-Experimente nach 28-tägiger

Applikation der pharmakologisch wirksamen Dosis von R5020, MPA bzw. P4 sowie der Vehikelkontrollen, jeweils sechs Uterus-Proben des In-vivo-Experiments nach 28-tägiger Applikation von LNG sowie der Vehikelkontrollen und jeweils zwei ELT 3-Proben der In-vitro-Experimente nach 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit beiden Konzentrationen von PRL, R5020, MPA bzw. P4 sowie der drei Vehikelkontrollen zusammen. Dabei sind von den substanzbehandelten ELT 3-Zellen während des Versuches zwei Behandlungsgruppen abgestorben und konnten daher nicht analysiert werden. Die Durchführung der TLDA erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls.

Jede TaqMan[®] Array Micro Fluidic Card (Applied Biosystems) umfasste 384 Wells, in denen sich für jedes der 96 eigens ausgewählten Gene (Tabelle 22, 8.16) spezifische vorkonstruierte Primer und Sonden befanden. Da die Messung im Singleplex-Verfahren erfolgte, wurden pro Card parallel in zwei Proben alle 96 Gene gleichzeitig und in Doppelbestimmung analysiert. Dazu wurden die Proben über je vier Reservoirs durch Zentrifugationstechnologie in die entsprechenden Wells des Arrays gebracht, in denen sich Primer und Sonde des jeweiligen Zielgens befanden. Während der anschließenden Inkubation wurden 40 PCR-Zyklen durchlaufen (8.12).

4.4.3.2.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Genexpressionsdaten wurde bei jedem PCR-Zyklus die Fluoreszenz im Probenmaterial gemessen und anschließend als Kurve dargestellt. Anhand dieser wurde die Anzahl der PCR-Zyklen ermittelt, nach denen die Fluoreszenz einer jeden Probe erstmals einen Schwellenwert überstiegen hat und einen messbaren Wert über dem Grundrauschen annahm. Diese wird als Cycle of Threshold (C_T -Wert) bezeichnet und wurde zur Auswertung herangezogen. Je kleiner der Anteil des Transkripts in der Probe zu Beginn war, umso mehr Amplifikationszyklen waren notwendig, bis die Fluoreszenz den Schwellenwert erreichte. Da eine Veränderung des Fluoreszenzsignals jedoch nicht nur mit der in den Zellen vorhandenen Menge des zu untersuchenden Zielgens in Zusammenhang steht, sondern auch mit der eingesetzten Menge an cDNA schwankt, ist es notwendig, die RNA-Menge zur Quantifizierung auf ein unverändert auftretendes Referenzgen zu beziehen (relative Quantifizierung). Hierfür und um Unterschiede in der Menge an Template-cDNA auszugleichen, diente *Gapdh* als Referenzgen. Voraussetzung für die Verwendung als interner Standard ist die unveränderte Expression des Gens während der Versuchsdurchführung, das heißt, dass keine Beeinflussung durch die Substanzbehandlung vorliegt. Um dies zu überprüfen erfolgte daher die Schätzung der Stabilität (52) von *Gapdh* mittels Software-Paket R (Version 2.9.0) (53) mit dem Paket SLqPCR (54).

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels Sequence Detector Version 2.0 bzw. RQ Manager 2.1 (Applied Biosystems) unter Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung. Hierzu wurden zunächst für jedes Gen die Mittelwerte der C_T -Werte beider Replikate identisch behandelter Tiere gebildet. Die Zielsequenz wurde dann in ihrer Expression gegenüber dem C_T -Wert des endogenen Kontrollgens (C_T Zielgen - C_T endogenes Kontrollgen = ΔC_T) und anschließend gegenüber dem C_T -Wert einer definierten Kontrollprobe, dem Kalibrator, normalisiert (ΔC_T Probe - ΔC_T Kalibrator = $\Delta\Delta C_T$). Unter Anwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ wurde letztlich die normalisierte relative Expression des jeweiligen Zielgens in einer Behandlungsgruppe berechnet. Über den paarweisen Vergleich der Vehikelkontrollen mit den gestagenbehandelten Tieren wurde die relative Expression der analysierten Gene infolge Substanzbehandlung ermittelt. Als

Akzeptanzkriterium wurde dabei festgelegt, dass nur die Daten zur Auswertung herangezogen wurden, bei denen für beide Replikate eines Gens ein Signal detektiert wurde. Da eine identische, nahezu bei 100 % befindliche Amplifizierungseffizienz von Ziel- und Referenzsequenz Voraussetzung für die statistische Auswertung mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode war, wurde die Amplifizierungseffizienz der verwendeten TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) mittels Software-Paket R (Version 2.9.0) (53) mit dem Paket qpcR überprüft (55).

4.5 Proteinbiochemie

Für den qualitativen Nachweis spezifischer Proteine in ausgewählten Proben kamen verschiedene proteinbiochemische Methoden zum Einsatz. So wurde die basale Expression des PR in den verwendeten ELT 3-Zellen mittels Immunoblotting nachgewiesen, um deren Eignung zur Charakterisierung gestagener Wirkung sicherzustellen. Um ausgewählte Substanzeffekte an der Mamma näher zu charakterisieren und deren verschiedene Zellschichten zu visualisieren, wurde hingegen der Oxytocin-Rezeptor (OXTR) als epitheliales Markerprotein mittels Immunhistochemie nachgewiesen.

4.5.1 Immunoblotting

Die basale Expression des PR wurde in insgesamt fünf identisch behandelten ELT 3-Zellpopulationen der beiden In-vitro-Substanztestungen immunologisch nachgewiesen. Dazu wurden sämtliche aus dem Zellhomogenat extrahierten löslichen Proteine zunächst quantifiziert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert. Das Zielprotein wurde letztlich unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) qualitativ nachgewiesen.

4.5.1.1 Proteinextraktion

Zum Zeitpunkt der Substanzinkubation wurde ein Teil der ELT 3-Zellen zunächst pelletiert und mittels Rotor-Homogenizer homogenisiert. Dabei lagen pro Pellet durchschnittlich 5×10^6 Zellen von etwa 35 mg Gewicht vor, die pro Gramm in 4 mL eines speziellen Hochsalzextraktionspuffers (8.4) aufgenommen und bei 1000 rpm und 4 °C für 1 min homogenisiert wurden. Um das überwiegend im Zellkern lokalisierte PR-Protein zugänglich zu machen, wurden die Homogenate für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte deren Ultrazentrifugation für weitere 60 min bei $100.000 \times g$ und 4 °C, wodurch sich die enthaltenen löslichen und unlöslichen Proteine voneinander trennten. Zum Nachweis des PR wurden die im Überstand enthaltenen löslichen Fraktionen der zellulären Proteine abgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

4.5.1.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung des im Überstand enthaltenen Gesamtproteins erfolgte kolorimetrisch unter Verwendung des Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) mithilfe einer Standardkurve (2000 µg/mL BSA in Homogenisierungspuffer) gemäß des Herstellerprotokolls.

Diese Methode beruht auf der Reduktion zweiwertiger zu einwertigen Kupferionen durch die im Probenmaterial enthaltenen Proteine, infolge dessen diese mit der im Reaktionsansatz enthaltenen Bicinchoninsäure zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe reagieren. Diese hat ihr Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann photospektrometrisch bestimmt werden.

4.5.1.3 SDS-PAGE und Immunoblotting

Die löslichen Proteinfractionen der fünf Proben wurden jeweils mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurden die einzelnen Proben zunächst mit Probenpuffergemisch (8.4) versetzt und im Thermomixer für 10 min bei 75 °C denaturiert. Neben dem Molekulargewichtsstandard wurden 5 µg Protein der Positiv-Kontrolle und je nach Proteingehalt 7 bis 50 µg Gesamtprotein der Proben auf ein Gel aufgetragen. Nach Zugabe von Antioxidantien (8.4) zum Laufpuffer (8.4) wurden die Proteinfractionen bei einer Spannung von 180 V für 1 h bei Raumtemperatur ihrer Größe entsprechend separiert.

Mittels iBlot[®] Dry Blotting System (Invitrogen GmbH) wurden die separierten Proteine anschließend bei einer Spannung von 20 V innerhalb von 6 min positionsgenau auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für den spezifischen Nachweis der Proteine wurden freie Bindungsstellen auf der Membran während einer einstündigen Inkubation in Blocking Solution (8.4) vollständig abgesättigt. Dadurch sollte verhindert werden, dass der Primärantikörper unspezifisch bindet. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Progesterone Receptor (SP2), #RM-9102-S; Thermo Fisher Scientific) (1:25 in Blocking Solution verdünnt) erfolgte unter Schwenken bei 4 °C über Nacht. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte schließlich die Inkubation mit dem Horse-Reddish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG, #A-6154; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (1:5000 in Blocking Solution verdünnt) für 1 h unter Schwenken bei RT.

Nach erneutem mehrmaligen Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte letztlich die Detektion des Zielproteins über Chemolumineszenz unter Verwendung des ECL kit (Amersham Bioscience) gemäß des Herstellerprotokolls. Dazu wurde die Membran für 2 min mit Luminol inkubiert, das als Substrat der HRP oxidiert wurde und überall dort Licht emittierte, wo eine Antigen-AK-Reaktion stattgefunden hatte. Diese konnte durch 15-sekündige Exposition auf einem Kodak[®] BioMax[™] MR film sichtbar gemacht werden und diente so dem Nachweis der Expression des PR im ELT 3-Probenmaterial.

4.5.2 Immunhistochemie (IHC)

Zur Visualisierung verschiedener Zellschichten der Mamma wurde der OXTR als Marker für Mamma-Epithelien (56) mittels eines spezifischen AK immunhistochemisch nachgewiesen. Dazu wurde die Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) angewendet. Sie beruht auf der Detektion einer Antigen-AK-Reaktion an einem Gewebeschnitt, die mittels Streptavidin-basierter Färbesysteme und einer nachfolgenden enzymatischen Farbreaktion (z.B. HRP) sichtbar gemacht werden kann. So wird die genaue Identifizierung und Lokalisierung der Antigen-exprimierenden Zellen und damit eine qualitative, nicht jedoch eine quantitative Aussage ermöglicht.

4.5.2.1 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung (8.13) erfolgte anhand von je 5 µm dicken histologischen FFPE-Gewebeschnitten der Mamma jeweils einer Ratte nach 28-tägiger Applikation der jeweils höchsten Dosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 sowie der entsprechenden Vehikelkontrolle. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert. Anschließend wurde eine eventuelle Maskierung (aldehydische Quervernetzung antigener Determinanten) von Antigenen infolge der Formalinfixierung mittels Wärmeverbehandlung unter Einwirkung von Citratpuffer (8.4) aufgehoben. Nach dem Blocken der endogenen Peroxidase und unspezifischen Proteinbindungen im Gewebe folgte die 60-minütige Inkubation mit dem polyklonalen Primärantikörper (Oxytocin Receptor antibody, #SP4440P; Acris Antibodies GmbH), der vor Gebrauch 1:60 (16,7 µg/mL) mit Common AB Diluent verdünnt wurde. Anschließend wurde das Gewebe für 20 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Biotinylated Goat anti-Rabbit Immunglobuline, Rabbit-Link, #HK326-UR; BioGenex) inkubiert, der vor Gebrauch 1:20 mit Link Diluent verdünnt wurde und den primären AK spezifisch bindet. Schließlich wurde für 20 min Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Label) (8.4) auf das Gewebe gegeben. Dieses zeichnet sich durch eine hohe Affinität zum Biotin des Sekundärantikörpers aus und bindet es spezifisch. Während der einminütigen Inkubation mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) (8.4) wurde dieses durch die HRP oxidiert und die initiale spezifische Antigen-AK-Bindung indirekt durch ein gold- bis dunkelbraunes Färbeergergebnis der Zielstruktur sichtbar. Abschließend wurde eine Kernfärbung des untersuchten Gewebes mit Hämalaun nach Mayer vorgenommen und der Gewebeschnitt zur Dokumentation und Archivierung in Eukitt® eingedeckt.

Die Auswertung des Gewebeschnitts erfolgte am Axioskop 40 mittels der AxioVision LE Software von Zeiss. Hierbei wurden die Schnitte auf ein positives Färbeergergebnis der Zielstruktur untersucht und qualitativ ausgewertet.

4.5.2.2 Gewebekontrollen

Zur Bestätigung der immunhistochemischen Färbergebnisse und Identifizierung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurden eine positive Gewebekontrolle und eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente dabei ein Gewebeschnitt des Uterus einer unbehandelten Ratte aus der Gewebesammlung der Bayer Schering Pharma AG (Berlin), der das jeweilige Antigen sicher aufwies und analog zu den zu untersuchenden Gewebeproben behandelt wurde. Damit wurde die Spezifität des ausgewählten Primärantikörpers sichergestellt. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein Gewebeschnitt einer Vehikelkontrolle mitgeführt. Dieser wurde anstelle des Primärantikörpers mit dem Negativkontrollserum (Rabbit) (8.4) behandelt und diente so der Überprüfung der Arbeitstechnik und Reagenzien.

5 Ergebnisse

5.1 Gestageneffekte am Uterus der Ratte

Als Reproduktionsorgan der Ratte gehört der Uterus zu den primären Zielorganen von Gestagenen. Um die Wirkungsweise dieser Substanzklasse charakterisieren zu können, wurde neben der Bewertung der Organgewichte und Histologie auch die gestagenbedingte differenzielle Genexpression am Uterus untersucht. Da insbesondere die pharmakologisch wirksame Dosis von Interesse ist, um den Effekt von Gestagenen zu beschreiben, sollten Markergene identifiziert werden, die die Gestagenwirkung am Uterus in dieser Dosis in vivo und in vitro charakterisieren. Außerdem sollten spezifische Substanzeffekte identifiziert und näher charakterisiert werden.

5.1.1 In-vivo-Experimente

Pro Behandlungsgruppe wurde sechs weiblichen Ratten täglich eines von vier verschiedenen Gestagenen (PRL, R5020, MPA bzw. P4) in zwei Dosierungen über einen Zeitraum von 28 Tagen appliziert. Die niedrigere Dosis entsprach dabei der ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis der jeweiligen Testsubstanz, die höhere dem 10-fachen dieser pharmakologisch wirksamen Dosis.

5.1.1.1 Befunde konventioneller toxikologischer Parameter

Bei Sektion wurden zunächst die Gewichte der Uteri ermittelt, bevor diese für die nachfolgenden Aufarbeitungen entsprechend fixiert wurden. Zur histologischen Charakterisierung wurden FFPE-Schnitte von Horn, Corpus und Cervix der Uteri herangezogen. In Tabelle 4 sind die histologischen Befunde zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4 – Übersicht über die Histologie am Uterus nach täglicher Behandlung mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 über 28 Tage.

Substanzbedingter Befund am Uterus	PRL		R5020		MPA		P4	
	10 µg/kg/d	100 µg/kg/d	100 µg/kg/d	1000 µg/kg/d	1 mg/kg/d	10 mg/kg/d	15 mg/kg/d	150 mg/kg/d
Vermindertes absolutes und relatives Organgewicht						x		x
Sekretion und Dilatation der Uterusdrüsen im Uterus corpus	x	x	x	x	x	x	x	x
Atrophie der Mucosa im Uterus corpus oder Gebärmutterhals			x			x	x	x
Epitheliale Muzifikation und/oder Atrophie der Mucosa des Gebärmutterhalses	x	x	x	x	x	x	x	x

Infolge der Gestagenbehandlung wurden nach Applikation beider Dosierungen der vier Gestagene PRL, R5020, MPA und P4 Sekretion und Dilatation der Drüsen im Uterus corpus sowie epitheliale Muzifikation und / oder Atrophie der Mucosa des Gebärmutterhalses beobachtet. Eine Atrophie der Mucosa im Uterus corpus oder Gebärmutterhals wurde infolge der Applikation der pharmakologisch wirksamen Dosis von R5020 und P4 sowie der 10-fach höheren Dosis von MPA und P4 beobachtet. Die Verminderung des absoluten und relativen Uterus-Gewichts nach Behandlung mit der hohen MPA- und P4-Dosierungen reflektierte den atrophischen Zustand des Organs.

5.1.1.2 Genexpressionsanalyse am Uterus

Zur Analyse von Genexpressionsprofilen wurde die RNA eines der bei Sektion in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Uterus-Horns isoliert und auf Affymetrix GeneChips[®] hybridisiert. Zur Auswertung herangezogen wurden die Daten von acht Kontrolltieren nach s.c. Applikation des Vehikels und sechs Tieren pro Behandlungsgruppe. Aufgrund unzureichender Akzeptanzkriterien standen von den PRL-behandelten Tieren jedoch nur die Daten von je fünf Tieren zur Verfügung. Die Genexpressionsanalyse lieferte für jede der insgesamt 54 Uterus-Proben rund 30.000 Daten zur Expression der auf den GeneChips[®] (Affymetrix) befindlichen Transkripte.

5.1.1.2.1 Multivariate Analyse

In einem ersten Schritt sollte eine generelle Übersicht über die komplexen Datensätze erhalten und visualisiert werden. Dazu wurden Hauptkomponentenanalysen und Hierarchisches Clustering durchgeführt.

Die PCA der Daten aller Behandlungsgruppen veranschaulichte die jeweiligen Gruppenzugehörigkeiten. Abbildung 11 zeigt, dass die Proben äquipotenter Gestagensdosis beieinander clusterten und sich ein leichter Dosiseffekt entlang der zweiten Hauptkomponente (PC2) erkennen ließ. Mit einem Anteil von 8,5 % spiegelte diese die zweitgrößte Variabilität der Genexpressionsdaten wider. Deutlicher separierten sich drei Proben der Vehikelkontrollen und sämtliche Proben der hohen MPA-Dosis entlang der PC1, die mit einem Anteil von 15,9 % die größte Datenvariabilität widerspiegelte. Damit wurde ein Dosiseffekt entlang der PC1 für MPA am deutlichsten. Gene, die am stärksten zu dieser Datenvariabilität und damit Separierung beitrugen, konnten identifiziert werden und waren beispielsweise *matrix metalloproteinase 7 (Mmp7)*, *GLI-Kruppel family member GLI1 (Gli1)*, *calcitonin/calcitonin-related polypeptide alpha (Calca)*, *solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter) member 11 (Slc5a11)*, *wingless-type MMTV integration site family member 7A (Wnt7a)*, *cytochrome P450 family 2 subfamily f polypeptide 4 (Cyp2f4)*, *insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1)*, *cytochrome P450 family 26 subfamily A polypeptide 1 (Cyp26a1)*, *napsin A aspartic peptidase (Napsa)* und *potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 1 (Kcnj1)*. Die Abbildung zeigt außerdem, dass jeweils die Proben gleicher Substanzbehandlung und Dosis eng beieinander lagen. In Abhängigkeit des jeweils applizierten Gestagens und dessen Dosis ließ sich daher eine leichte Trennung der einzelnen Behandlungsgruppen entlang der PC2 erkennen. Mit insgesamt rund 30 % spiegelten die ersten drei Hauptkomponenten jedoch nur einen begrenzten Teil der Datenvariabilität wider.

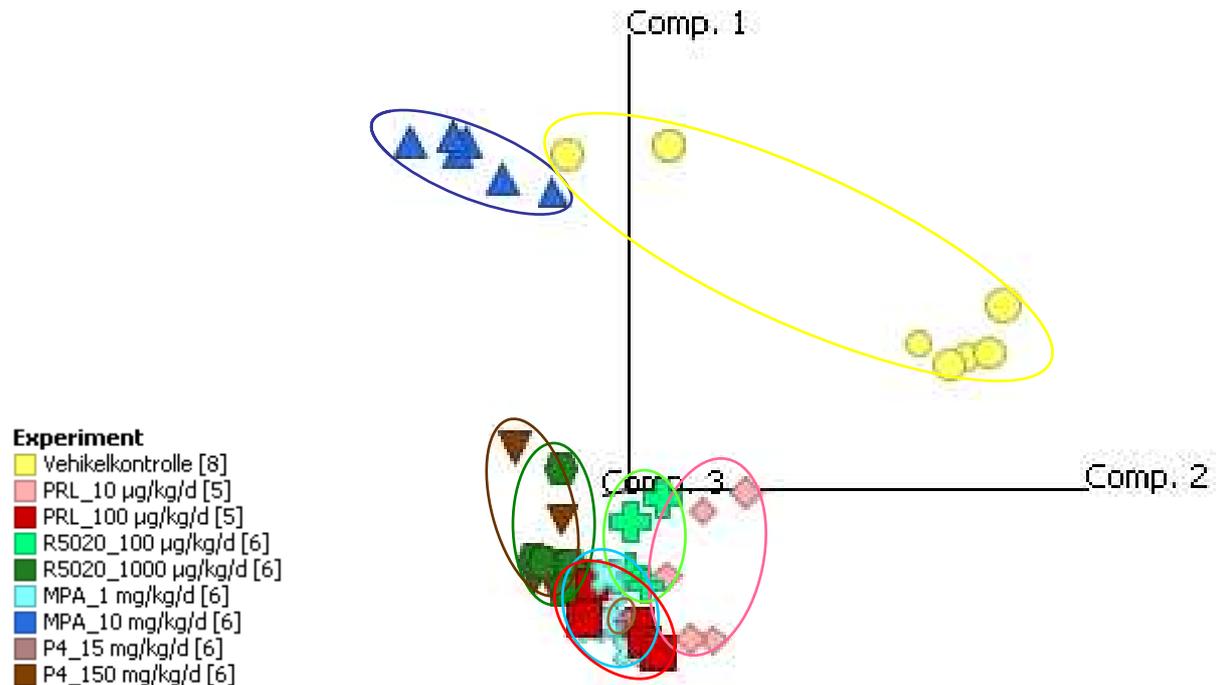


Abbildung 11 – Hauptkomponentenanalyse der Uterus-Proben gestagenbehandelter Ratten. Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Gestagendosis und/oder Substanzbehandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Das Genexpressionsprofil jeder einzelnen Probe wird durch das jeweilige Symbol widergespiegelt. Die Proben sind in Abhängigkeit von der Gestagendosis und Substanzbehandlung dargestellt.

Um einzelne Gruppenzugehörigkeiten besser erfassen zu können, wurden die Uterus-Proben äquipotenter Gestagendosierungen separat mittels Hierarchischem Clustering analysiert. In der niedrigen Dosis (Abbildung 12 A) zeigten sich im Wesentlichen zwei Cluster, die einerseits durch die Proben der Vehikelkontrollen und andererseits durch die Proben der gestagenbehandelten Tiere gebildet wurden. Eindeutige Subcluster bestanden nicht. In der hohen Dosis (Abbildung 12 B) zeigten sich ebenfalls zwei wesentliche Cluster, gebildet durch die Proben der Vehikelkontrollen und die der MPA-behandelten Tiere auf der einen und die der P4- und R5020- sowie PRL-behandelten Tiere auf der anderen Seite. Die einzelnen Behandlungsgruppen dieser Dosis hingegen waren in Subclustern separiert.

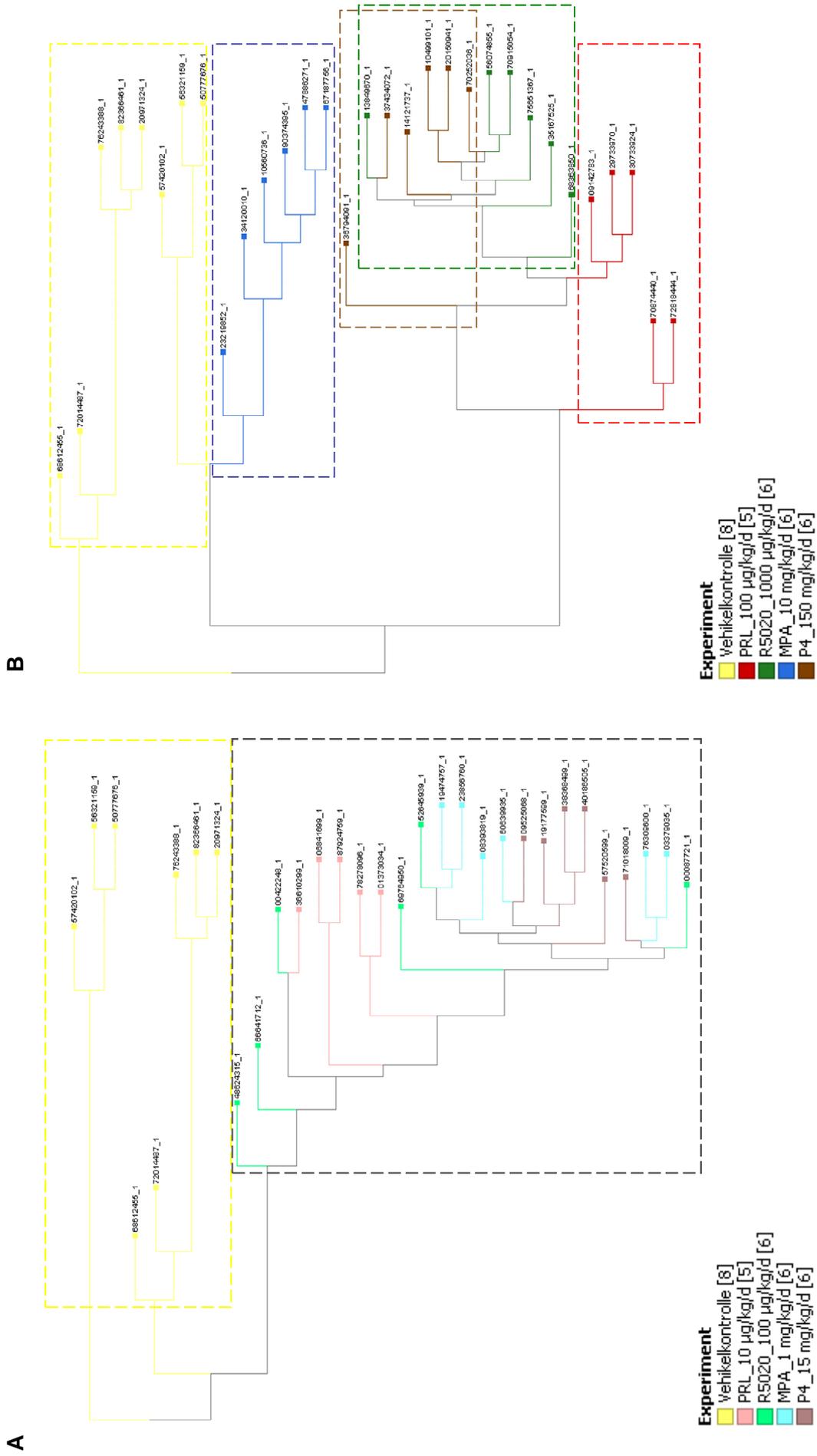


Abbildung 12 – Hierarchisches Clustering der Uterus-Genexpressionsprofile gestagenbehandelter Ratten. Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Gestagensubstanz und Substanzbehandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Proben mit großen Ähnlichkeiten zwischen den Genexpressionsprofilen sind eng in Form von Cluster gruppiert. A: ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 und Vehikelkontrollen; B: 10-fache ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 und Vehikelkontrollen

5.1.1.2.2 Univariate Analyse

In einem zweiten Schritt sollte die Regulation der Genexpression innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen analysiert und miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Student's t-Tests durchgeführt (p -value $\leq 0,01$; $FC \geq 2$), um die innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen deregulierten Gene zu ermitteln.

Die Anzahl der infolge der jeweiligen Testsubstanz und Dosis signifikant deregulierten Gene ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Mit 1192 deregulierten Genen waren die insgesamt beobachteten Genexpressionsänderungen bei den Tieren der pharmakologisch wirksamen MPA-Dosis am ausgeprägtesten und mit 316 bei PRL in der äquipotenten Dosis am geringsten. Insgesamt resultierte bei MPA und P4 eine höhere Anzahl deregulierter Gene als bei PRL und R5020. Dabei war bei letzteren insbesondere eine Repression, bei MPA und P4 hingegen eine Induktion von Genen zu beobachten.

Tabelle 5 – Anzahl signifikant deregulierter Gene nach Behandlung mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 im Vergleich zu den entsprechenden Vehikelkontrollen der Uterus-Proben (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Testsubstanz	Dosis	Anzahl deregulierter Gene		
		Induziert	Reprimiert	Gesamt
PRL	10 µg/kg/d	316	436	752
	100 µg/kg/d	474	624	1098
R5020	100 µg/kg/d	405	454	859
	1000 µg/kg/d	514	503	1017
MPA	1 mg/kg/d	602	590	1192
	10 mg/kg/d	520	563	1082
P4	15 mg/kg/d	600	545	1145
	150 mg/kg/d	545	544	1089

Zur Charakterisierung einzelner Substanz- und Dosiseffekte wurden die im Vergleich zur Kontrolle signifikant deregulierten Gene innerhalb jeder einzelnen Behandlungsgruppe identifiziert. Die zehn stärksten induzierten und reprimierten Gene jeder Gruppe sind in den Tabellen 23 A-D (8.16) zusammenfassend dargestellt. Wie sich zeigte, war die Regulierungsrichtung (Induktion oder Repression) gleicher Gene bei den Tieren aller Behandlungsgruppen identisch, das Ausmaß der Regulation jedoch zum Teil stark unterschiedlich. So variierte die Repression von *Mmp7* beispielsweise zwischen 20- (10 µg/kg/d PRL) und 372-fach (100 µg/kg/d PRL). Des Weiteren wurde deutlich, dass die am stärksten deregulierten Gene zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu großen Teilen übereinstimmten. Lediglich die Tiere der hohen MPA-Dosis unterschieden sich von den übrigen. Ein einziges Gen, *Ttk*, war innerhalb jeder Behandlungsgruppe unter den zehn stärksten deregulierten Genen, das Ausmaß der Repression variierte jedoch auch hier je nach Gestagen zwischen 10- (100 µg/kg/d R5020) und 61-fach (15 mg/kg/d P4). *Cyp2f4* (147- bis 388-fache Induktion), *Cyp26a1* (164- bis 222-fache Induktion), *Slc17a3* (134- bis 171-fache Induktion), *Kcnj1* (122- bis 240-fache Induktion), *Igf1* (56- bis 74-fache Induktion), *Mmp7* und *cyclin A2 (Ccna2)* (11- bis 23-fache Repression) fielen bei allen Behandlungsgruppen unter die zehn stärksten deregulierten Gene, nicht jedoch bei den Tieren der hohen MPA-Dosis. Hier wurden Gene wie *gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor alpha 1 (Gabra1)*, *deoxyribonuclease I (Dnase1)*, *GDNF family receptor alpha 4*

(*Gfra4*), *galanin prepropeptide (Gal)* und *D-amino-acid oxidase (Dao)* sowie *prion protein 2 dublet (Prnd)*, *chloride channel calcium activated 3 (Clca3)*, *regenerating islet-derived 3 gamma (Reg3g)*, *oxytocin prepropeptide (Oxt)* und *ficolin B (Fcnb)* am stärksten induziert bzw. reprimiert. Dabei zeigte sich, dass *Gabra1* mit einer 441-fachen Induktion die mit Abstand größte Deregulierung aller Gene innerhalb dieser und im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen erfahren hat.

Zur näheren Charakterisierung des unterschiedlichen Effekts der hohen MPA-Dosis am Rattenuterus wurden diejenigen Gene ermittelt, die ausschließlich bei den Tieren dieser Behandlungsgruppe dereguliert wurden. Dazu wurde ein Venn-Diagramm erstellt (Abbildung 13) und 575 Gene identifiziert, die ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis dereguliert wurden (Tabelle 6). Zu den 20 stärksten deregulierten der so ermittelten Gene gehörten *Gabra1* (441-fach induziert), *Dnase1* (68-fach induziert), *Gfra4* (53-fach induziert), *Gal* (37-fach induziert), *Tpsab1* (30-fach induziert), *Gulo* (30-fach induziert), *Frmpr1* (29-fach induziert) und *Slc13a5* (21-fach induziert) sowie *S100g* (53-fach reprimiert), *Cfi* (21-fach reprimiert) und *Clca3* (13-fach reprimiert), die bereits mittels Student's t-Test als am stärksten deregulierte Gene innerhalb dieser Behandlungsgruppe identifiziert wurden (siehe Tabelle 23 C, 8.16). Weitere identifizierte Gene waren beispielsweise *Slc17a2* und *Ucn2*, die induziert sowie *Mlf1*, *Accn1*, *Ccl11*, *Itgb6*, *Pcdh17*, *Slc26a4* und *Dhrs9*, die reprimiert wurden.

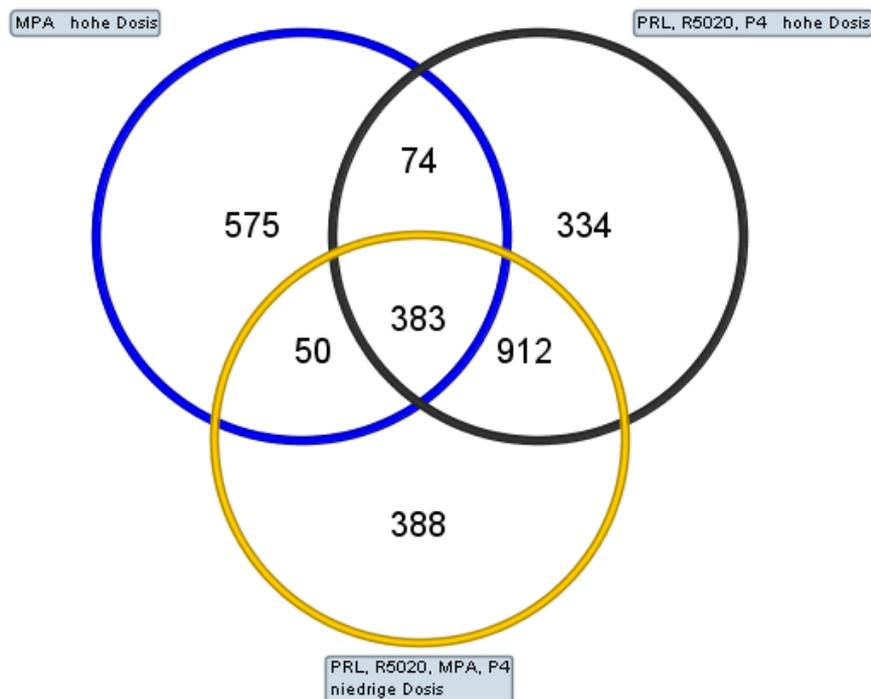


Abbildung 13 – Venn-Diagramm zur Identifizierung der ausschließlich nach Behandlung mit der hohen MPA-Dosis im Uterus deregulierten Gene im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen. Dargestellt ist die Anzahl der zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen gemeinsam sowie einzigartig deregulierten Gene nach der jeweiligen Gestagengabe (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Tabelle 6 – Übersicht über die am stärksten und ausschließlich nach Applikation der hohen MPA-Dosis im Uterus deregulierten Gene.

Gename (<i>Rattus norvegicus</i>) MPA 10 mg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	<i>Gabra1</i>	1380828_at	NM_183326.2
deoxyribonuclease I	<i>Dnase1</i>	1368084_at	NM_013097.2
GDNF family receptor alpha 4	<i>Gfra4</i>	1369730_a_at	NM_023967.1
galanin prepropeptide	<i>Gal</i>	1387088_at	NM_033237.1
tryptase alpha/beta 1	<i>Tpsab1</i>	1387162_at	NM_019322.2
gulonolactone (L-) oxidase	<i>Gulo</i>	1369837_at	NM_022220.2
FERM and PDZ domain containing 1	<i>Fimpd1</i>	1377693_at	NM_001107937.1
solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5	<i>Slc13a5</i>	1383600_at	NM_170668.1
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2	<i>Slc17a2</i>	1386274_at	NM_001107353.1
urocortin 2	<i>Ucn2</i>	1369619_at	NM_133385.2
S100 calcium binding protein G	<i>S100g</i>	1368339_at	NM_012521.1
complement factor I	<i>Cfi</i>	1368205_at	NM_024157.1
chloride channel calcium activated 3	<i>Clca3</i>	1390238_at	NM_001107449.1
myeloid leukemia factor 1	<i>Mlf1</i>	1377659_at	NM_001107680.1
amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal	<i>Accn1</i>	1371140_a_at	NM_001034014.1
chemokine (C-C motif) ligand 11	<i>Ccl11</i>	1387319_at	NM_019205.1
integrin, beta 6	<i>Irgb6</i>	1382439_at	NM_001004263.1
protocadherin 17	<i>Pcdh17</i>	1393454_at	NM_001107279.1
solute carrier family 26, member 4	<i>Slc26a4</i>	1368193_at	NM_019214.1
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	<i>Dhrs9</i>	1369279_at	NM_130819.1

Dargestellt sind je zehn der am stärksten und ausschließlich in dieser Behandlungsgruppe induzierten und reprimierten Gene im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

5.1.1.2.2.1 Identifizierung von Markergenen zur Charakterisierung des pharmakologischen Effekts von Gestagenen am Uterus

Um den gemeinsamen Effekt der pharmakologisch wirksamen Dosis der vier Gestagene am Rattenuterus analysieren zu können, wurden auf Grundlage der jeweiligen signifikant deregulierten Gene die innerhalb dieser Behandlungsgruppen gemeinsam deregulierten ermittelt. Aus diesen insgesamt 263 Genen wurden schließlich diejenigen zu einem Set von 50 Genen zusammengestellt, die infolge jeder einzelnen Substanzbehandlung am stärksten dereguliert waren. Diese gemeinsamen 25 induzierten und 25 reprimierten Gene wurden als Genset 1 festgelegt und sind in Tabelle 7 aufgeführt. Durch alle Gestagene mit Abstand am stärksten induziert wurden dabei die Gene *Cyp2f4* (180- bis 322-fach), *Cyp26a1* (164- bis 218-fach) und *Kcnj1* (122- bis 230-fach). Am stärksten reprimiert wurde *MMP7*, am deutlichsten durch MPA (257-fach).

Eine weitere Möglichkeit, die gemeinsamen signifikant deregulierten Gene nach Gestagenbehandlung zu ermitteln, besteht darin, die Daten der Proben aller substanzbehandelten Tiere mittels Student's t-Test als eine Gruppe gegen die der Vehikelkontrollen zu testen. Auf diese Weise konnten 1222 deregulierte Gene identifiziert werden. Wie sich zeigte, stimmten die am stärksten deregulierten dieser Gene mit denen des Gensets 1 weitgehend überein. Einzelne dieser insgesamt 590 induzierten und 632 reprimierten Gene hingegen konnten ermittelt werden, die zu den am stärksten deregulierten Genen gehörten, nicht jedoch Bestandteil des Gensets 1 waren. Je elf von diesen wurden zu einem weiteren Set aus insgesamt 22 Genen zusammengestellt und als Genset 2 festgelegt (Tabelle 8). Die Ermittlung der zugehörigen FCs zeigte, dass einzelne Gene separat betrachtet nicht bei allen Proben der gestagenbehandelten Tiere detektiert wurden. Insbesondere *Lipf* und *Calca* fielen hier auf, da diese in keiner der einzelnen Behandlungsgruppen ein signifikantes Signal lieferten, sondern erst durch Betrachtung aller Progestine als eine Gruppe. Durch alle Gestagene mit Abstand am stärksten induziert wurde *Slc17a3* (134- bis 156-fach).

Tabelle 7 – Übersicht über die 50 Gene des Gensets 1.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change PRL	R5020	MPA	P4
Induzierte Gene							
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	1368608_at	NM_019303.1	286	180	219	322
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp26a1</i>	1387583_at	NM_130408.2	178	164	200	218
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	<i>Kcni1</i>	1369451_a_at	NM_017023.1	122	141	230	174
guanylate cyclase activator 2B	<i>Guca2b</i>	1387253_at	NM_022284.2	22	133	178	72
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igf1bp1</i>	1368160_at	NM_013144.1	60	56	67	65
Cd69 molecule	<i>Cd69</i>	1384837_at	NM_134327.1	80	16	57	68
secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	1367581_a_at	NM_012881.2	36	64	56	54
napsin A, aspartic peptidase	<i>Napsa</i>	1368521_at	NM_031670.2	50	42	46	45
aquaporin 8	<i>Aqp8</i>	1368316_at	NM_019158.2	21	28	41	49
aldolase B, fructose-bisphosphate	<i>Aldob</i>	1370299_at	NM_012496.2	26	24	35	32
synaptotagmin VI	<i>Syt6</i>	1369046_at	NM_022191.1	16	20	32	39
oxytocin, prepropeptide	<i>Oxt</i>	1368312_at	NM_012996.2	18	33	29	21
carbonic anhydrase 4	<i>Car4</i>	1368437_at	NM_019174.1	25	21	28	28
defensin beta 1	<i>Defb1</i>	1369660_at	NM_031810.1	14	35	28	14
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	<i>Oprm1</i>	1387961_at	NM_053848.1	21	19	23	19
plasma membrane activator, urokinase	<i>Plau</i>	1398287_at	NM_013085.3	16	16	25	22
guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	<i>Guca2a</i>	1368471_at	NM_013118.1	18	15	23	19
fibronogen alpha chain	<i>Fga</i>	1370992_a_at	NM_001008724.1	18	34	16	4
calbindin 1	<i>Calb1</i>	1370201_at	NM_031984.2	18	18	16	19
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	<i>Hsd11b1</i>	1386953_at	NM_017080.2	14	16	18	16
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	<i>Vtn1</i>	1380134_at	NM_001024244.1	17	14	17	16
fatty acid binding protein 5, epidermal	<i>Fabp5</i>	1370281_at	NM_145878.1	11	12	21	17
chemokine (C-C motif) ligand 20	<i>Ccl20</i>	1369814_at	NM_019233.1	11	9	18	21
soluble carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	<i>Slc10a1</i>	1368609_at	NM_017047.1	15	8	15	19
low density lipoprotein-related protein 2	<i>Lrp2</i>	1367952_at	NM_030827.1	9	11	19	15
Reprimierte Gene							
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	1368766_at	NM_012864.2	-20	-37	-257	-54
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	1379448_at	NM_001108172.1	-16	-10	-33	-61
ribonucleotide reductase M2	<i>Rrm2</i>	1389408_at; 1393848_at	NM_001025740.1	-9	-12	-19	-25
prion protein 2 (doublet)	<i>Prnd</i>	1384924_at	NM_001102431.1	-13	-7	-32	-12
cyclin A2	<i>Ccna2</i>	1379582_a_at	NM_053702.3	-13	-11	-18	-15
cytoskeleton associated protein 2	<i>Ckap2</i>	1384068_at	XM_224970.4	-22	-9	-18	-8
topoisomerase (DNA) II alpha	<i>Top2a</i>	1372186_a_at; 1388650_at	NM_022183.2	-10	-8	-15	-18
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	1374775_at	XM_225460.4	-11	-9	-14	-16
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	<i>Cdkn3</i>	1372685_at	NM_001106028.1	-7	-6	-20	-12
tenascin N	<i>Tnn</i>	1379331_at	NM_001107189.1	-14	-9	-13	-12
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	1383926_at	XM_342494.3	-12	-11	-11	-13
wingsless-type MMTV integration site family, member 7A	<i>Wnt7a</i>	1380958_at	XM_342723.3; XM_001062984.1	-6	-9	-11	-11
ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	<i>Ube2t</i>	1390481_a_at	NM_001108344.2	-10	-5	-5	-12
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	<i>Rarrs1</i>	1382274_at	NM_001014790.1	-7	-8	-10	-8
maternal embryonic leucine zipper kinase	<i>Meik</i>	1389756_at	NM_001108662.1	-10	-5	-9	-8
E2F transcription factor 8	<i>E2f8</i>	1377410_at	XM_218601.4	-10	-8	-8	-7
polo-like kinase 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>Plk1</i>	1370297_at	NM_0011700.1	-7	-7	-10	-9
solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	<i>Slc16a3</i>	1368965_at	NM_030834.1	-6	-6	-9	-9
DEP domain containing 1	<i>Depdc1</i>	1376914_at	XM_227798.4	-5	-7	-9	-8
transcription factor AP-2, gamma	<i>Tcfap2c</i>	1383937_at	NM_201420.2	-5	-13	-7	-5
stimulated by retinoic acid gene 6	<i>Stra6</i>	1390525_a_at; 1376962_at	NM_001029924.1	-10	-12	-3	-3
tumor-associated calcium signal transducer 2	<i>Tacs2d</i>	1391509_at	NM_001009540.2	-7	-8	-6	-7
protein regulator of cytokinesis 1	<i>Prc1</i>	1392899_at	NM_001107529.1	-6	-5	-9	-7
kinesin family member 2C	<i>Kif2c</i>	1369380_at	NM_134472.3; NM_001085369.1	-5	-7	-6	-7
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	<i>Cxcl14</i>	1388485_at	NM_001013137.2	-4	-7	-5	-6

Dargestellt sind die infolge der Applikation der pharmakologisch wirksamen Dosis von PRL, R5020, MPA und P4 gemeinsam je 25 stärksten induzierten sowie reprimierten Gene (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$). Wurden mehrere Probe Sets eines Gens detektiert, ist der jeweils größere FC aufgeführt.

Tabelle 8 – Übersicht über die 22 Gene des Gensets 2.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change							
				Gesamt	PRL	R5020	MPA	P4			
Induzierte Gene											
<i>solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3</i>	<i>Slc17a3</i>	1390591_at	NM_153622.2	142	135	134	156	144			
<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10</i>	<i>Slc4a10</i>	1373326_at	NM_178092.2	85	76	62	120	91			
<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B</i>	<i>Abcb1b</i>	1370583_s_at	NM_012623.2	42	23	43	56	49			
<i>solute carrier organic anion transporter family, member 4a1</i>	<i>Sco4a1</i>	1369437_at; 1389067_at	NM_133608.2	16	11	22	18	15			
<i>glutamate decarboxylase 1</i>	<i>Gad1</i>	1370760_a_at	NM_017007.1	13	12	9	13	18			
<i>proteoglycan D2 synthase 2, hematopoietic</i>	<i>Ptgs2</i>	1368492_at	NM_031644.2	13	14	10	12	16			
<i>phenazine biosynthesis-like protein domain containing</i>	<i>Pbid</i>	1390993_at	NM_138530.2	12	11	7	13	18			
<i>homogentisate 1,2-dioxygenase</i>	<i>Hgd</i>	1398514_at	NM_001012145.1	11	10	9	13	12			
<i>deoxyribonuclease 1-like 3</i>	<i>Dnase13</i>	1368294_at	NM_053907.1	10	11	6	11	15			
<i>D-amino-acid oxidase</i>	<i>Dao</i>	1369491_at	NM_053626.1	10	n.d.	6	20	13			
<i>aquaporin 5</i>	<i>Aqp5</i>	1368469_at	NM_012779.1	10	8	9	12	12			
Reprimierte Gene											
<i>lipase, gastric</i>	<i>Lipf</i>	1387245_at	NM_017341.1	-21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<i>ficollin B</i>	<i>Fcnb</i>	1387378_at	NM_053634.1	-16	-16	n.d.	-25	-24			
<i>solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11</i>	<i>Slc5a11</i>	1381922_at	NM_001100482.1	-13	-12	-11	-19	-10			
<i>cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M</i>	<i>Cdc2</i>	1367776_at	NM_019296.1	-10	-6	-9	-12	-12			
<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog</i>	<i>Cfr</i>	1384960_at	NM_031506.1; XM_001062374.1	-10	n.d.	-12	-11	-13			
<i>SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>	<i>Spc25</i>	1389668_at	NM_001009654.1	-7	-9	-5	-8	-8			
<i>calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha</i>	<i>Calca</i>	1369116_a_at	NM_017338.2	-7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<i>cyclin B2</i>	<i>Ccnb2</i>	1389566_at	NM_001009470.1	-7	-6	-5	-8	-7			
<i>GLI-Kruppel family member GLI1</i>	<i>Gli1</i>	1376720_at	XM_346832.3	-7	n.d.	n.d.	-12	-10			
<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>	<i>Wnt4</i>	1368641_at	NM_053402.1	-6	n.d.	-7	-9	-7			
<i>aurora kinase B</i>	<i>Aurkb</i>	1368260_at	NM_053749.1	-6	-6	-4	-7	-6			

Dargestellt sind je elf der am stärksten induzierten und reprimierten Gene nach gemeinsamer Testung der pharmakologisch wirksamen Dosis von PRL, R5020, MPA und P4 gegen die Vehikelkontrollen, die nicht Bestandteil des Gensets 1 waren (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$). Wurden mehrere Probe Sets eines Gens detektiert, ist der jeweils größere FC aufgeführt. n.d. = nicht detektiert.

Weitere 19 Markergene zur Charakterisierung des pharmakologischen Effekts von Gestagenen am Uterus wurden internen Daten von Humanstudien entnommen (Biomarker Report A25327 (57)). Hierbei wurden weiblichen prämenopausalen Probanden täglich 30 µg LNG oder das entsprechende Placebo verabreicht. Außerdem blieb eine Gruppe gänzlich unbehandelt, um den natürlichen Menstruationszyklus untersuchen zu können. Zum Zeitpunkt der Implantation wurden Endometrium-Biopsien entnommen und die Genexpression mit Affymetrix GeneChip® HG-U133Plus 2.0 Microarrays analysiert. Zum einen wurden anschließend mittels eines definierten Algorithmus anhand des Vergleiches zwischen den Proben der Placebo- und LNG-behandelten Probanden 45 Markergene zur Charakterisierung gestagener Effekte am humanen Endometrium ermittelt und biologisch plausibilisiert. Zum Anderen wurden 13 Gene identifiziert, die im natürlichen Zyklus durch P4 reguliert waren. Zu diesen wurden die orthologen Rattengene ermittelt (Gen-Mapping) sowie deren Vorhandensein auf den verwendeten Affymetrix Rat Genome 230A 2.0 GeneChip® Microarrays und eindeutige biologische Charakterisierung überprüft. Die resultierenden zwölf Gene dieses so genannten „LNG Classifiers“ wurden als Genset 3 festgelegt und sind in Tabelle 9 aufgeführt. Von den resultierenden acht der natürlich regulierten Gene war eines bereits Bestandteil des Gensets 1, *chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (Cxcl14)*, aufgrund dessen nur die übrigen sieben als Genset 4 zusammengefasst wurden. Diese sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Datenanalyse zeigte, dass alle 19 Markergene humanen Ursprungs auch unter den durch alle vier Gestagene deregulierten Genen der Ratte vertreten waren, nicht jedoch alle ein signifikantes Detektionssignal lieferten. Dies war lediglich bei den Genen *cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane) (Cyb5b)* und *serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (Sgk1)* aus Genset 3 sowie *claudin 4 (Cldn4)* aus Genset 4 der Fall, deren Regulierungsrichtung auch in allen vier Behandlungsgruppen identisch war.

Zur Charakterisierung des pharmakologischen Effekts von Gestagenen am Uterus wurde letztlich ein Set von insgesamt 91 Markergenen zusammengestellt. Dieses bestand aus 72 Genen, die anhand der erhobenen Daten an der Ratte identifiziert wurden, zusammen mit weiteren 19 Genen aus den oben genannten Humanstudien.

Tabelle 9 – Übersicht über die zwölf Gene des Gensets 3.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change		P4
				PRL	R5020	
tetraspanin 3	Tspan3	Rn01421801_m1	NM_001005547.1	-1	1	1
annexin A2	Anxa2	Rn01530533_g1	NM_019905.1	-2	1	-2
potassium channel, subfamily K, member 1	Kcna2	Rn00572452_m1	NM_021688.3	1	1	2
CDW92 antigen	Kcna1	Rn005685181_m1	NM_053492.2;NM_001033852.1	1	-1	-1
dyein light chain Tctex-type 3	Dwt92	Rn01756152_m1	NM_001013228.1	1	1	1
dynein light chain Tctex-type 3	Dynl3	Rn01478001_m1	NM_001008510.1	-3	-3	-3
interferon stimulated exonuclease 20	Isg20	Rn00572211_m1	NM_021657.1	1	-1	1
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	Phpp	Rn00566139_m1	NM_013191.1	1	2	1
S100 calcium binding protein B	S100b	Rn00592414_m1	NM_133611.1	-1	1	1
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	Slc2a13	Rn00577982_m1	NM_030586.2	-2	-2	-2
cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	Cy5b5	Rn00570285_m1	NM_019232.2	3	3	2
serum/glucocorticoid regulated kinase 1	Sgk1	Rn00586409_m1	NM_053648.2	-1	2	2
beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	Bcmo1					

Dargestellt sind die auf den verwendeten Affymetrix Rat Genome 230A 2.0 GeneChip® Microarrays orthologen und biologisch charakterisierten Rattengene zu den humanen LNG-Classifizier-Genen. Der jeweilige FC wurde ungeachtet der Kriterien hinsichtlich statistischer Signifikanz ermittelt.

Tabelle 10 – Übersicht über die sieben Gene des Gensets 4.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change		P4
				PRL	R5020	
complement component 4 binding protein, alpha	C4bpa	Rn00560896_m1	NM_012516.2	2	2	4
solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	Slc1a1	Rn00564705_m1	NM_013032.3	1	-1	1
Cd65 molecule	Cd65	Rn00709472_m1	NM_022289.2	-2	-4	-3
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	Rn00577779_m1	NM_024391.1	2	1	2
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	Rn00580999_m1	NM_031598.3	-1	4	6
secreted frizzled-related protein 4	Sfrp4	Rn00585549_m1	NM_053644.1	2	4	2
claudin 4	Cldn4	Rn01196224_s1	NM_001012022.1	-2	-2	-2

Dargestellt sind die auf den verwendeten Affymetrix Rat Genome 230A 2.0 GeneChip® Microarrays orthologen und biologisch charakterisierten Rattengene zu den humanen P4-regulierten Genen. Der jeweilige FC wurde ungeachtet der Kriterien hinsichtlich statistischer Signifikanz ermittelt.

5.1.1.2.3 Festlegung eines Markergensets

Die Festlegung eines Markergensets zur Charakterisierung der pharmakologischen Gestageneffekte am Rattenuterus erfolgte mittels qRT-PCR im TLDA-Format.

In einem ersten Schritt wurden dazu die Expressionslevel aller 91 Gene des Sets anhand von zwölf Uterus-Proben der In-vivo-Experimente mittels TLDAs analysiert und mit den entsprechenden Microarray-Daten verglichen. So wurden eventuelle Fehlhybridisierungen auf den Affymetrix GeneChips[®] identifiziert und die entsprechenden Gene verifiziert.

In einem zweiten Schritt wurden die Expressionslevel dieser verifizierten Gene in zwölf Uterus-Proben des In-vivo-Experiments nach Behandlung mit einem weiteren Gestagen, LNG, mittels TLDAs analysiert. Durch den Vergleich dieser mit den im ersten Schritt erhaltenen TLDA-Daten konnten die für den pharmakologischen Gestageneffekt am Rattenuterus charakteristischen Markergene als solche bestätigt werden.

5.1.1.2.3.1 Verifizierung der Markergene

Die Verifizierung der mittels Microarray-Daten identifizierten Markergene erfolgte anhand von jeweils drei Uterus-Proben der In-vivo-Experimente nach 28-tägiger Behandlung mit der pharmakologisch wirksamen Dosis von R5020, MPA bzw. P4 sowie der Vehikelkontrollen.

Von den identifizierten 91 Markergenen erfüllten die sechs Gene *Fga*, *Kcnj1*, *Slc5a11*, *Syt6*, *Tnn* und *Wnt7a* nicht bei allen Proben die festgelegten Akzeptanzkriterien und wurden daher in der nachfolgenden Auswertung nicht berücksichtigt. Außerdem wurden die fünf Gene *Cdw92*, *Dynlt3*, *Phlpp*, *Slc1a1* und *Hsd17b2* vom anschließenden Vergleich der Genexpressionssignale ausgeschlossen, da diese in den zu Grunde liegenden In-vivo-Experimenten nicht in allen Behandlungsgruppen in die gleiche Richtung dereguliert wurden. Von den übrigen 80 Genen wurde die relative Expression ermittelt und anschließend mit dem entsprechenden FC des gleichen Probenmaterials verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Richtung der Deregulierung bei zwei Genen nicht in allen Behandlungsgruppen zwischen beiden Analysemethoden zur Genexpression übereinstimmte. Diese Gene waren *Cyb5b* und *Slc2a13*. Daher wurden auch sie von der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen.

Hinsichtlich der ermittelten Signalstärken zeigten sich für einzelne der so verifizierten 78 Markergene teilweise deutliche Unterschiede zwischen den beiden Analysemethoden. So wurden für gleiche Markergene im gleichen Probenmaterial überwiegend mittels TLDAs deutlich höhere Signale ermittelt. Dies war um so ausgeprägter, je stärker die einzelnen Gene dereguliert wurden (Tabelle 24, 8.16).

5.1.1.2.3.2 Bestätigung der Markergene

Zur Bestätigung der mittels GeneChips[®] (Affymetrix) identifizierten und TLDAs verifizierten Markergene wurden deren relative Expressionslevel schließlich in jeweils sechs Uterus-Proben des In-vivo-Experiments nach 28-tägiger Behandlung mit LNG sowie der Vehikelkontrollen analysiert.

Von den verbliebenen 78 Markergenen erfüllten die folgenden acht nicht die festgelegten Akzeptanzkriterien: *C4bpa*, *Cyp2f4*, *Defb1*, *Guca2a*, *Guca2b*, *Hsd11b1*, *Lipf* und *Slc17a3*. In der nachfolgenden Auswertung wurden diese daher nicht berücksichtigt.

Von den übrigen 70 Genen wurde die relative Expression ermittelt und anschließend mit der relativen Induktion im Probenmaterial zur Verifizierung der Markergene verglichen. Hierbei

zeigte sich, dass die Richtung der Deregulierung durch LNG bei zwei Genen entgegengesetzt zu der der übrigen Gestagene war. Diese Gene waren *Tspan3* und *Anxa2*, die daher ebenfalls von der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen wurden.

Hinsichtlich der ermittelten Signalstärken zeigten sich für die übrigen der so bestätigten 68 Markergene teilweise deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gestagenen. *Cftr* beispielsweise wurde durch LNG lediglich einfach, durch MPA hingegen 132-fach reprimiert (Tabelle 25, 8.16).

5.1.2 In-vitro-Experimente

Anhand von In-vivo-Experimenten an Ratten und bekannten Humangenen wurden 91 Markergene identifiziert, die den pharmakologischen Effekt von verschiedenen Gestagenen am Uterus charakterisieren. Von diesen konnten 68 Gene verifiziert und als Markergenset festgelegt werden. Deren Anwendbarkeit sollte schließlich im Rahmen eines In-vitro-Screening-Systems mit ELT 3-Zellen, uterinen Leiomyomzellen der Ratte, zur frühen Prädiktion der pharmakologischen Wirkungen von Gestagenen am Rattenuterus überprüft werden.

In einem ersten Schritt wurden hierfür zunächst ELT 3-Zellen kultiviert und hinsichtlich deren für die Genexpression relevanten basalen Expression des PR charakterisiert. Für Substanztestungen wurden schließlich das Wachstumsverhalten der Zellen und zytotoxische Effekte im getesteten Konzentrationsbereich untersucht.

In einem nächsten Schritt sollte die gestagenabhängige Genexpression der festgelegten Markergene in diesen Zellen mittels TLDA analysiert werden. Hierfür wurde die etablierte Zelllinie über drei unterschiedliche Zeiträume mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der vier Gestagene PRL, R5020, MPA bzw. P4 behandelt. Deren Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie vergleichbar zu den jeweiligen Dosierungen der entsprechenden In-vivo-Experimente waren. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Markergene wurde letztlich deren ermittelte relative Expression im ELT 3-Probenmaterial mit deren Genexpression in den Uterus-Proben der Ratten verglichen, anhand derer die Markergene ursprünglich identifiziert wurden.

5.1.2.1 Charakterisierung von ELT 3-Zellen

5.1.2.1.1 Zellkultivierung

Die ELT 3-Zelllinie ist eine von fünf aus uterinen Leiomyomen der Eker-Ratte (33) etablierten stabilen Zelllinien myometrialen Ursprungs, die aus einer epitheloiden Variante von Leiomyomen stammt. Die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Eigenschaften dieser Zellen bestätigten sich in der eigenen Zellkultur. So zeigten sie nicht nur das für glatte Muskelzellen typische Erscheinungsbild von langer spindelförmiger Gestalt und paralleler Anordnung, sondern auch das Wachstum in Clustern und deren typische sternförmige bis polygonale Gestalt. Auch die undeutliche Zytoplasmamembran, die großen runden bis ovalen Zellkerne mit feinem retikulärem Nukleoplasma und die stark ausgeprägte extrazelluläre Matrix der ELT 3-Zellen (34) wurden deutlich (Abbildung 14).



Abbildung 14 – Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der typischen Zellmorphologie von ELT 3-Zellen in Kultur (Passage 41). Die spindelförmigen Zellen sind sternförmig bis polygonal und wachsen parallel in Clustern. Die großen Zellkerne sind rund bis oval geformt (Pfeile). Das Nukleoplasma ist retikulär und die Zytoplasmamembran der ELT 3-Zellen nur undeutlich zu erkennen (geschweifte Klammer).

Aus den Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zytotoxischen Effekten der vier Testsubstanzen an ELT 3-Zellen wurden die optimalen Kultivierungsbedingungen für die nachfolgenden In-vitro-Experimente zur Genexpressionsanalyse an ELT 3-Zellen abgeleitet. Diesem zufolge erwiesen sich eine initiale Zellzahl von 5×10^4 Zellen/mL Medium und die Substanzinkubation über 6, 12 und 24 h als geeignet (Abbildung 30, 8.7). Zytotoxische Substanzeffekte konnten im getesteten Konzentrationsbereich ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 31, 8.8).

5.1.2.1.2 Expression des PR

Da Progestine ihre gestagene Wirkung hauptsächlich über die Signalgenerierung durch den PR entfalten (28), war dessen basale Expression in den verwendeten ELT 3-Zellen Voraussetzung für die Genexpressionsanalysen der identifizierten gestagenspezifischen Markergene. Mittels immunologischen Proteinnachweises wurden daher fünf verschiedene, unbehandelte ELT 3-Zellpopulationen zum Zeitpunkt der Substanztestungen (Passage 43) auf dessen Vorhandensein hin untersucht.

Die ermittelten Gesamtproteingehalte der fünf Zellpopulationen lagen zwischen 7 und 50 μg . Das Ergebnis des Immunoblots ist in Abbildung 15 dargestellt und bestätigte die basale Expression der beiden PR-Isoformen PR-A (94 kDa) und PR-B (114 kDa) in den

ELT 3-Zellen zum Zeitpunkt der Substanztestungen. Damit erwiesen sich die verwendeten uterinen Leiomyomzellen für den Einsatz als frühes In-vitro-Screeningsystem zur Charakterisierung der pharmakologischen Wirkungen von Gestagenen als geeignet.

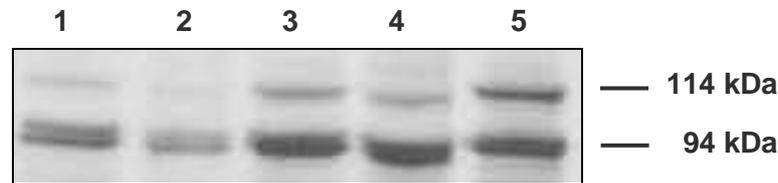


Abbildung 15 – Immunoblot zum Nachweis der basalen Expression des PR in kultivierten ELT 3-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf verschiedenen, unbehandelten ELT 3-Zellpopulationen (Passage 43) aufsteigenden Gesamtproteingehalts, die zum jeweiligen Zeitpunkt der Substanztestungen untersucht wurden. Deutlich zu erkennen sind die Banden der beiden Isoformen des PR, PR-A (94 kDa) und PR-B (114 kDa). Bahnen 1, 4 und 5: ELT 3-Zellen der ersten In-vitro-Substanztestung (7, 48 bzw. 50 µg Gesamtproteingehalt); Bahnen 2 und 3: ELT 3-Zellen der zweiten In-vitro-Substanztestung (14 bzw. 15 µg Gesamtproteingehalt)

5.1.2.2 Genexpressionsanalyse an ELT 3-Zellen

Um die Anwendbarkeit der festgelegten Markergene im Rahmen eines frühen In-vitro-Screening-Systems zu überprüfen, wurde deren Genexpression in ELT 3-Zellen mittels TLDA analysiert. Hierfür wurden initial 5×10^4 Zellen/mL Medium ausgesät und 48 h nach Zellaussaat für 6, 12 und 24 h mit der jeweiligen Testsubstanzen behandelt. Dabei wurde jedes der vier Gestagene PRL, R5020, MPA und P4 in einer niedrigeren und einer höheren Konzentration appliziert.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten gewährleisten zu können, wurden in zwei identischen Versuchsansätzen jeweils drei biologische Replikate angefertigt, von denen letztere für die Genexpressionsanalyse mittels TLDA gepoolt wurden.

5.1.2.2.1 Untersuchung der Markergene in ELT 3-Zellen

Von den 68 festgelegten Markergenen zur Charakterisierung der pharmakologischen Wirkungen der vier Testsubstanzen am Rattenuterus erfüllten die folgenden 27 Gene im gepoolten Probenmaterial mindestens einer Substanzkonzentration oder eines Inkubationszeitpunktes nicht die festgelegten Akzeptanzkriterien: *Aldob*, *Aqp5*, *Aqp8*, *Calb1*, *Calca*, *Car4*, *Ccl20*, *Cd69*, *Cftr*, *Cldn4*, *Cxcl14*, *Cyp26a1*, *Fcnb*, *Gad1*, *Igfbp1*, *Kcnk1*, *Mmp7*, *Napsa*, *Opcml*, *Oxt*, *Prnd*, *Ptgds2*, *Rarres1*, *Slc10a1*, *Slc4a10*, *Slco4a1* und *Tacstd2*. In der nachfolgenden Auswertung wurden diese daher nicht berücksichtigt. Außerdem wurden die Gene *Bcmo1* und *Pla2g2a* sowie *Dao*, *Gli1* und *Wnt4* vom Vergleich mit den In-vitro-Experimenten ausgeschlossen, da diese in den In-vivo-Experimenten nicht in allen Behandlungsgruppen in die gleiche Richtung dereguliert bzw. nicht in allen Behandlungsgruppen detektiert wurden.

Von den übrigen 36 Markergenen wurde die relative Expression im ELT 3-Probenmaterial ermittelt und anschließend mit den FCs der GeneChip-Daten des In-vivo-Probenmaterials der Ratten verglichen, anhand derer die Markergene ursprünglich identifiziert wurden (Tabellen 26 A-C, 8.16). Eine zusammenfassende Übersicht übereinstimmend deregulierter Markergene in den ELT 3-Zellen im Vergleich aller Gestagene sowie in Abhängigkeit der jeweiligen Inkubationsdauer und Konzentration bietet Tabelle 11.

Tabelle 11 – Markergene, die in den ELT 3-Zellen durch alle vier Gestagene in Abhängigkeit der jeweiligen Inkubationsdauer und Konzentration übereinstimmend zu den entsprechenden In-vivo-Experimenten dereguliert wurden.

<i>Inkubationsdauer</i>	<i>Gestagenkonzentration</i>		
	<i>Niedrig und Hoch</i>	<i>Niedrig</i>	<i>Hoch</i>
6 Stunden	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>S100b</i> <i>Sfrp4</i>	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>Abcb1b</i> <i>Cdc2</i> <i>S100b</i> <i>Sfrp4</i>	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>Aurkb</i> <i>Bub1b</i> <i>Lrp2</i> <i>Pbld</i> <i>S100b</i> <i>Sfrp4</i> <i>Ube2t</i>
12 Stunden	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>Ccna2</i> <i>Ccnb2</i> <i>Cdc2</i> <i>Cdkn3</i> <i>Hgd</i> <i>Slc16a3</i>	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>Ccna2</i> <i>Ccnb2</i> <i>Cdc2</i> <i>Cdkn3</i> <i>Hgd</i> <i>Slc16a3</i>	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>Ccna2</i> <i>Ccnb2</i> <i>Cdc2</i> <i>Cdkn3</i> <i>Ckap2</i> <i>Hgd</i> <i>Kif2c</i> <i>Plk1</i> <i>Slc16a3</i> <i>Ttk</i>
24 Stunden	<i>Sgk1</i> <i>Hgd</i>	<i>Sgk1</i> <i>Hgd</i> <i>Lrp2</i>	<i>Sgk1</i> <i>Spp1</i> <i>Dnase1l3</i> <i>Bub1b</i> <i>Ccnb2</i> <i>Cd55</i> <i>Cdc2</i> <i>Hgd</i> <i>Kif2c</i> <i>Plk1</i> <i>Top2a</i> <i>Ttk</i>

Hinsichtlich der unterschiedlichen Inkubationsdauer erwies sich die zwölfstündige Inkubation im Vergleich beider Gestagenkonzentrationen als am besten geeignet. Zwar war das Ausmaß der Deregulierung über alle drei Zeitpunkte überwiegend übereinstimmend. Die Anzahl der Markergene hingegen, die in vitro analog zum In-vivo-Probenmaterial dereguliert wurde, war nach 12 h mit neun Genen deutlich größer als nach sechs oder 24 h mit fünf bzw. zwei Genen. Lediglich ein einziges Markergen, *Sgk1*, wurde dabei in den ELT 3-Zellen nach sechs-, zwölf- und 24-stündiger Inkubation mit beiden Konzentrationen aller vier Gestagene übereinstimmend zu den In-vivo-Testsystemen dereguliert. Außerdem zeigte sich, dass die anhand der TLDA's ermittelten Signalstärken der einzelnen Markergene überwiegend deutlich geringer als die analogen FCs waren.

Hinsichtlich der unterschiedlichen Gestagenkonzentrationen erwiesen sich beide als geeignet, um zu einer Deregulierung von Markergenen in ELT 3-Zellen zu führen. Die Anzahl der Gene, die in den ELT 3-Zellen der jeweils höhere Konzentration übereinstimmend zu den In-vivo-Experimenten dereguliert wurden, war jedoch im Vergleich aller Gestagene für jede

Inkubationsdauer deutlich höher. Dabei war sie auch hier mit neun in den ELT 3-Zellen der niedrigeren und 13 in der höheren Konzentration jeweils nach zwölfstündiger Inkubation am größten. Neben *Sgk1* fielen insbesondere auch die Gene *Spp1* und *Dnase1/3* auf, da diese in den ELT 3-Zellen bei der jeweils höheren Gestagenkonzentration über jede Inkubationsdauer analog zu den In-vivo-Experimenten dereguliert wurden.

5.2 Gestageneffekte an der Mamma der Ratte

Neben dem Uterus ist die Mamma Zielorgan von Gestagenen. Um die Effekte dieser Substanzklasse besser charakterisieren zu können, wurde neben der Histologie auch die gestagenbedingte differenzielle Genexpression in der Mamma untersucht. Dazu wurde zunächst die Eignung zweier unterschiedlicher Methoden in Vorbereitung der Genexpressionsanalysen zur Untersuchung umfassender gestagenbedingter Genexpressionsprofile verglichen und bewertet. Zu Grunde gelegt wurden die Daten von Drüsenepithelien als Zielzellen gestagener Effekte, die mittels LCM isoliert wurden. Gegenübergestellt wurden diesen die Daten aus dem Gesamtgewebe der Mamma, das neben Drüsenzellen auch sämtliche weitere Zellpopulation des Organs beinhaltet. Anschließend wurden die Genexpressionsprofile der Gesamtgewebe herangezogen, um den Effekt von Gestagenen insbesondere in der pharmakologisch wirksamen Dosis zu beschreiben. Dazu wurden Gene identifiziert, die die gemeinsame Gestagenwirkung an der Mamma in dieser Dosis charakterisieren. Außerdem sollten spezifische Substanzeffekte identifiziert und näher charakterisiert werden.

5.2.1 Etablierung der Laser Capture Microdissection (LCM)

Zur Gewinnung ausgewählter Zellpopulationen der Rattenmamma für nachfolgende Genexpressionsanalysen wurde die Methodik der LCM etabliert. Anschließend wurde das Transkriptionsprofil der so isolierten Drüsenepithelien dieser LCM-Proben mit dem der Gesamtgewebe der Mamma verglichen und der Einfluss verschiedener Aufarbeitungsschritte auf das Genexpressionsprofil des Probenmaterials untersucht.

Zur Methodenetablierung herangezogen wurden dabei die jeweils gleichen Mammae der Ratten, die für 28 Tage mit der jeweiligen 10-fachen ED_{50} der Schwangerschaftserhaltungsdosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 behandelt wurden sowie die der entsprechenden Vehikelkontrollen. Für die Aufarbeitung mittels LCM wurde dabei der bei Sektion in Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium eingefrorene Teil der rechten thoracalen Mammae verwendet, für die Aufarbeitung der Gesamtgewebe der in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Teil der gleichen Mammae.

5.2.1.1 Optimierung der Probenaufarbeitung

Zur Optimierung der Probenaufarbeitung wurden zunächst bei verschiedenen Kammer- und Objektträgertischtemperaturen Gefrierschnitte unterschiedlicher Schnittdicken von den in Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium eingefrorenen Mammae angefertigt. Aufgrund der inhomogenen Konsistenz der unterschiedlichen Zellpopulationen des Organs, dem weicheren Fett- und Drüsengewebe und dem härteren Binde- und Muskelgewebe, erwies sich eine Schnittdicke von 10 μm bei einer Kammer- und Objektträgertischtemperatur von

-27°C als geeignet, um Gefrierschnitte der Mamma von angemessener Qualität anfertigen zu können. Außerdem zeigte sich, dass die visuell definierten Zielzellen des Drüsenepithels bei dieser Schnittdicke vollständig aus dem umliegenden Gewebeverband herausgehoben werden konnten. Die ursprüngliche Morphologie des transferierten Gewebes wie auch des umliegenden Gewebeverbandes blieb dabei erhalten (Abbildung 16).

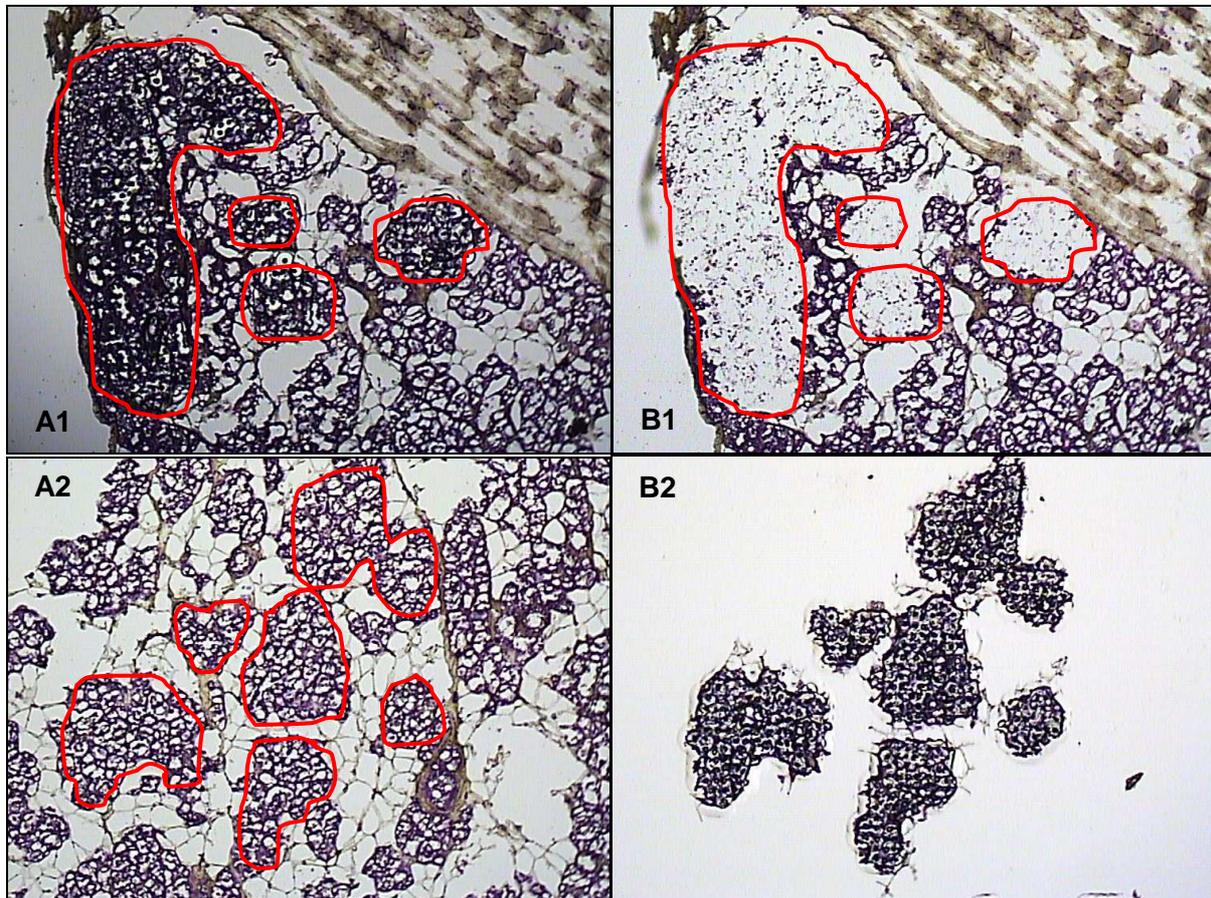


Abbildung 16 – Ausschnitte angefärbter und entwässerter Gewebeschnitte der Mamma einer weiblichen Ratte der In-vivo-Experimente. A1 und A2: Ansicht des Gewebes vor der Mikrodissektion. Markiert sind die mikroskopisch identifizierten und selektierten Zielzellen. B1: Ansicht des Gewebes nach erfolgreicher Mikrodissektion. Die selektierten Zielzellen wurden aus dem umliegenden Gewebeverband herausgehoben. B2: Ansicht eines Ausschnitts des Transferfilms des verwendeten Caps nach erfolgreicher Mikrodissektion. Zu erkennen sind die erfolgreich aus dem Gewebeverband herausgehobenen Zielzellen, die zuvor markiert wurden.

Um ausreichend RNA für Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChips® zu erhalten, wurden je nach Menge des vorliegenden Drüsengewebes zwischen 0,5 und 2,0 mm² pro Probe gesammelt. Dieses Areal lieferte durchschnittlich 4 µg/mL RNA, was einem absoluten RNA-Gehalt von durchschnittlich 40 ng entsprach und erwies sich als ausreichend, um nach linearer Amplifizierung die für die Hybridisierung auf Affymetrix GeneChips® erforderlichen 10 µg aRNA pro Probe zu erhalten.

Hinsichtlich der Anfärbung der Zielstrukturen wurde deutlich, dass Cresyl Violet hierfür sehr gut geeignet war. Sowohl die Morphologie des Gewebes als auch die Integrität der RNA (RIN) war nach Anfärbung des gleichen Gewebes mit Cresyl Violet wesentlich hochwertiger (RIN ≥ 6) als nach Anfärbung mit HistoGene Stain (RIN ≤ 5).

5.2.1.2 Vergleichende Genexpressionsanalyse

Zum Vergleich der Genexpressionsprofile der LCM-Proben und der Gesamtgewebe wurde die RNA des bei Sektion in Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium eingebetteten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren Teils der rechten thoracalen Mammae isoliert und auf Affymetrix GeneChips® hybridisiert. Zur Analyse herangezogen wurden die Daten der gleichen sechs Tiere pro Behandlungsgruppe sowie je drei Kontrolltiere nach s.c. bzw. i.g. Applikation des Vehikels. Aufgrund unzureichender Akzeptanzkriterien nach Aufarbeitung mittels LCM standen von den R5020-behandelten Tieren nur die Daten von je fünf Tieren zur Verfügung, weswegen zu Vergleichszwecken zur Auswertung der Gesamtgewebe ebenfalls nur die Daten der gleichen fünf Tiere herangezogen wurden. Die Genexpressionsanalyse lieferte für jede der insgesamt 29 Mamma-Proben pro Aufarbeitungsmethode rund 30.000 Daten zur Expression der auf den Microarrays befindlichen Transkripte.

5.2.1.2.1 Multivariate Analyse

In einem ersten Schritt sollte eine generelle Übersicht über die komplexen Datensätze erhalten und visualisiert werden. Dazu wurden die Daten beider Aufarbeitungsmethoden mittels Hierarchischem Clustering dargestellt und verglichen (Abbildung 17).

Im Gegensatz zu den LCM-Proben verdeutlichte die Datenanalyse der Gesamtgewebe eine klare und enge Separierung der einzelnen Behandlungsgruppen. So bildeten die Proben der Gesamtgewebe im Wesentlichen zwei Hauptcluster, bestehend aus den Proben der Vehikelkontrollen gegenüber sämtlichen gestagenbehandelten Proben, die alle einen gemeinsamen Ursprung im Dendrogramm aufwiesen. Des Weiteren waren jeweils die Proben der PRL-, MPA- sowie die der R5020- und P4-behandelten Tiere in einzelnen Subclustern organisiert. Im Gegensatz dazu zeigten die LCM-Proben bis auf fünf von insgesamt sechs Proben der PRL-behandelten Tiere keinerlei Separierung in Abhängigkeit von einer bestimmten Gestagenbehandlung. Vielmehr gingen nahezu alle aus einem gemeinsamen Ursprung hervor.

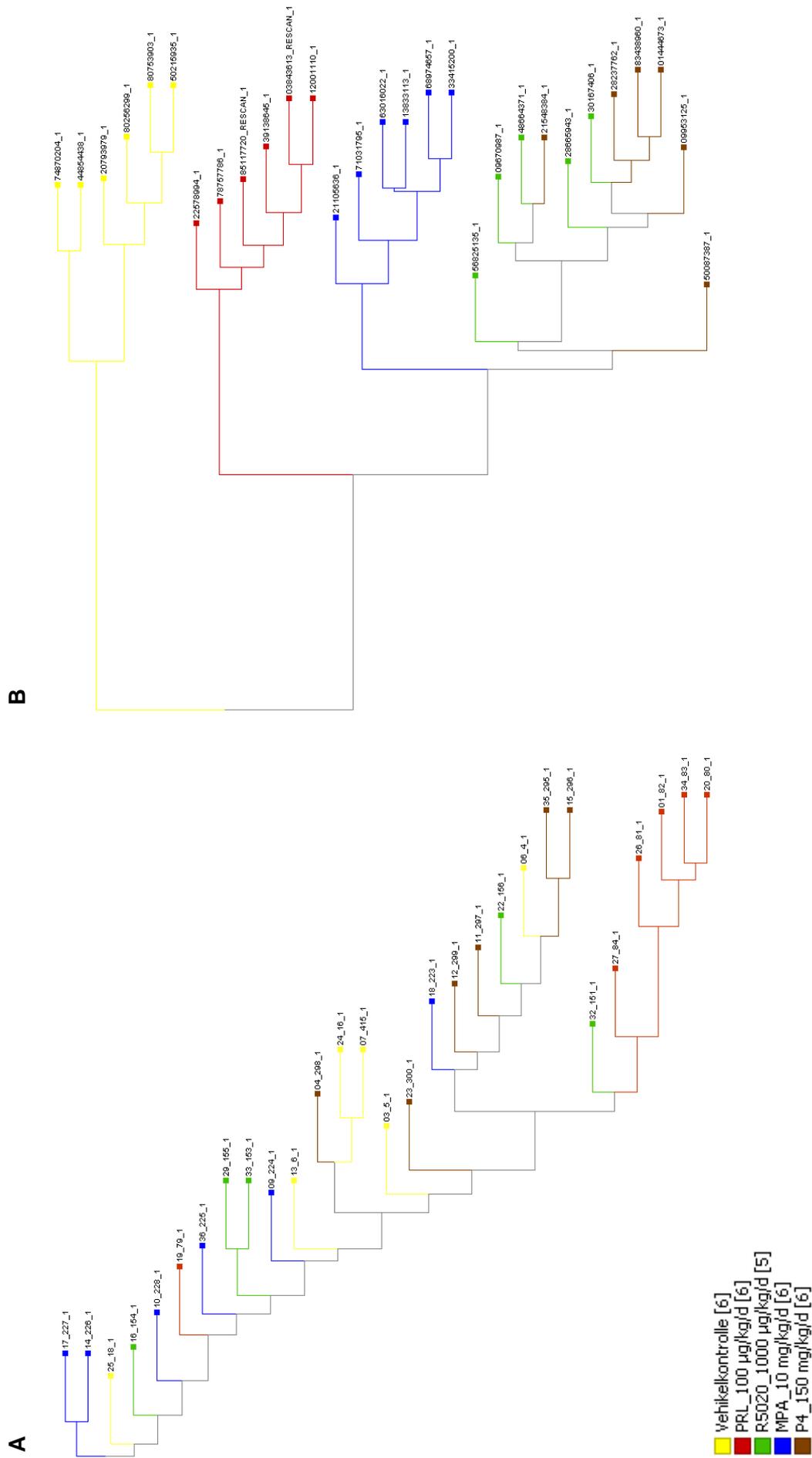


Abbildung 17 – Hierarchisches Clustering der Daten der LCM-Proben gegenüber den Gesamtgeweben der Mamma. Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Gestagenbehandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Proben mit großen Ähnlichkeiten zwischen den Genexpressionsprofilen sind eng in Form von Cluster gruppiert. A: LCM-Proben; B: Gesamtgewebe

5.2.1.2.2 Univariate Analyse

In einem zweiten Schritt sollte die Regulation der Genexpression innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen analysiert und letztlich zwischen beiden experimentellen Ansätzen verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Student's t-Tests durchgeführt ($p\text{-value} \leq 0,01$; $FC \geq 2$), um die innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen deregulierten Gene zu ermitteln.

Tabelle 12 veranschaulicht, dass in beiden Probenotypen eine bedeutende Anzahl an Genen infolge der jeweiligen Gestagenbehandlung als signifikant dereguliert detektiert wurde, diese jedoch innerhalb der LCM-Proben bis zu dreimal höher als in den entsprechenden Proben des Gesamtgewebes war (P4). Außerdem unterschieden sich die Daten in Abhängigkeit von der Aufarbeitungsmethode dahingehend, dass in den LCM-Proben bis zu zehnmal mehr reprimierte Gene als im Gesamtgewebe detektiert wurden (R5020). Letztlich wurden in den LCM-Proben bis zu zweimal mehr reprimierte als induzierte Gene detektiert (PRL), was sich für die Proben der Gesamtgewebe genau entgegengesetzt verhielt.

Tabelle 12 – Anzahl detektierter signifikant deregulierter Gene in den LCM-Proben gegenüber den Gesamtgeweben der Mamma.

Anzahl deregulierter Gene		LCM-Proben			Gesamtgewebe		
Testsubstanz	Dosis	Gesamt	Induziert ↑	Reprimiert ↓	Gesamt	Induziert ↑	Reprimiert ↓
PRL	100 µg/kg/d	1352	405	947	960	615	345
R5020	1000 µg/kg/d	597	204	393	233	192	41
MPA	10 mg/kg/d	787	439	348	806	612	194
P4	150 mg/kg/d	273	108	165	91	63	28

Dargestellt ist die jeweilige Anzahl insgesamt detektierter deregulierter Gene in den LCM-Proben und den Gesamtgeweben sowie die entsprechende Anzahl der davon induzierten und reprimierten Gene (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Zur näheren Charakterisierung der Unterschiede zwischen den Genexpressionsprofilen entsprechender Proben nach unterschiedlicher Aufarbeitung wurde die Anzahl der Gene ermittelt, die innerhalb beider Datensätze gemeinsam sowie ausschließlich innerhalb eines Probenotyps als dereguliert detektiert wurde (Tabelle 13). Hierbei wurde deutlich, dass eine vergleichsweise geringe Anzahl gemeinsam deregulierter Gene detektiert wurde, aber bis zu viermal mehr Gene lediglich in den LCM-Proben als dereguliert detektiert wurden (P4).

Tabelle 13 – Anzahl deregulierter Gene, die gemeinsam und ausschließlich in den LCM-Proben bzw. den Gesamtgeweben detektiert wurden.

Testsubstanz	Dosis	Anzahl deregulierter Gene		
		Gemeinsam	LCM-Proben	Gesamtgewebe
PRL	100 µg/kg/d	185	539	312
R5020	1000 µg/kg/d	39	285	99
MPA	10 mg/kg/d	136	297	293
P4	150 mg/kg/d	14	129	32

5.2.1.2.3 Detektion zielzellspezifischer Gene

Um die Zielzellspezifität der LCM-Proben und der Gesamtgewebe zu vergleichen, wurden auf Grundlage von Literaturquellen Markergene identifiziert, die für Drüsenepithelien spezifisch sind. Als repräsentative molekulare Marker epithelialer Differenzierung der Rattenmamma wurden dazu die Gene der Hauptmilchproteine *whay acidic protein (Wap)*, *alpha lactalbumin (Lalba)*, *casein alpha s1 (Csn1s1)* und *casein kappa (Csn3)* identifiziert

(58) und hinsichtlich ihrer Expressionslevel in den LCM-Proben und den Gesamtgeweben analysiert. Das Ergebnis der direkten Gegenüberstellung ist in Abbildung 18 dargestellt und verdeutlichte, dass zwar alle untersuchten spezifischen Markergene in beiden Probentypen gestagenbedingt erhöhte Expressionslevel zeigten, innerhalb der LCM-Proben jedoch bei allen ausgewählten zielzellspezifischen Genen deutlich höhere Level detektiert wurden, als innerhalb der Gesamtgewebe.

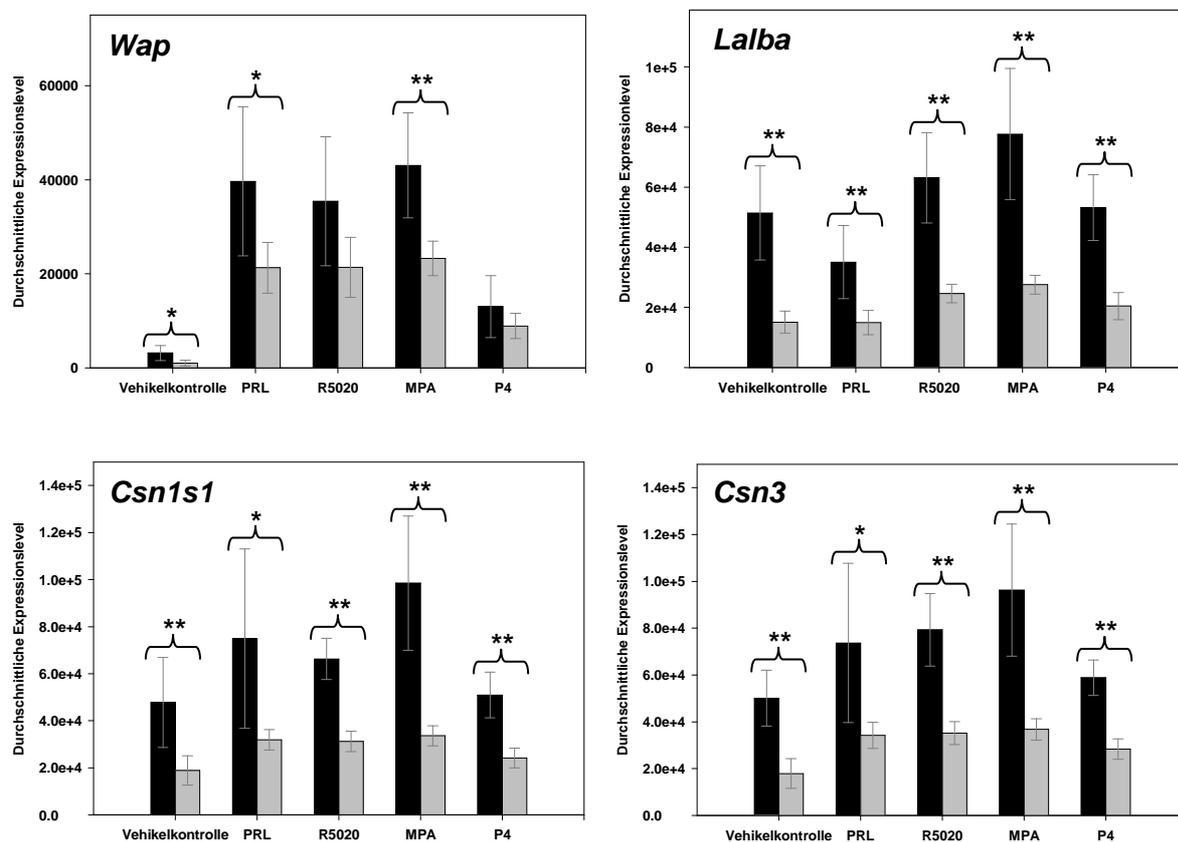


Abbildung 18 – Durchschnittliche Expressionslevel epithelialer Differenzierungsmarker der Mamma. Gegenüberegestellt sind die Daten entsprechender Mamma-Proben unterschiedlicher Aufarbeitung (schwarz: LCM-Proben; grau: Gesamtgewebe) nach 28-tägiger Behandlung mit der hohen Dosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 sowie der Vehikelkontrollen. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **). *Wap*: whey acidic protein; *Lalba*: alpha lactalbumin; *Csn1s1*: casein alpha s1; *Csn3*: casein kappa.

In diesem Zusammenhang wurden auch die durchschnittlichen Expressionslevel des epithelzellspezifischen Gens *crumbs homolog 3 (Crb3)* (59) innerhalb beider Probentypen verglichen. Wie sich zeigte, wies lediglich eines der insgesamt vier Probe Sets zur Detektion dieses zielzellspezifischen Gens in den LCM-Proben deutlich höhere Expressionslevel auf als im Gesamtgewebe. Da dies nicht den Erwartungen entsprach, wurde anschließend die Lage aller vier Probe Sets innerhalb der entsprechenden Gensequenz (NM_001025661.1), deren jeweilige Distanz zum 3'-Terminus des Gens sowie deren entsprechende durchschnittliche Expressionslevel ermittelt. Aus Abbildung 19 wird ersichtlich, dass das am weitesten entfernt lokalisierte Probe Set (1384531_at) bei einer Gesamtlänge von 266 bp 823 bp vom 3'-Terminus des entsprechenden Transkripts entfernt ist und in den LCM-Proben bei allen Gestagenen die geringsten durchschnittlichen Expressionslevel aufwies. Die

übrigen drei Probe Sets (1384397_x_at, 1383648_x_at und 1383647_a_at) hingegen umfassen eine Gesamtlänge von 727, 316 bzw. 247 bp und sind lediglich 46 bp vom 3'-Terminus des entsprechenden Transkripts entfernt. Außerdem stiegen deren detektierte Expressionslevel in den LCM-Proben mit abnehmender Gesamtlänge und Distanz zum 3'-Terminus des entsprechenden Transkripts zunehmend an. Im Gesamtgewebe hingegen blieben die detektierten Expressionslevel aller vier Probe Sets vergleichbar.

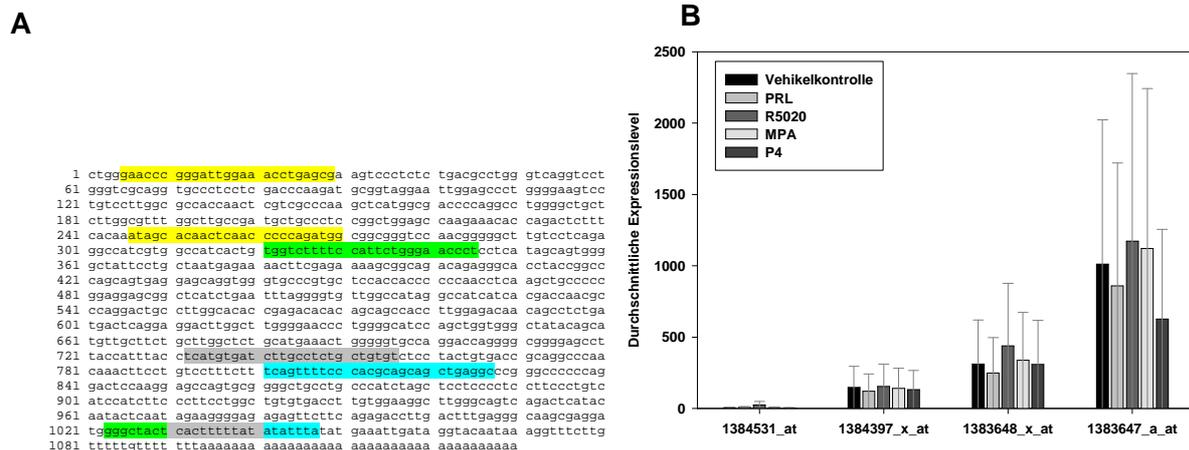


Abbildung 19 – *Crumbs homolog 3*. A: Dargestellt ist die gesamte NCBI Reference Sequence (NM_001025661.1) von *Crb3*. Markiert sind die jeweils 25 bp langen Oligonukleotide jeder ersten und letzten Sequenz jedes der insgesamt vier Probe Sets zur Detektion des Zielgens *Crb3* auf den Affymetrix GeneChips®. Deren Distanzen zum 3'-Terminus des Transkripts abzüglich des terminalen Poly-A-Schwanzes liegen zwischen 823 bp (gelb: 1384531_at) und 46 bp (grün: 1384397_x_at; grau: 1383648_x_at; blau: 1383647_a_at). B: Durchschnittliche Expressionslevel der vier Probe Sets zur Detektion von *Crb3* im LCM-Probenmaterial.

5.2.1.3 Einflussfaktoren auf das Genexpressionsprofil

Zur Bewertung welchen Einfluss einzelne Aufarbeitungsschritte auf das Genexpressionsprofil haben, wurden die Daten der P4-behandelten Tiere und der Vehikelkontrollen nach unterschiedlicher Aufarbeitung herangezogen. Um insbesondere den Einfluss des Amplifizierungsprozesses bewerten zu können, wurde zusätzlich zu den LCM-Proben und den entsprechenden Gesamtgeweben die aus diesen Mammae isolierte RNA auf die durchschnittliche Konzentration der LCM-Proben verdünnt, analog zu diesen linear amplifiziert und auf Affymetrix GeneChips® hybridisiert. Aufgrund unzureichender Akzeptanzkriterien standen von den nicht amplifizierten Gesamtgeweben nur die Daten von vier P4-behandelten Tieren und fünf der Vehikelkontrollen zur Verfügung. Die Genexpressionsanalyse lieferte für jede der insgesamt 33 Mamma-Proben pro Aufarbeitungsmethode rund 30.000 Daten zur Expression der auf den Microarrays befindlichen Transkripte.

5.2.1.3.1 Qualität von RNA und GeneChips®

Da die Einbeziehung von Probenmaterialien mit degradierter RNA deren Genexpressionslevel und damit deren biologische Interpretation beeinflusst, ist die Bewertung der RNA-Qualität für Genexpressionsanalysen essenziell (49). Daher wurden für die entsprechenden Proben aller drei Aufarbeitungsmethoden entsprechende

Qualitätskriterien überprüft und verglichen, um eine gute Qualität der isolierten RNA für nachfolgende GeneChip-Experimente sowie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (Tabelle 14).

Tabelle 14 – Übersicht über die Qualitätskontrolle der RNA nach unterschiedlicher Probenaufarbeitung.

Testsubstanz	Tiernummer	Aufarbeitungsmethode	RIN Gesamt-RNA	Noise	Background	Scaling Factor	Percent Present Calls	Gapdh 3'/5' Ratio
Vehikelkontrollen	4	LCM	7.1	1.7	49.0	3.3	58.3	1.2
		Gesamigewebe	8.8	1.4	42.4	3.0	59.8	19.9
	5	Gesamigewebe	8.8	1.1	36.7	3.3	66.7	1.1
		LCM	7.2	1.4	41.0	4.7	56.7	1.2
	6	Gesamigewebe	8.2	1.5	43.7	4.5	53.4	19.5
		Gesamigewebe	8.2	1.2	36.2	6.2	53.6	1.3
		LCM	5.7	1.4	42.6	3.3	59.0	24.2
		Gesamigewebe	8.5	1.2	37.3	3.3	66.2	1.2
	16	Gesamigewebe	8.5	1.3	41.3	5.3	57.7	1.1
		LCM	5.4	1.6	43.9	6.3	49.8	14.7
	18	Gesamigewebe	7.8	1.3	39.6	3.3	65.2	1.4
		Gesamigewebe	7.8	1.1	34.6	10.9	50.1	1.2
LCM		5.1	1.4	42.1	3.6	58.9	15.4	
415	Gesamigewebe	8.7	1.2	37.3	3.9	64.1	1.1	
	Gesamigewebe	5.6	1.2	36.9	4.7	57.3	1.2	
	LCM	7.4	1.4	43.8	3.4	58.8	17.3	
295	Gesamigewebe	7.4	1.3	39.9	3.7	61.8	1.4	
	LCM	6.1	1.3	40.3	3.6	58.0	1.2	
296	Gesamigewebe	7.6	1.4	42.9	4.3	57.1	19.5	
	Gesamigewebe	7.6	1.0	34.6	4.8	63.0	1.1	
297	Gesamigewebe	7.0	1.4	42.9	3.5	58.7	1.2	
	LCM	7.1	1.4	41.1	4.6	55.7	22.3	
298	Gesamigewebe	7.1	1.4	41.1	5.2	55.4	1.4	
	LCM	6.8	1.3	40.1	4.0	55.6	17.2	
299	Gesamigewebe	6.9	1.2	39.4	3.1	64.1	1.5	
	Gesamigewebe	6.9	1.4	40.1	5.7	55.3	1.2	
300	Gesamigewebe	6.5	1.4	42.3	3.9	57.2	20.1	
	LCM	6.8	1.3	40.4	3.0	64.7	1.4	
300	Gesamigewebe	7.8	1.4	40.2	5.1	54.7	1.2	
	LCM	7.2	1.3	40.5	4.3	56.8	23.1	
P4	Gesamigewebe	7.2	1.0	33.0	7.2	54.5	1.3	
	LCM	-	1.5	43.1	4.4	53.1	24.9	
P4	Gesamigewebe	7.7	1.3	38.9	3.5	61.8	1.1	
	Gesamigewebe	7.7	1.3	38.9	3.5	61.8	1.1	

Dargestellt sind die ermittelten Werte für RIN, Noise, Background, Scaling Factor, Percent Present Calls und das Gapdh 3'/5' Ratio der LCM-Proben sowie der entsprechenden amplifizierten und nicht amplifizierten Gesamigewebe. Akzeptanzkriterien: RIN 5-10; Noise < 4; Background < 100; Scaling Factor: Variation < 3-fach; Percent Present Calls > 25 %; Gapdh 3'/5' Ratio < 3; grau unterlegt: Proben unzureichender aRNA-Mengen

Der Vergleich der Qualitätsparameter verdeutlichte, dass sich die Qualität der RNA und GeneChips® (Affymetrix) gleicher Proben in Abhängigkeit von der jeweiligen Aufarbeitung teilweise unterschieden hat. So zeigte sich beispielsweise anhand der RIN, dass zwar alle Proben abgesehen von einer LCM-Probe (Tiernummer 300) die Akzeptanzkriterien erfüllten, im Vergleich der drei Aufarbeitungsmethoden, für jede einzelne Probe separat betrachtet, die RNA-Qualität der LCM-Proben jedoch stets am schlechtesten war (außer Tiernummer 199). Während die Werte für Noise, Background und Scaling Factor zwischen allen Proben unterschiedlicher Aufarbeitung vergleichbar waren, wurden außerdem Unterschiede zwischen den Werten der Percent Present Calls deutlich. Diese deuteten an, dass der Anteil detektierter Probe Sets in allen nicht amplifizierten Gesamtgeweben höher war, als in den amplifizierten Gesamtgeweben und LCM-Probenmaterialien. Demnach konnte innerhalb dieser nicht amplifizierten Proben eine höhere Anzahl an Transkripten detektiert und quantifiziert werden als innerhalb der amplifizierten (60). Schließlich verdeutlichte das *Gapdh* 3'/5' Ratio, dass die aRNA in sämtlichen Proben des amplifizierten Gesamtgewebes eine verminderte Qualität aufwies. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf den Amplifizierungsprozess, da die RIN der ursprünglich isolierten Gesamt-RNA aller Proben sehr hoch war. Damit wies das Ausgangsmaterial eine sehr gute Qualität auf, infolge dessen sämtliche Daten zur nachfolgenden Genexpressionsanalyse herangezogen wurden.

5.2.1.3.2 Amplifizierungsprozess

Die Genexpressionsanalyse der LCM-Proben mittels Affymetrix GeneChips® erfordert einen Amplifizierungsschritt, um eine ausreichende RNA-Menge zu erhalten. Da dieser Schritt jedoch Unterschiede zwischen den Genexpressionsprofilen unterschiedlicher Probentypen zur Folge haben könnte, wurde der Einfluss des Amplifizierungsprozesses auf das Genexpressionsprofil ermittelt.

5.2.1.3.2.1 Vergleich der Genexpressionsprofile

Um Ähnlichkeiten zwischen den Genexpressionsprofilen der unterschiedlich aufgearbeiteten Proben ermitteln und einzelne Gruppenzugehörigkeiten erfassen zu können, wurden die Daten der LCM-Proben sowie der amplifizierten und nicht amplifizierten Gewebeproben mittels Hierarchischem Clustering analysiert (Abbildung 20). Wie sich zeigte, trennten sich die Proben eindeutig in Abhängigkeit von der jeweiligen Aufarbeitungsmethode voneinander. Außerdem zeichneten sich die LCM-Proben und die amplifizierten Gesamtgewebe durch einen gemeinsamen Ursprung im Dendrogramm aus, während die nicht amplifizierten Gesamtgewebe ein zweites separates Cluster bildeten.

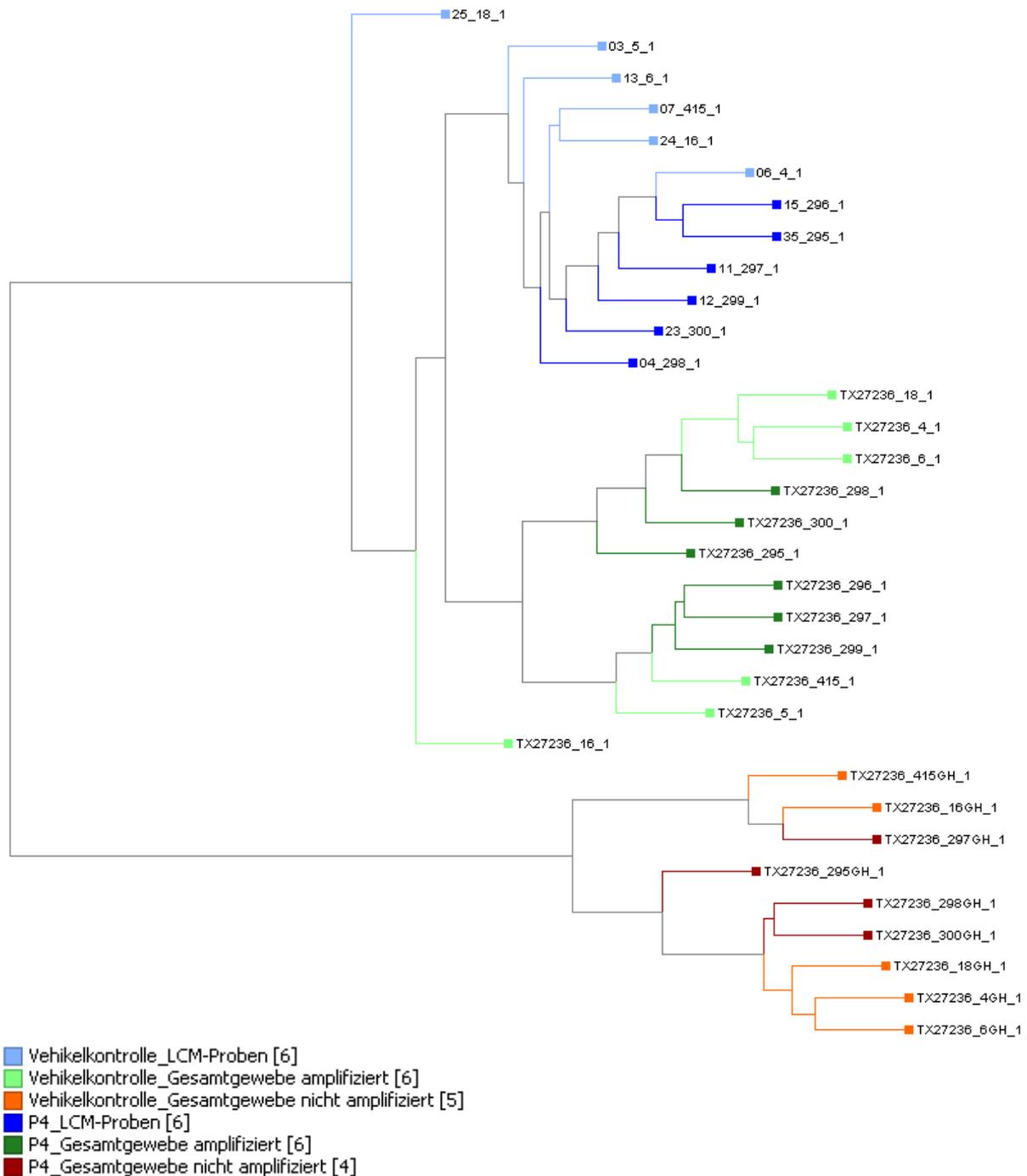


Abbildung 20 – Hierarchisches Clustering der Genexpressionsdaten unterschiedlich aufgearbeiteter Proben. Dargestellt sind die Daten der LCM-Proben, der amplifizierten und nicht amplifizierten Gesamtgewebe der hohen P4-Dosis sowie der Vehikelkontrollen. Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Behandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Proben mit großen Ähnlichkeiten zwischen den Genexpressionsprofilen sind eng in Form von Cluster gruppiert.

Um bewerten zu können, wie der Prozess der linearen Amplifizierung das umfassende Genexpressionsprofil beeinflusst, wurde anschließend die Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene ermittelt, die innerhalb der Datensätze aller drei Aufarbeitungsmethoden gemeinsam bzw. ausschließlich innerhalb jedes einzelnen Datensatzes detektiert wurde. Die Anzahl induzierter (\uparrow) und reprimierter (\downarrow) Gene innerhalb der Genexpressionsdaten der unterschiedlich aufgearbeiteten Proben wurde dabei separat verglichen (Abbildung 21).

Hierbei zeigte sich, dass von insgesamt 416 Genen lediglich sieben (5 \uparrow , 2 \downarrow) innerhalb der Genexpressionsdaten aller drei unterschiedlich aufgearbeiteten Proben gemeinsam als differenziell exprimiert detektiert wurden. Mit 252 Genen (95 \uparrow , 157 \downarrow) wurde die größte Anzahl ausschließlich innerhalb eines Datensatzes identifizierter induzierter wie reprimierter Gene in den LCM-Daten detektiert. 100 Gene (42 \uparrow , 58 \downarrow) wurden einzig innerhalb des Datensatzes der amplifizierten Gesamtgewebe als differenziell exprimiert detektiert, während lediglich 36 Gene (16 \uparrow , 20 \downarrow) und damit die wenigsten nur innerhalb der nicht amplifizierten Gesamtgewebe als differenziell exprimiert detektiert wurden. Außerdem zeigte sich, dass zwischen den Datensätzen der LCM-Proben und der amplifizierten Gesamtgewebe zweimal mehr gemeinsam deregulierte Gene detektiert wurden (16 \uparrow , 6 \downarrow) als zwischen den Datensätzen der amplifizierten und der nicht amplifizierten Gesamtgewebe (8 \uparrow , 3 \downarrow). Die geringsten Übereinstimmungen bestanden zwischen den Genexpressionsprofilen der LCM-Proben und der nicht amplifizierten Gesamtgewebe (7 \uparrow , 2 \downarrow).

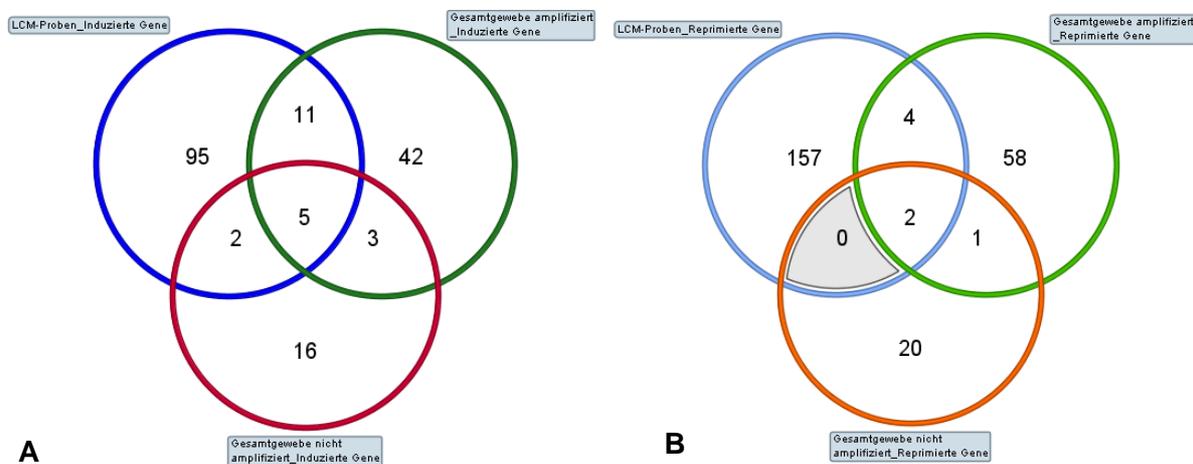


Abbildung 21 – Venn-Diagramm zum Vergleich der detektierten Anzahl deregulierter Gene innerhalb der Genexpressionsdaten unterschiedlich aufgearbeiteter Proben. Dargestellt ist die Anzahl induzierter (A) und reprimierter (B) Gene, die nach P4-Behandlung im Vergleich zur Vehikelkontrolle gemeinsam und ausschließlich innerhalb der Genexpressionsdaten der LCM-Proben, der amplifizierten und nicht amplifizierten Gesamtgewebe als differenziell exprimiert detektiert wurden (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Die nähere Betrachtung der Gene, die ausschließlich innerhalb der LCM-Proben als induziert bzw. reprimiert identifiziert wurden, verdeutlichte, dass die meisten zwar auch innerhalb der Proben der amplifizierten und nicht amplifizierten Gesamtgewebe entsprechend induziert bzw. reprimiert wurden, nicht jedoch die festgelegten Akzeptanzkriterien erfüllten (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Außerdem zeichneten sich nahezu alle induzierten Gene, die lediglich innerhalb der Proben der nicht amplifizierten Gesamtgewebe als statistisch signifikant dereguliert detektiert wurden, durch wesentlich geringere Expressionslevel der entsprechenden Probe Sets innerhalb der Proben der amplifizierten Gesamtgewebe und der LCM-Proben aus, erfüllten dabei jedoch nicht die festgelegten Akzeptanzkriterien (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

5.2.1.3.2 Vergleich detektierter Expressionsintensitäten

Um im Folgenden zu untersuchen, ob Unterschiede hinsichtlich detektierter Expressionsintensitäten tatsächlich auf den Amplifizierungsprozess zurückzuführen sind, wurden die durchschnittlichen Expressionslevel ausgewählter Probe Sets zwischen den amplifizierten und nicht amplifizierten Proben separat verglichen. Dazu wurden beispielhaft die sechs Probe Sets 1397674_at, 1396278_at, 1381850_at, 1396059_at, 1381542_at und 1395441_at herangezogen (Abbildung 22).

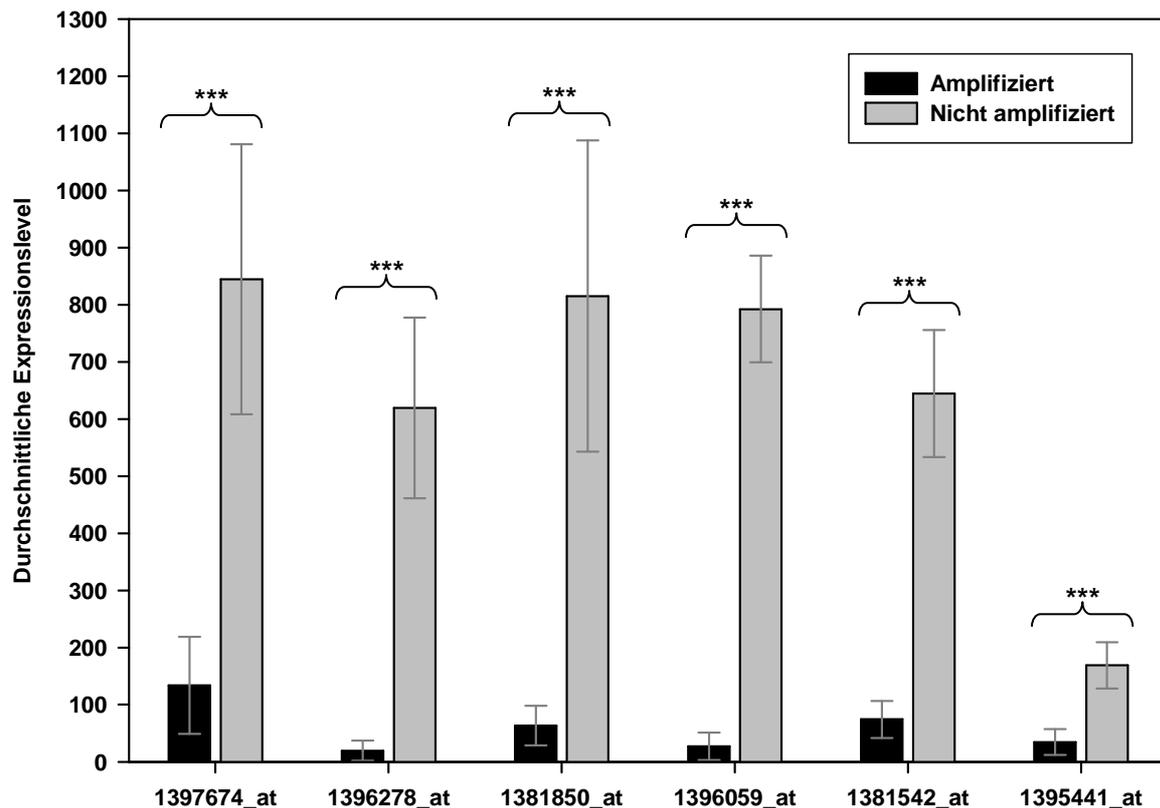


Abbildung 22 – Vergleich der durchschnittlichen Expressionslevel sechs ausgewählter Probe Sets zwischen den amplifizierten und nicht amplifizierten Proben. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt ($p < 0,001$ ***). [1397674_at: *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa*, NM_001100662.1; 1396278_at: *sorting nexin 11*, NM_001012012.1; 1381850_at: *protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A*, NM_053890.1; 1396059_at and 1381542_at: *UBX domain containing 2*, NM_001012025.1; 1395441_at: *poly(rC) binding protein 4 (predicted)*, XM_001071111.1]

Wie sich deutlich zeigte, unterschieden sich die durchschnittlichen Expressionslevel gleicher Probe Sets dahingehend, dass in den nicht amplifizierten Proben wesentlich höhere Level ermittelt wurden, als in den entsprechenden amplifizierten. So wurden beispielsweise im Falle des Probe Sets 1396278_at (*sorting nexin 11*) in den nicht amplifizierten Proben etwa 33-fach höhere durchschnittliche Expressionslevel detektiert als in den gleichen amplifizierten Proben. Die nähere Untersuchung dieser ausgewählten Probe Sets gab zu erkennen, dass diese jeweils mehr als 600 bp entfernt vom 3'-Terminus des jeweiligen Gens lokalisiert sind.

5.2.2 In-vivo-Experimente

Zur Charakterisierung der Gestagenwirkung an der Mamma wurde pro Behandlungsgruppe sechs weiblichen Ratten täglich eines von vier verschiedenen Gestagenen (PRL, R5020, MPA bzw. P4) in zwei Dosierungen über einen Zeitraum von 28 Tagen appliziert. Die niedrigere Dosis entsprach dabei der ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis der jeweiligen Testsubstanz, die höhere dem 10-fachen dieser pharmakologisch wirksamen Dosis.

5.2.2.1 Befunde konventioneller toxikologischer Parameter

Bei Sektion wurden die Mammae für die nachfolgenden Aufarbeitungen entsprechend fixiert. Zur histologischen Charakterisierung wurden FFPE-Schnitte der jeweiligen linken inguinalen Mamma herangezogen. In Tabelle 15 sind die histologischen Befunde zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 15 – Übersicht über die Histologie an der Mamma nach täglicher Behandlung mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 über 28 Tage.

Substanzbedingter Befund an der Mamma	PRL		R5020		MPA		P4	
	10 µg/kg/d	100 µg/kg/d	100 µg/kg/d	1000 µg/kg/d	1 mg/kg/d	10 mg/kg/d	15 mg/kg/d	150 mg/kg/d
Sekretion	x	x	x x	x	x x	x x	x x	x
Lobuläre Hyperplasie	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
Mehrschichtiges Epithel					x	x x		

Dargestellt sind die entsprechenden Befunde sowie der jeweilige mittlere Stärkegrad in Abhängigkeit von der Testsubstanz und Dosis. x: gering; xx: leicht

Infolge der Gestagenbehandlung wurden an den Mammae nach Applikation beider Dosierungen der vier Gestagene PRL, R5020, MPA und P4 Sekretion und lobuläre Hyperplasie geringen bis leichten Stärkegrades beobachtet. Hierbei zeigten die Mammae der MPA-behandelten Tiere bei beiden Dosierungen eine unterschiedliche Morphologie, gekennzeichnet durch mehrschichtige Epithelien in den hyperplastischen Lobuli. Außerdem nahm der Stärkegrad dieses Befundes dosisabhängig zu.

5.2.2.2 Genexpressionsanalyse an der Mamma

Zur Analyse von Genexpressionsprofilen des Gesamtgewebes wurde die RNA der bei Sektion in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen inguinalen Mammae isoliert und auf Affymetrix GeneChips[®] hybridisiert. Zur Auswertung herangezogen wurden die Daten von neun Kontrolltieren nach s.c. Applikation des Vehikels und sechs Tieren pro Behandlungsgruppe. Die Genexpressionsanalyse lieferte für jede der insgesamt 57 Mamma-Proben rund 30.000 Daten zur Expression der auf den GeneChips[®] (Affymetrix) befindlichen Transkripte.

5.2.2.2.1 Multivariate Analyse

In einem ersten Schritt sollte eine generelle Übersicht über die komplexen Datensätze erhalten und visualisiert werden. Dazu wurden Hauptkomponentenanalysen und Hierarchisches Clustering durchgeführt.

Die PCA der Daten aller Behandlungsgruppen (Abbildung 23) veranschaulichte, dass diese einschließlich der Proben der Vehikelkontrollen beieinander clusterten, ohne eine eindeutige Separierung der Behandlungsgruppen erkennen zu lassen. Lediglich die Proben der hohen MPA-Dosis trennten sich entlang der PC3 deutlich von den übrigen Komponenten ab. Gene, die am stärksten zu dieser Datenvariabilität und damit Separierung beitrugen, konnten identifiziert werden und waren beispielsweise *kallikrein*, *submaxillary gland S3 (Klks3)*, *melan-A (Mlana)*, *common salivary protein 1 (LOC171161)*, *tektin 3 (Tekt3)*, *complement component 3 (C3)*, *WAP four-disulfide core domain 3 (Wfdc3)*, *surfactant protein D (Sftpd)*, *troponin T type 2 (cardiac) (Tnnt2)*, *stefin A3 (Stfa3)* und *proline rich, lacrimal 1 (Prol1)*. Ein eindeutiger Dosisseffekt wurde lediglich entlang der PC3 für MPA deutlich.

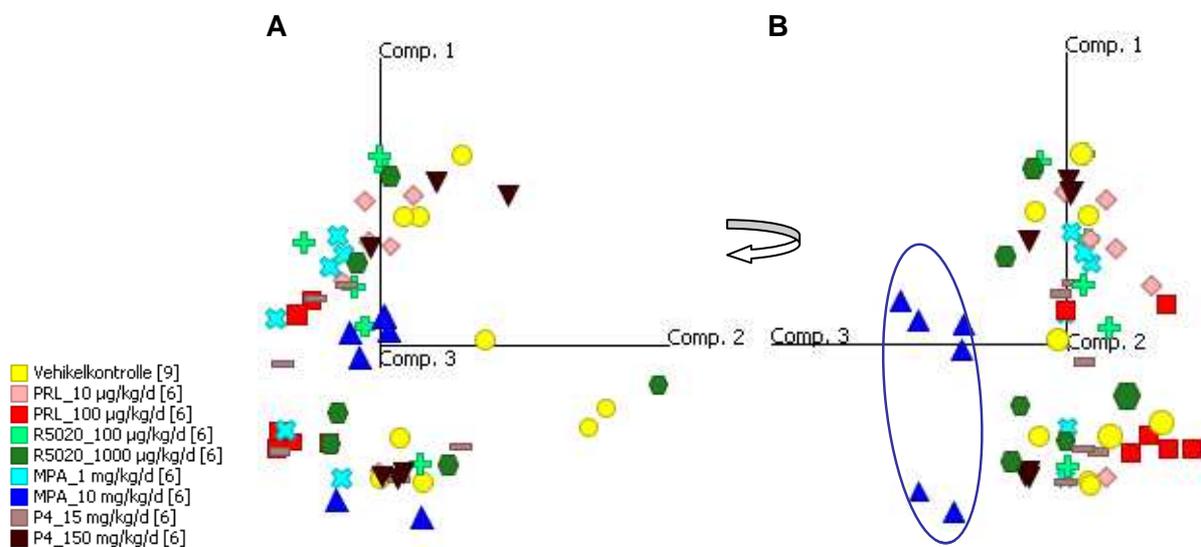


Abbildung 23 – Hauptkomponentenanalyse der Mamma-Proben gestagenbehandelter Ratten.

Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Gestagensdosis und / oder Substanzbehandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Das Genexpressionsprofil jeder einzelnen Probe wird durch das jeweilige Symbol wiedergespiegelt. Die PCA ist für zwei Projektionsebenen dargestellt (A, B; 90°-Rotation um PC1).

Um einzelne Gruppenzugehörigkeiten besser erfassen zu können, wurden die Mamma-Proben äquipotenter Gestagensdosierungen separat mittels Hierarchischem Clustering analysiert. In der niedrigen Dosis (Abbildung 24 A) zeigten sich im Wesentlichen zwei Hauptcluster, die jedoch keine eindeutigen Subcluster einzelner Behandlungsgruppen erkennen ließen. In der hohen Dosis hingegen (Abbildung 24 B) zeigten sich einzelne Subcluster. So waren fünf der insgesamt sechs Proben der PRL-behandelten Tiere sowie vier der MPA-behandelten und je drei der Proben der Vehikelkontrollen in engen Subclustern organisiert. Die Proben der R5020- und P4-behandelten Tiere separierten sich nicht eindeutig voneinander, sondern clusterten gemeinsam.

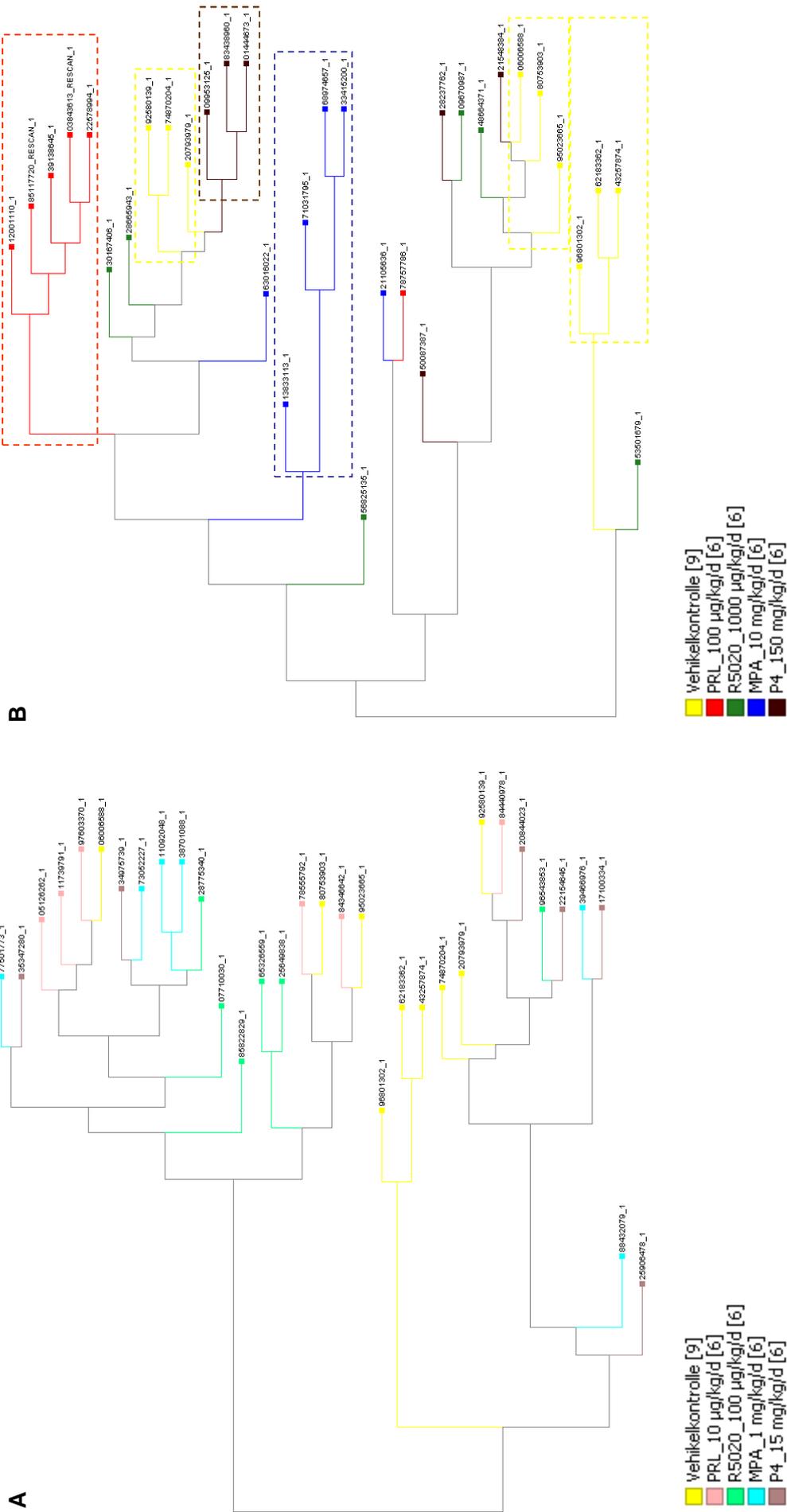


Abbildung 24 – Hierarchisches Clustering der Mamma-Proben gestagenbehandelter Ratten. Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Gestagensdosis und Substanzbehandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Proben mit großen Ähnlichkeiten zwischen den Genexpressionsprofilen sind eng in Form von Cluster gruppiert. A: ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 und Vehikelkontrollen; B: 10-fache ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 und Vehikelkontrollen

5.2.2.2 Univariate Analyse

In einem zweiten Schritt sollte die Regulation der Genexpression innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen analysiert und letztlich miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Student's t-Tests durchgeführt ($p\text{-value} \leq 0,01$; $FC \geq 2$), um die innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen deregulierten Gene zu ermitteln.

Die Anzahl der infolge der jeweiligen Testsubstanz und Dosis signifikant deregulierten Gene ist in Tabelle 16 zusammengefasst. Mit 1158 deregulierten Genen waren die insgesamt beobachteten Genexpressionsänderungen bei den Tieren der hohen PRL-Dosis am ausgeprägtesten und mit 138 bei denen der äquipotenten P4-Dosis am geringsten. In der niedrigeren, pharmakologisch wirksamen Dosis wurden bei den MPA-behandelten Tieren deutlich mehr Gene dereguliert als bei denen der übrigen Gestagene. Darüber hinaus bedingten alle Gestagene in der hohen Dosis sowie MPA und P4 auch in der niedrigeren Dosis insbesondere die Induktion von Genen.

Tabelle 16 – Anzahl signifikant deregulierter Gene nach Behandlung mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 im Vergleich zu den entsprechenden Vehikelkontrollen der Mamma-Proben (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Testsubstanz	Dosis	Anzahl deregulierter Gene		
		Induziert	Reprimiert	Gesamt
PRL	10 µg/kg/d	71	89	160
	100 µg/kg/d	681	477	1158
R5020	100 µg/kg/d	96	217	313
	1000 µg/kg/d	99	70	169
MPA	1 mg/kg/d	465	206	671
	10 mg/kg/d	671	261	932
P4	15 mg/kg/d	334	52	386
	150 mg/kg/d	83	55	138

Zur Charakterisierung einzelner Substanz- und Dosiseffekte wurden die im Vergleich zur Kontrolle signifikant deregulierten Gene innerhalb jeder einzelnen Behandlungsgruppe identifiziert. Die zehn stärksten induzierten und reprimierten Gene jeder Gruppe sind in den Tabellen 27 A-D (8.16) zusammenfassend dargestellt. Wie sich zeigte, war die Regulierungsrichtung (Induktion oder Repression) gleicher Gene bei den Tieren aller Behandlungsgruppen identisch, das Ausmaß der Regulation jedoch zum Teil stark unterschiedlich. So war *whey acidic protein (Wap)* beispielsweise als einziges Gen in jeder der Behandlungsgruppen unter den zehn stärksten deregulierten Genen, dessen Induktion variierte jedoch zwischen 5- (10 µg/kg/d PRL) und 26-fach (10 mg/kg/d MPA). Hinsichtlich der übrigen Gene zeigten sich nur vereinzelt Übereinstimmungen zwischen den Behandlungsgruppen.

Um den gemeinsamen Wirkmechanismus der vier Progestine bei pharmakologisch wirksamer Dosis an der Rattenmamma analysieren zu können, wurden auf Grundlage der jeweiligen signifikant deregulierten Gene die bei den Tieren dieser Behandlungsgruppen gemeinsam deregulierten ermittelt. Insgesamt wurden 14 Gene identifiziert und in Tabelle 17 aufgeführt, von denen vier Gene, *Wap*, *Fabp3*, *Aqp3* und *Muc1*, durch alle Gestagene auch in der höheren Dosis einheitlich und zum Teil mit deutlichem Abstand induziert wurden.

Tabelle 17 – Übersicht über die infolge der 28-tägigen Applikation der pharmakologisch wirksamen Dosis von PRL, R5020, MPA und P4 in der Mamma gemeinsam deregulierten 14 Gene (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; FC ≥ 2).

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change			
				PRL	R5020	MPA	P4
Induzierte Gene							
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	5	12	24	16
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	7	6	29	13
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	9	4	21	16
gap junction protein, beta 2	Gjb2	1373386_at	NM_001004099.1	3	4	10	7
ATPase, H+, transporting, lysosomal V1 subunit C2	Atp6v1c2	1376239_at	NM_001014199.1	3	4	7	8
muclin 1, cell surface associated	Muc1	1398318_at	NM_012602.1	3	3	7	7
oleoyl-ACP hydrolase	Olah	1368756_at	NM_022705.1	3	3	5	4
protease, serine, 32	Prss32	1393241_at	NM_001106983.1	4	3	4	4
glutathione S-transferase alpha 4	Gsta4	1372297_at	NM_001106840.1	2	2	4	4
grainyhead-like 1 (Drosophila)	Grhl1	1385089_at	XM_002726727.1	2	2	4	3
apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	Apobec3f	1392810_at	NM_001033703.1	2	2	4	3
Reprimierte Gene							
ectodermal-neural cortex 1	Enc1	1382710_at	NM_001003401.1	-4	-4	-4	-4
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Hif1a	1368149_at	NM_024359.1	-4	-2	-2	-4
potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3	Kcns3	1368751_at	NM_031778.2	-2	-2	-2	-2

Liegen Daten zu mehreren Probe Sets eines Gens vor, ist der jeweils größere FC aufgeführt.

Zur näheren Charakterisierung des zu den übrigen Gestagenen beobachteten unterschiedlichen Effekts der hohen MPA-Dosis an der Rattenmamma wurden diejenigen Gene ermittelt, die ausschließlich bei den Tieren dieser Behandlungsgruppe dereguliert wurden. Dazu wurde ein Venn-Diagramm erstellt (Abbildung 25) und 764 Gene identifiziert, die ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis dereguliert wurden. Zu den 20 stärksten deregulierten der so ermittelten Gene (Tabelle 18) gehörten *Prol1* (556-fach induziert), *Stfa3* (358-fach induziert), *Sftpd* (51-fach induziert) und *Lao1* (38-fach induziert) sowie *Olr1641* (7-fach reprimiert), *Bdnf*, *Wnt5b*, *Kif5c*, *Adamts19* und *Rasl11b* (je 5-fach reprimiert), die bereits mittels Student's t-Test als am stärksten deregulierte Gene innerhalb dieser Behandlungsgruppe identifiziert wurden (siehe Tabelle 27 C, 8.16).

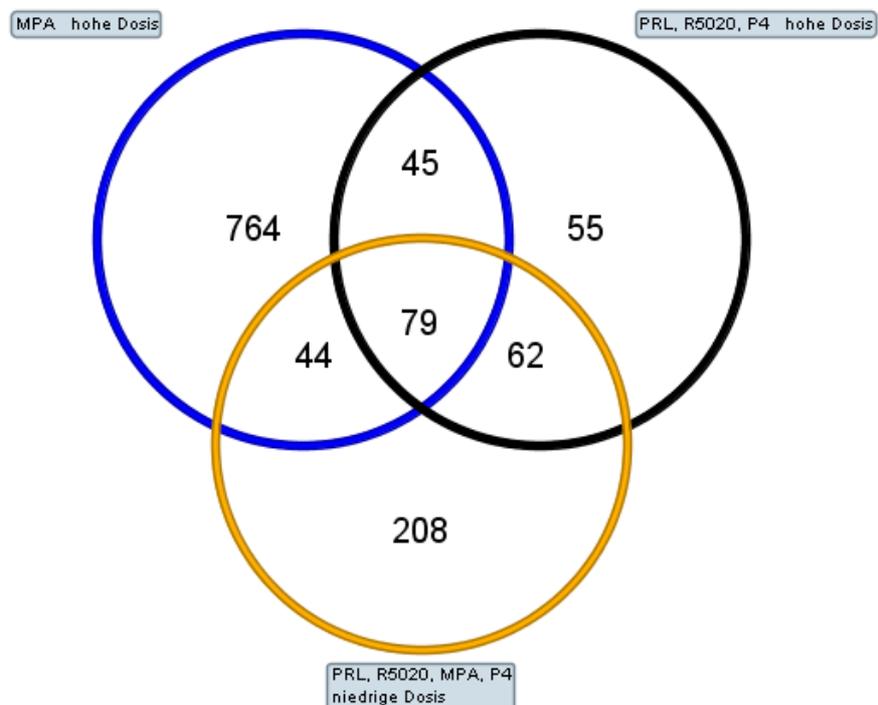


Abbildung 25 – Venn-Diagramm zur Identifizierung der ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis in der Mamma deregulierten Gene im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen. Dargestellt ist die Anzahl der zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen gemeinsam sowie einzigartig deregulierten Gene nach der jeweiligen Gestagengabe (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).

Tabelle 18 – Übersicht über die am stärksten und ausschließlich nach Applikation der hohen MPA-Dosis in der Mamma deregulierten Gene.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>) MPA 10 mg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
proline rich, lactimal 1	<i>Pro11</i>	1387014_at	NM_133513.1	556
stefin A3	<i>Sfta3</i>	1398063_x_at	NM_001105877.1	358
surfactant protein D	<i>Sftpd</i>	1387315_at	NM_012878.1	51
L-amino acid oxidase 1	<i>Lao1</i>	1385064_at	NM_001106682.1	38
lymphocyte antigen 6 complex, locus A-like	<i>Ly6al</i>	1378690_at	NM_001128099.1	25
carbonic anhydrase 6	<i>Car6</i>	1371708_at	NM_001134841.1	17
acetoacetyl-CoA synthetase	<i>Aacs</i>	1368126_at	NM_023104.1	15
quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1, transcript variant 1	<i>Qsox1</i>	1368024_at	NM_001109898.1	14
variable coding sequence A1	<i>Vcsa1</i>	1387463_at	NM_012684.2	12
cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1	<i>Cyp2b1</i>	1371076_at	NM_001134844.1	9
olfactory receptor 1641	<i>Olr1641</i>	1371268_at	NM_001000100.1	-7
brain derived neurotrophic factor	<i>Bdnf</i>	1368677_at	NM_012513.3	-5
wingless-type MMTV integration site family, member 5B	<i>Wnt5b</i>	1374970_at	NM_001100489.1	-5
kinesin family member 5C	<i>Kif5c</i>	1395997_at	NM_001107730.1	-5
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 19	<i>Adam19</i>	1379586_at	NM_001108433.1	-5
RAS-like family T1 member B	<i>Ras111b</i>	1383322_at	NM_001002830.2	-5
fibrinogen gamma chain	<i>Fgg</i>	1370086_at	NM_012559.2	-5
intermediate filament family orphan 2	<i>Iifo2</i>	1395796_at	NM_001134703.1	-4
SLIT and NTRK-like family, member 1	<i>Slitrk1</i>	1391019_at	NM_001107283.1	-4
homer homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>Homer1</i>	1370997_at	NM_031707.1	-4

Dargestellt sind je zehn der am stärksten und ausschließlich in dieser Behandlungsgruppe induzierten und reprimierten Gene im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; FC ≥ 2).

5.2.2.2.3 Analyse von Tumormarkergenen

Zur näheren Charakterisierung der beobachteten spezifischen Effekte der hohen MPA-Dosis wurden auf Grundlage von Literaturquellen Markergene identifiziert, die mit der Tumorigenese in der Mamma verschiedener Säuger in Zusammenhang stehen (7; 10; 61-79) (Tabelle 19).

Um diesbezüglich Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen den Genexpressionsprofilen der Mammæ der gestagenbehandelten Tiere zu untersuchen, wurden der nachfolgenden PCA ausschließlich diese Markergene zu Grunde gelegt (Abbildung 26). Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen Behandlungsgruppen, insbesondere die Proben der hohen MPA- und PRL-Dosis, jeweils eng beieinander clusterten. Außerdem zeichnete sich eine leichte Separierung der Proben der hohen MPA-Dosis ab.

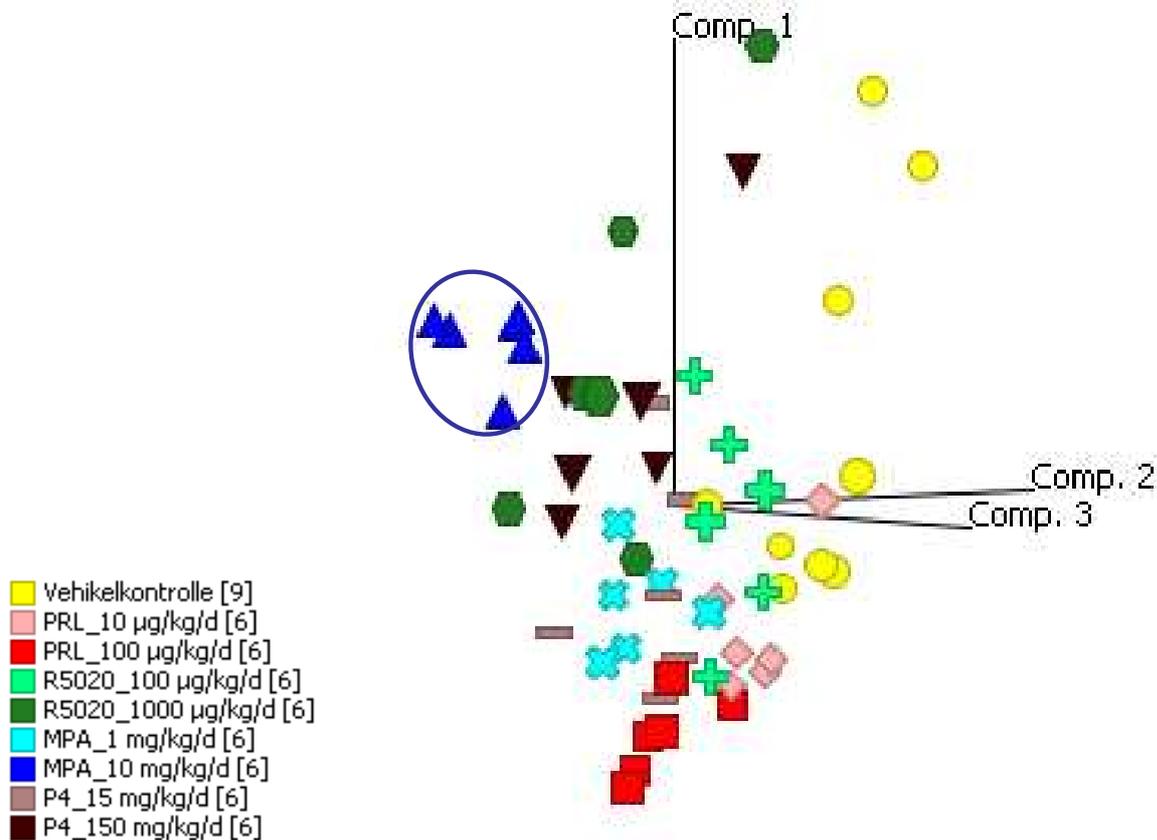


Abbildung 26 – Hauptkomponentenanalyse der Mamma-Proben der Ratten nach 28-tägiger Gestagenbehandlung basierend auf 50 Tumormarkergenen. Dargestellt sind die Genexpressionsdaten der Mammæ der Ratten nach 28-tägiger Behandlung mit der jeweiligen ED_{50} und 10-fachen ED_{50} der Schwangerschaftserhaltungsdosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 sowie der Vehikelkontrollen. Die Proben sind entsprechend der jeweiligen Gestagendosis und/oder Substanzbehandlung farblich gekennzeichnet, die Anzahl der biologischen Replikate ist in Klammern angegeben. Das Genexpressionsprofil jeder einzelnen Probe wird durch das jeweilige Symbol widerspiegelt.

Tabelle 19 – Übersicht über die 50 Markergene, die mit der Tumorigenese in der Säugermamma in Zusammenhang stehen und aufgrund von Literaturquellen als solche identifiziert wurden.

GeneName (<i>Rattus norvegicus</i>)	Genesymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	FC MPA	Quellenangabe
amphiregulin	Areg	1369871_at	NM_017123.1	-13	(61; 62)
B-cell CLL/lymphoma 2, nuclear gene encoding mitochondrial protein	Bcl2l	1387611_at	NM_016993.1	n.d.	(63)
breast cancer 1	Brcal	1387540_at	NM_012514.1	n.d.	(64)
cyclin D1	Ccnd1	1371150_at; 1371643_at; 1383075_at	NM_171992.4	-2	(65)
Cd44 molecule	Cd44	1368921_a_at; 1387952_a_at	NM_012924.2	n.d.	(63)
CDK2-associated protein 1	Cdk2ap1	1388443_at	NM_001113751.1	n.d.	(66)
collagen, type IV, alpha 5	Col4a5	1374705_at	XM_001055156.2	n.d.	(63)
catenin, beta like 1	Ctnnb1	1371633_at	NM_001024870.1	n.d.	(10; 65)
cathepsin D	Ctsd	1367651_at	NM_134334.2	2	(63)
epidermal growth factor	Egfr	1368325_at	NM_012842.1	n.d.	(10; 62)
epidermal growth factor receptor	Egfr	1370830_at	NM_031507.1	-2	(61; 63)
v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	ErbB2	1387813_at	NM_017003.2	n.d.	(67)
estrogen receptor-1	Esr1	1387704_at	NM_012689.1	n.d.	(65)
fibronectin 1	Fln1	1370234_at	NM_019143.2	-2	(63)
frizzled homolog 7 (<i>Drosophila</i>)	Fzd7	1374530_at; 1384194_at	XM_002727202.1	2	(10)
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	1368149_at; 1387076_at	NM_024359.1	-5	(68)
homeo box D10	Hoxd10	1377643_at	NM_001107094.1	n.d.	(65; 69)
inhibitor of DNA binding 1	Id1	1387028_a_at	NM_012797.2	n.d.	(70)
inhibitor of DNA binding 4	Id4	1371520_at; 1375183_at; 1385923_at; 1394022_at	NM_175682.1	-3	(71)
Janus kinase 2	Jak2	1368856_at	NM_031514.1	n.d.	(65)
LIM domain only 4	Lmo4	1373374_at; 1390379_at	NM_001009708.1	n.d.	(65)
leucine rich repeat containing 15	Lrrc15	1370709_at	NM_145083.1	n.d.	(72)
myc induced nuclear antigen	Mina	1386074_at; 1386075_at; 1392743_at	NM_153309.2	n.d.	(73)
matrix metalloproteinase 3	Mmp3	1368657_at	NM_133523.2	n.d.	(63)
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	5	(74)
metallothionein 3	Mt3	1370124_at	NM_053968.2	n.d.	(63)
mucin 1, cell surface associated	Muc1	1396318_at	NM_012602.1	7	(75)
myelocytomatosis oncogene	Myc	1368308_at	NM_012603.2	n.d.	(65; 76)
p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	Pak1	1387377_a_at	NM_017198.1	n.d.	(66)
p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	Pak2	1369650_at	NM_053306.2	n.d.	(66)
p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3	Pak3	1368902_at	NM_019210.1	n.d.	(66)
p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4	Pak4	1378380_at	NM_001106238.1	n.d.	(66)
p53 and DNA damage regulated 1	Pdgr1	1372941_at	NM_001014762.1	n.d.	(65)
progesterone receptor	Pgr	1387563_at	NM_022847.1	-5	(65)
plasminogen	Plg	1368360_at	NM_053491.2	n.d.	(72; 77)
retinoblastoma 1	Rb1	1368185_at	NM_017045.1	n.d.	(63)
secreted phosphoprotein 1	Spp1	1367581_a_at	NM_012881.2	n.d.	(78)
steroid receptor RNA activator 1	Sra1	1371718_at	NM_183329.3	n.d.	(79)
v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	Src	1368830_at; 1373124_at; 1389030_a_at	NM_031977.1	n.d.	(7)
signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	1370224_at; 1371781_at	NM_012747.2	n.d.	(65)
signal transducer and activator of transcription 5A	Stat5a	1368231_at	NM_017064.1	2	(65)
signal transducer and activator of transcription 5B	Stat5b	1387876_at	NM_022380.1	n.d.	(65)
transforming growth factor, beta 2	Tgfb2	1376425_at; 1378963_at; 1388011_a_at; 1392382_at	NM_031131.1	3	(65)
transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	1367859_at	NM_013174.2	3	(65)
tumor necrosis factor alpha induced protein 6	Tnfrsf6	1371193_at; 1371194_at	NM_053382.1	n.d.	(72)
transducer of ErbB-2, 1	Tob1	1368132_at	NM_133317.2	2	(65)
transducer of ERBB2, 2	Tob2	1375677_at	NM_001007146.1	n.d.	(65)
tumor protein p53	Tp53	1367830_a_at; 1367831_at; 1370752_a_at	NM_030989.3	n.d.	(63)
WNT1-inducible signaling pathway protein 2	Wisp2	1369484_at	NM_031590.1	n.d.	(10)
wingless-type MMTV integration site family, member 2B	Wnt2b	1388174_at	XM_001066411.2	n.d.	(10)

Dargestellt sind außerdem die FCs der entsprechenden Gene nach 28-tägiger Applikation der 10-fachen ED₅₀ der Schwangerschaftserhaltungsdosis von MPA (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; FC ≥ 2). Wurden mehrere Probe Sets eines Gens detektiert, ist der jeweils größere FC aufgeführt. n.d.: nicht detektiert

5.2.2.3 Immunhistochemischer Nachweis des Oxytocin-Rezeptors (OXTR)

Zur näheren Charakterisierung der histologisch sichtbaren zusätzlichen Epithelzellproliferation nach MPA-Behandlung sollten die betroffenen Zellen des entsprechenden Mamma-Gewebes visualisiert werden. Dazu wurde der OXTR als Marker für Mamma-Epithel (56) immunhistochemisch anhand von Gewebeschnitten der Mamma je einer Ratte nach 28-tägiger Applikation der hohen Dosis von PRL, R5020, MPA bzw. P4 im Vergleich zu einer Vehikelkontrolle nachgewiesen (Abbildung 27).

Die immunhistochemischen Färbungen verdeutlichten übereinstimmend eine deutliche Hyperplasie der Drüsenepithelien nach Behandlung mit PRL, R5020, MPA und P4, während bei der Vehikelkontrolle nur vereinzelt Alveolen vorlagen. Dass diese jedoch ausschließlich nach MPA-Behandlung von mehrschichtigen Epithelzellen umgeben waren, unterschied die Histologie der Mammae dieser Tiere wesentlich von der der übrigen. So verdeutlichte der immunhistochemische Nachweis des OXTR den histologischen Befund mehrschichtiger Epithelien in den hyperplastischen Lobuli der Mammae MPA-behandelter Tiere und visualisierten die zusätzliche Epithelzellproliferation am Mamma-Gewebe.

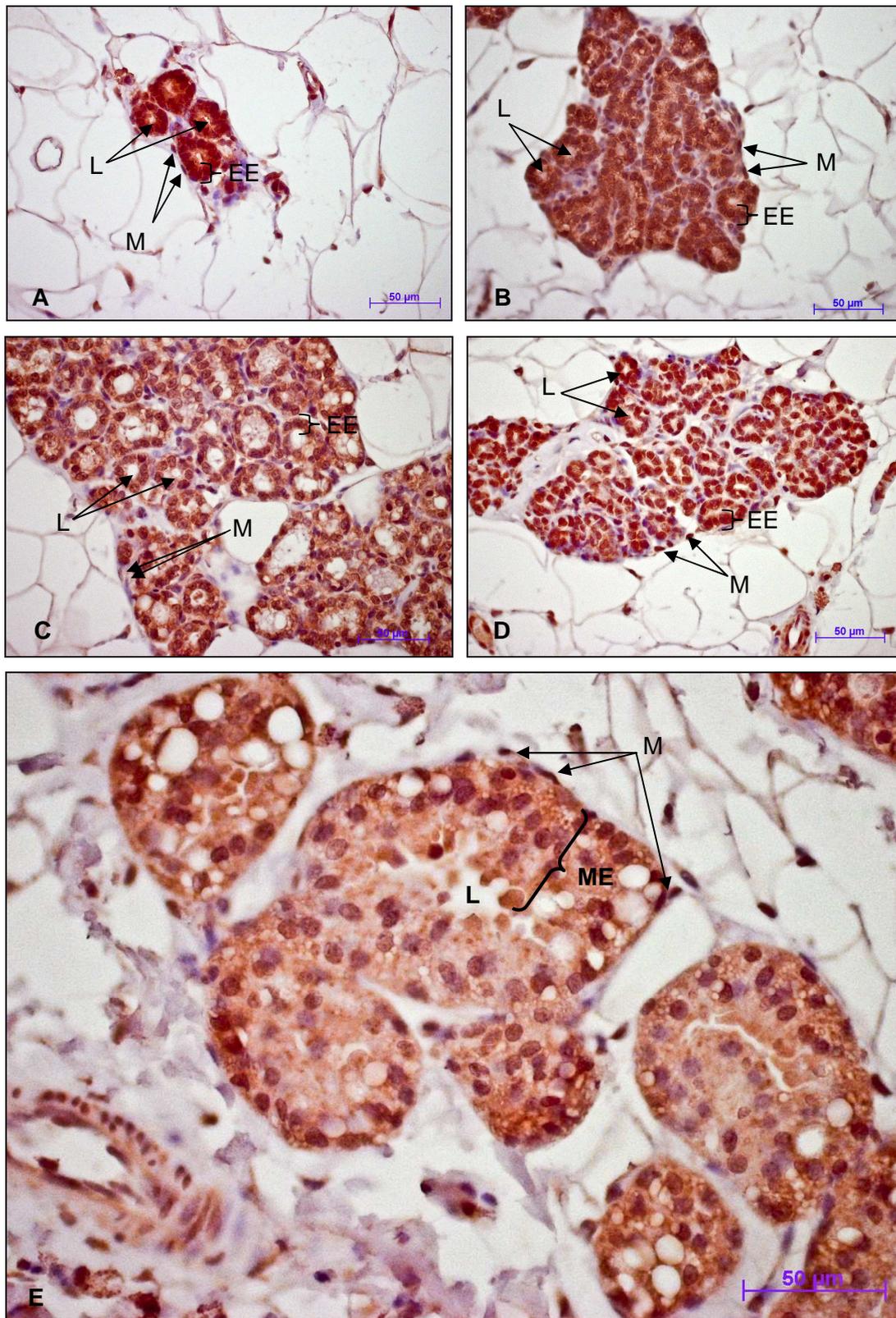


Abbildung 27 – Immunhistochemischer Nachweis (LSAB-Methode) des Oxytocin-Rezeptors im Mamma-Gewebe weiblicher Ratten der In-vivo-Experimente. Dargestellt ist die gold- bis dunkelbraune Färbung des OXTR in Drüsenepithelien der Mamma einer Vehikelkontrolle (A) gegenüber dem Mamma-Gewebe je einer Ratte nach Behandlung mit der hohen Dosis von PRL (B), R5020 (C), P4 (D) bzw. MPA (E). L: Lumen der Alveolen; M: Myoepithelzelle; EE: einschichtige Epithelzellen; ME: mehrschichtige Epithelzellen

6 Diskussion

Uterus und Mamma gehören zu den Reproduktionsorganen der Ratte und sind damit Zielorgane weiblicher Geschlechtshormone. Im Rahmen der Entwicklung neuer Gestagene zur oralen Kontrazeption oder HRT ist daher die Charakterisierung synthetischer Geschlechtshormone insbesondere hinsichtlich ihrer Effekte an diesen Organen von Bedeutung.

Um die Wirkung von Gestagenen am Uterus und der Mamma neben den konventionellen toxikologischen Parametern auch auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf Genexpressionsebene ermittelt, basierend auf In-vivo-Experimenten an Ratten nach 28-tägiger Behandlung mit je einem von vier verschiedenen Progestinen in zwei unterschiedlichen Dosierungen. Dazu wurden anhand der Genexpressionsprofile der Ratten bei pharmakologisch wirksamer Dosis Markergene zusammengestellt, die den gemeinsamen Effekt dieser vier Testsubstanzen am Rattenuterus bzw. der Rattenmamma charakterisieren. Anhand der Genexpressionsprofile beider Organe war bei 10-fach höherer Dosis ein ähnliches Muster für alle Progestine erkennbar, mit Ausnahme von MPA. Hierfür wurde sowohl am Uterus als auch an der Mamma eine Abweichung von den übrigen Profilen deutlich. Gene, die ausschließlich innerhalb dieser Behandlungsgruppe dereguliert waren, wurden identifiziert. Anschließend wurden die charakteristischen Markergene, die auf eine bestimmte Gestagenwirkung hindeuten, biologisch plausibilisiert und zur Ableitung relevanter Wirkmechanismen der vier Progestine teilweise spezieübergreifend behandelt. Außerdem wurde das zusammengestellte Set uteriner Markergene zusammen mit bekannten Humangenen für die Anwendung im Rahmen eines In-vitro-Screening-Systems mit uterinen Leiomyomzellen der Ratte untersucht, um einen Ansatz zur möglichst frühen Beurteilung der pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen synthetischer Gestagene am Rattenuterus zu bieten.

Als wesentlicher methodischer Aspekt wurde die Methode der LCM zur Separierung und Analyse spezifischer Zielzellen von Gestagenen (Drüsenepithelien) aus dem komplexen Mamma-Gewebe etabliert. Dazu wurden die mittels LCM und aus Gesamtgeweben der gleichen Organproben generierten Transkriptionsprofile verglichen und hinsichtlich Aufwand und Informationsgehalt bewertet.

6.1 Gestagene Wirkung am Uterus

6.1.1 Charakterisierung gemeinsamer Substanzeffekte

Nach 28-tägiger Behandlung weiblicher Ratten mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 in der jeweiligen pharmakologisch wirksamen bzw. dazu 10-fach höheren Dosis wurden am Uterus weitgehend übereinstimmende histologische Befunde erhoben. So wurden bei den Tieren aller Behandlungsgruppen Sekretion der Uterus-Drüsen mit teilweise zystischer Dilatation sowie Atrophie und Muzifikation der Mucosa des Gebärmutterhalses beobachtet. Da diese Befunde am Uterus in beiden Dosierungen für alle vier Gestagene übereinstimmend erhoben wurden und den erwarteten pharmakodynamischen Effekten dieser Substanzklasse

entsprachen, können sie als Nachweis der gestagene Wirkung dieser vier Progestine herangezogen werden.

Ein gemeinsamer Effekt der vier Gestagene spiegelte sich auch in den Genexpressionsdaten wider. So bildeten alle Behandlungsgruppen in der PCA ein gemeinsames Cluster, ausgenommen den Uterus-Proben der hohen MPA-Dosis. Ähnlichkeiten insbesondere zwischen den Genexpressionsprofilen der Uteri bei der pharmakologisch wirksamen Gestagendosis verdeutlichte auch das Hierarchische Clustering. Die gemeinsame gestagene Wirkung zeigte sich schließlich anhand der großen Überlappungen hinsichtlich der innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen am stärksten differenziell exprimierten Gene. Zurückzuführen sind diese vermutlich darauf, dass die Progestine am PR größtenteils vergleichbare Effekte haben und Signale hauptsächlich über diesen Rezeptor generieren (19). Gleichzeitig zeigten sich in der Deregulierung anderer Gene sowie im unterschiedlichen Ausmaß der Induktion bzw. Repression gleicher Gene jedoch auch gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Testsubstanzen, die vermutlich auf deren verschiedenen Partialeffekten beruhen (19).

Zur näheren Charakterisierung des beobachteten pharmakologischen Substanzeffekts der vier Progestine wurde anhand der am Rattenuterus ermittelten Daten und bekannten Humangenomen ein Set aus Genen zusammengestellt, das diese gemeinsame gestagene Wirkung am Uterus beschreibt. Diese Markergene wurden anschließend biologisch plausibilisiert und ihren bislang bekannten, gegebenenfalls mehreren Funktionen zugeordnet (Tabelle 28, 8.16). Dazu wurden die Gene teilweise speziesübergreifend behandelt. Wie sich zeigte, regulieren die vier untersuchten Gestagene insbesondere die Reproduktion, Proliferation / Differenzierung, Transportmechanismen, den Zellzyklus, Metabolismus / Katabolismus, die Vermittlung einer Immunantwort, Apoptose und / oder die Signaltransduktion. In Übereinstimmung mit den histologischen Befunden bestehen die wesentlichen pharmakologischen Effekte der vier Testsubstanzen am Rattenuterus demzufolge in der Verminderung E2-vermittelter Proliferation durch die Inhibition des Zellzyklus. Gleichzeitig werden Differenzierungsvorgänge und endometriales Remodeling zur Dezidualisierung gesteigert, um den Uterus auf eine potenzielle Implantation vorzubereiten. Für die entsprechenden metabolischen bzw. katabolen Vorgänge werden vermehrt Enzyme induziert. Zur Anpassung des uterinen einschließlich des immunologischen Milieus wird daher über verschiedene Signalkaskaden und Transportmechanismen beispielsweise die Sekretion von Proteinen gesteigert, wie es sich auch anhand der histologisch beobachteten gesteigerten Sekretion und Muzifikation der Uterus-Schleimhaut durch alle vier Progestine gezeigt hat.

Funktionelle Kategorien überwiegend induzierter Markergene

Als natürliches Gelbkörperhormon nimmt P4 in der Reproduktion der Säuger eine zentrale Rolle ein. Es reguliert uterine Funktionen im Menstruationszyklus der Frau und ist so in die Ovulation sowie die Unterstützung und Aufrechterhaltung der Implantation und Schwangerschaft involviert. Einige dieser Funktionen umfassen die Zellzyklusregulation, metabolische Prozesse sowie die Produktion und Sekretion verschiedener Proteine. Bei der Frau werden diese morphologischen und funktionellen Veränderungen direkt und / oder indirekt insbesondere durch die hohen P4-Level in der Luteal-Phase des Menstruationszyklus reguliert (4). Dass die untersuchten Gestagene vergleichbare Effekte am Rattenuterus aufwiesen, spiegelte sich anhand der eigenen Daten in der histologisch

beobachteten Sekretion und Muzifikation sowie den überwiegend induzierten Markergene wider, die mit der Reproduktionsfunktion des Uterus, Transportmechanismen, dem Metabolismus / Katabolismus sowie der Vermittlung einer Immunantwort und / oder der Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht werden konnten (Abbildung 28).

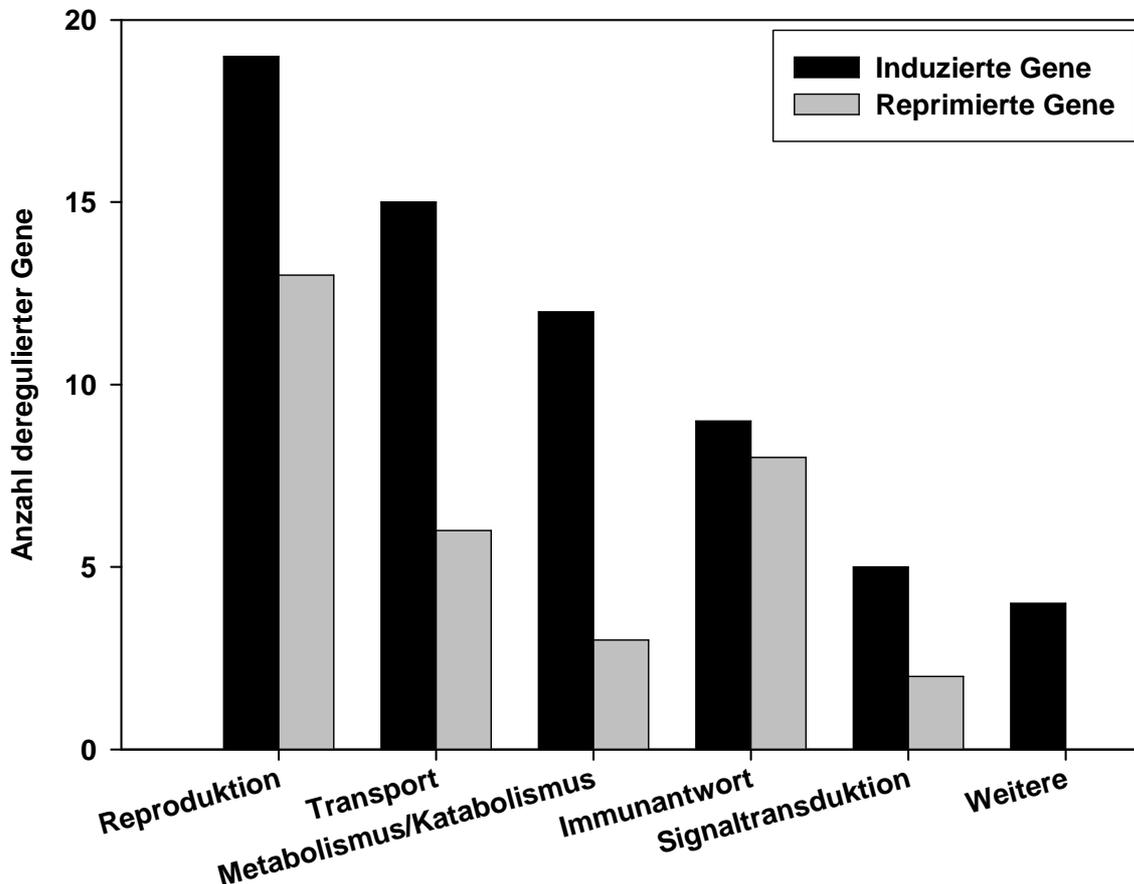


Abbildung 28 – Funktionelle Kategorien überwiegend induzierter Markergene am Rattenuterus nach Gestagenbehandlung. Dargestellt ist die Anzahl der bei pharmakologisch wirksamer Dosis durch alle vier Progestine übereinstimmend induzierten bzw. reprimierten Gene innerhalb der jeweiligen Kategorie.

Reproduktion

Zur Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation des Embryos ist hinsichtlich der Beteiligung am Implantationsprozess im humanen Uterus beispielsweise das Gen **Sgk1** von wesentlicher Bedeutung. So trägt das entsprechend exprimierte Protein durch die Fähigkeit, die Expression und Aktivität epithelialer Natriumionenkanäle zu regulieren, zur Homöostase des Uterus-Milieus bei. Außerdem kontrolliert es in humanen endometrialen Stromazellen die Expression von Prolactin (80), einem wesentlichen Marker endometrialer Dezidualisierung (81). Bei der Frau wird die Expression von *Sgk1* dabei durch P4 reguliert und insbesondere in der Luteal-Phase des Menstruationszyklus gesteigert, wenn die zirkulierenden P4-Level nach der Ovulation hoch sind (80). In Übereinstimmung damit wurde das Gen auch im Uterus der Ratte durch alle vier untersuchten Progestine induziert. Als relevanter Mechanismus konnte deren rezeptorvermittelte Wirkung über die Bindung an entsprechende

HREs in der Promotorregion des Zielgens abgeleitet werden, da der *Sgk1*-Promotor bei der Ratte Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie den PR, GR und MR beinhaltet (82). Das beobachtete unterschiedliche Ausmaß der Induktion dieses Gens ist daher vermutlich auf die unterschiedlichen Partialeffekte der vier Progestine zurückzuführen (19).

Zur Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft ist die Kontrolle der myometrialen Kontraktilität entscheidend. Hierzu tragen beispielsweise die Gene *Kcnj1* und *Oxt* bei. Als eines der am stärksten und durch alle vier untersuchten Gestagene deutlich induzierten Markergene codiert ***Kcnj1*** ein Protein, das zur Ruhigstellung des Rattenuterus während der Trächtigkeit führt. Dabei unterliegen die Expressionslevel des Gens hormonellen Einflüssen und sind gestations- und gewebsspezifisch (83). Als endokrines Hormon erfüllt diesbezüglich auch Oxytocin bedeutende Funktionen. Die Expression des entsprechenden Gens ***Oxt*** wird dabei im Uterus der Ratte wie auch des Menschen durch Gestagene reguliert. Dass auch die vier untersuchten Progestine zu einer Steigerung der mRNA-Level dieses Gens im Rattenuterus führen (4; 84), ließen die eigenen Daten erkennen.

Transport

Zum Zeitpunkt der Ovulation geht der Reproduktionszyklus der Ratte vom Pro-Estrus in den Estrus über. Die damit einhergehenden verminderten E2- und maximalen P4-Level (13) spiegelten sich anhand der eigenen Daten beispielsweise in der Repression des Gens ***Cftr*** durch alle vier Gestagene wider. Dieses Gen codiert einen Chloridionenkanal (85), der unter anderem im luminalen Epithel und im Drüsenepithel des Rattenuterus exprimiert wird und dort vermutlich zur Regulation des Flüssigkeitsvolumens im normalen Zyklus beiträgt (86). Im weiblichen Reproduktionstrakt scheint E2 physiologischer Regulator des *Cftr*-Gens zu sein und im Rattenuterus zur Induktion des Gens zu führen, während nach P4-Einwirkung keine *Cftr*-Expression detektiert wird (87). Die beobachtete Repression dieses Gens durch alle vier Testsubstanzen ist damit vermutlich auf die physiologisch verminderten E2-Level sowie den zusätzlichen antiestrogenen Effekt von R5020, MPA und P4 (26) zurückzuführen. Als eines der am stärksten durch alle vier Gestagene im Rattenuterus induzierten Gene codiert ***Slc17a3*** einen Natrium-Phosphat-Cotransporter, der neben Transportfunktionen auch in den Urat-Metabolismus involviert ist. Dazu liegt er in verschiedenen Geweben der Ratte vor, wurde im Uterus dieser Spezies bislang jedoch nicht nachgewiesen (88; 89). Auch zur Regulation von *Slc17a3* durch Gestagene liegen bislang keine Daten vor. Aufgrund der hier mit am stärksten beobachteten Induktion dieses Gens durch alle vier Progestine im Rattenuterus ist diese jedoch wahrscheinlich.

Metabolismus / Katabolismus

Beim Übergang von der E2-reichen Follikel- in die P4-reiche Luteal-Phase (13) tragen verschiedene Mechanismen zur Verminderung der E2-Wirkung am humanen Uterus bei. Einer davon besteht in der Konvertierung des biologisch aktiven Estrogens in die inaktive Form Estron durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Die Expression dieses Enzyms wird im humanen Endometrium über parakrine Mechanismen durch P4 stimuliert (90). Die am Rattenuterus beobachtete Induktion des ***Hsd17b2***-Gens durch alle vier untersuchten Gestagene lässt daher einen vergleichbaren Wirkmechanismus vermuten.

Auch *Cyp26a1* und *Cyp2f4* codieren Enzyme, die zum Metabolismus bzw. Katabolismus endogener, aber auch exogener Substanzen beitragen. Darüber hinaus gehörten beide auch zu den mit am stärksten induzierten Markergenen gestagener Effekte am Rattenuterus. Während ***Cyp26a1*** im murinen Uterus nachweislich durch P4 induziert wird (91) und das exprimierte Protein hoch effizient Retinsäure eliminiert (92), ist über eine gestagenbedingte Regulation von ***Cyp2f4*** bislang nichts bekannt. Außerdem wurde dessen Expression in der Ratte hauptsächlich in der Lunge nachgewiesen (93). Der Nachweis induzierter Level in humanem ovariellen Krebsgewebe (94) und der humanen Plazenta (95) lässt in Zusammenhang mit der anhand der eigenen Daten beobachteten starken Induktion des Gens durch alle vier Progestine eine gestagenvermittelte Regulation von *Cyp2f4* im Rattenuterus allerdings vermuten.

Immunantwort

Uterine Infektionen können Infertilität oder Frühgeburten zur Folge haben. Aus diesem Grund besteht eine der wesentlichen Grundvoraussetzungen für Fertilität, Implantation und Trächtigkeit in deren Prävention. Das Endometrium muss daher einerseits eine effiziente Barriere für Krankheitserreger bilden, gleichzeitig jedoch Spermien passieren lassen. Die initiale Reaktion gegenüber Infektionen wird dabei durch die Epithelzellen des Endometriums vermittelt. Diese exprimieren zyklusabhängig natürliche antimikrobielle Substanzen, wie das ***Defb1***-Genprodukt Defensin β 1, die die wesentlichen Mediatoren des angeborenen Immunsystems darstellen und als Chemoattraktantien die Interaktion mit dem erworbenen Immunsystem ermöglichen. Die Expressionslevel von *Defb1* sind dabei im Verlauf des Menstruationszyklus der Frau während der P4-reichen Luteal-Phase am höchsten (96). Dass *Defb1* auch im Uterus der Ratte durch alle vier untersuchten Progestine induziert wurde, lässt eine analoge Regulation des Gens in dieser Spezies vermuten.

Signaltransduktion

Als Molekül der extrazellulären Matrix und Zytokin beeinflusst auch das ***Spp1***-Genprodukt Osteopontin das Uterus-Milieu von Säugern und erfüllt hier diverse biologische Funktionen. Vermutlich ausschließlich über den PR-B reguliert, steigen die Expressionslevel von *Spp1* im humanen Uterus während der zweiten Zyklushälfte P4-abhängig stark an. Von den Endometriumsdrüsen sezerniert ist es an der Signaltransduktion beteiligt und so auch in den Implantations- und Plazentationsprozess bei Säugetieren involviert. Von uterinen und plazentalen Immunzellen exprimiert trägt es darüber hinaus auch zu deren Funktionalität und der Zytokinproduktion bei (97). Die beobachtete Induktion von *Spp1* bestätigte dabei dessen beschriebene hormonelle Regulation für den Uterus der Ratte und ist vermutlich auf die stimulierenden Effekte aller vier Progestine am PR zurückzuführen. Deren unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu diesem Steroidhormonrezeptor (19) spiegeln sich dabei im unterschiedlichen Ausmaß der Induktion wider.

Funktionelle Kategorien überwiegend reprimierter Markergene

Zur Vorbereitung des humanen Uterus auf Implantation und Schwangerschaft werden die endometriale Proliferation sowie die Induktion von Differenzierungsprozessen P4-vermittelt reprimiert (96). Damit übereinstimmend wurden im Rattenuterus Markergene, die funktionell

mit der Proliferation / Differenzierung, dem Zellzyklus und / oder apoptotischen Ereignissen in Zusammenhang gebracht werden konnten, nach Gestagenbehandlung überwiegend reprimiert (Abbildung 29). Analog zum murinen Uterus deutet dies auf den PR-A vermittelten inhibitorischen Effekt von P4 auf die E2-induzierte Proliferation des Uterus-Epithels hin (4; 98), mittels dessen PR-B vermittelte proliferative Effekte limitiert und eine E2-induzierte Hyperplasie des Uterus inhibiert werden (98; 99). Der histologisch beobachtete atrophische Zustand des Rattenuterus bestätigte diesen antiproliferativen Effekt von P4 und geht mit der Repression von Molekülen einher, die den Zellzyklus regulieren und vorantreiben. Häufig werden diese daher auch als Proliferationsmarker herangezogen und ihre Induktion mit Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht.

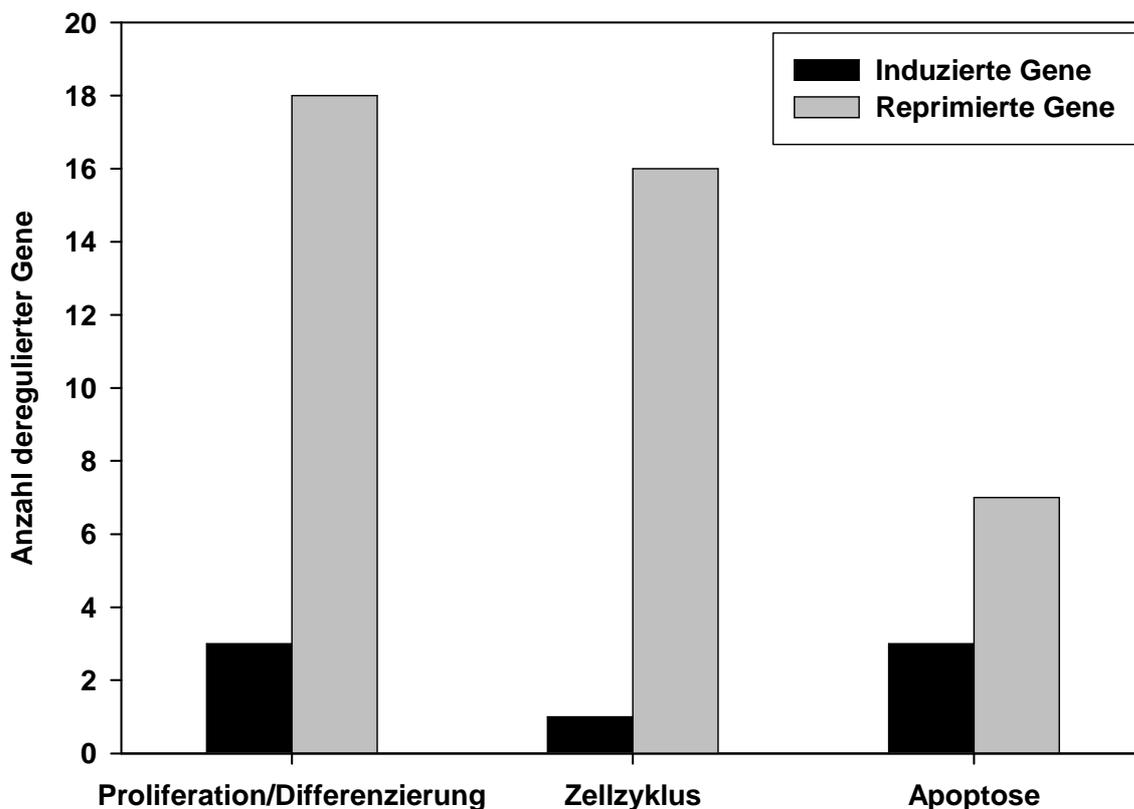


Abbildung 29 – Funktionelle Kategorien überwiegend reprimierter Markergene am Rattenuterus nach Gestagenbehandlung. Dargestellt ist die Anzahl der bei pharmakologisch wirksamer Dosis durch alle vier Progestine übereinstimmend induzierten bzw. reprimierten Gene innerhalb der jeweiligen Kategorie.

Proliferation / Differenzierung

Im humanen Endometrium wird die Inhibition der E2-vermittelten Zellproliferation beispielsweise über autokrine bzw. parakrine Mechanismen durch Wachstumsfaktoren wie IGFs vermittelt, die die zelluläre Proliferation und Differenzierung stimulieren (4; 100). Diese proliferativen Effekte werden insbesondere durch P4 kontrolliert und zwar hauptsächlich über die Regulation des IGF-Bindungsproteins 1 (IGFBP-1), das Genprodukt von *igfbp1* (4). Dieses wird bei der Frau zum Ende der P4-reichen Luteal-Phase von endometrialen Stromazellen vermehrt sezerniert und bindet IGF1 mit hoher Affinität (100). Dass die Sekretion dieses wesentlichen Markers endometrialer Dezidualisierung (81) auch im Uterus

der Ratte durch Gestagene gesteigert und somit der wachstumsstimulierende Effekt von IGF1 unterbunden wird (4), ließ sich anhand der eigenen Daten erkennen. Hier gehörte *Igfbp1* zu den mit am stärksten und durch alle Progestine induzierten Genen, was einen der molekularen Mechanismen deren progestagener und antiestrogener Effekte am Uterus darstellt (100).

Indirekt trägt über diesen Mechanismus auch die beobachtete Repression von ***Mmp7*** zur Hemmung der Proliferation bei. So können hohe Level des exprimierten Proteins die Bioverfügbarkeit von IGFs und damit die Zellproliferation steigern, indem sie sämtliche IGFBPs einschließlich IGFBP-1 degradieren (101). Durch die direkte und indirekte Hemmung der Expression von *Mmp7* durch P4 in der Luteal-Phase des Menstruationszyklus (102-104) wird der wachstumsinhibierende Effekt von *Igfbp1* daher indirekt unterstützt. Diese beschriebene gestagenbedingte Repression konnte anhand der eigenen Daten für die Ratte bestätigt werden. So gehörte *Mmp7* im Rattenuterus zu den durch alle Progestine teilweise mit Abstand am stärksten reprimierten Genen. Außerdem variierte das Ausmaß der Repression zwischen den verschiedenen Gestagenen am stärksten, was vermutlich auf deren unterschiedliche Bindungsaffinitäten zum PR (19) oder den zusätzlichen indirekten Regulationsmechanismus des Gens zurückzuführen ist. Als Stromelysin gehört das *Mmp7*-Genprodukt Matrilysin zur Familie der Matrix Metalloproteinasen, die Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren. Neben dem antiproliferativen Effekt wird dieses daher beim Menschen auch mit endometrialem Remodeling in Zusammenhang gebracht (102). Darüber hinaus kann es zur Verminderung apoptotischer Ereignisse beitragen und steht mit Krebserkrankungen in Zusammenhang (101).

Wesentliche Funktionen hinsichtlich der Kontrolle zellulärer Proliferation und Differenzierung erfüllt auch der Transkriptionsfaktor AP-2 γ , das Genprodukt von ***Tcfap2c***. So reguliert dieser in humanen Zellen die Expression diverser Gene, wie das des ER, die in eine Vielzahl bedeutender biologischer Funktionen involviert sind. Außerdem stimulieren hohe Level bei der Maus beispielsweise gleichzeitig Zellproliferation und Apoptose, während Differenzierungsvorgänge gehemmt werden. Auch im Zellzyklus erfüllt AP-2 γ regulatorische Funktionen, worauf vermutlich dessen Involvierung in die Tumorigenese zurückzuführen ist (105; 106). Über eine gestagenbedingte Regulation von *Tcfap2c* ist bislang zwar nichts bekannt, die bei allen Progestinen beobachtete deutliche Repression des Gens im Rattenuterus lässt dies jedoch vermuten und kann daher zum antiproliferativen und differenzierungsstimulierenden Effekt der vier Testsubstanzen beitragen.

Zellzyklus

Die Genprodukte von *Cdc2*, *Ccna2* und *Ccnb2* sowie *Plk1* oder *Bub1b* sind bei verschiedenen Säugern regulatorisch an der Überleitung einzelner Zellzyklusphasen beteiligt. Infolge dessen kann das Fortschreiten des Zellzyklus durch deren verminderte Expression gehemmt werden. Die im Rattenuterus beobachtete Repression dieser zellzyklusrelevanten Moleküle durch alle vier untersuchten Gestagene trägt daher vermutlich zu deren antiproliferativem Effekt am Uterus der Ratte bei. So ist das ***Cdc2***-Genprodukt an der Transition von der G1- in die S-Phase, der S- in die G2-Phase und der G2- in die M-Phase sowie der Mitose selbst beteiligt (107; 108). Dazu interagiert es beispielsweise mit den Cyclinen A und B und bildet einen für die Transition essenziellen Komplex. Die bei allen Gestagenen mit am stärksten beobachtete Repression des Gens *Cdc2* sowie des Cyclin A-Gens ***Ccna2*** trägt damit vermutlich über vergleichbare Wirkmechanismen

wesentlich zur Inhibition des Zellzyklus im Rattenuterus bei. So ist das entsprechend exprimierte Protein nicht nur während der S- und G2-Phase aktiv, sondern als limitierende Komponente für den Eintritt in die M-Phase auch in die G2/M-Transition und die Mitose selbst involviert. Die Expression des Gens steht dabei unter negativer transkriptioneller Kontrolle und bedarf des Genprodukts selbst, um diese aufzuheben. Da *Ccna2* auch mit der Zellproliferation assoziiert ist, wird es als Proliferationsmarker verwendet und steht beim Menschen mit verschiedenen Krebserkrankungen in Zusammenhang (109). Im späteren Verlauf des Zellzyklus, während der G2- und M-Phase sowie deren Überleitung, interagiert das *Cdc2*-Genprodukt auch mit dem Mitose-spezifischen ***Ccnb2***-Genprodukt Cyclin B2 (108; 110). Letzteres ist damit beispielsweise auch für die Mitose, insbesondere für deren Aufrechterhaltung, essenziell (111) und wird in der Mehrzahl proliferierender Säugerzellen exprimiert (108). Auch das ***Pik1***-Genprodukt ist in die Regulation des Übergangs von der G2-Phase in die M-Phase involviert (112), infolge dessen die beobachtete gestagenbedingte Repression von *Pik1* im Rattenuterus ebenfalls wesentlich zur Hemmung des Zellzyklus beitragen kann. Als Schlüsselkomponente der Zellzyklus-Maschinerie vermittelt es im humanen Endometrium beispielsweise die Zellproliferation und steht unter regulatorischer Kontrolle ovarieller Hormone (112; 113). Aufgrund der Überexpression in proliferierenden Zellen wird *Pik1* beim Menschen auch als Proliferationsmarker herangezogen (114) und beispielsweise mit Tumoren des Reproduktionstrakts in Zusammenhang gebracht (115; 116). Darüber hinaus beeinflusst das entsprechend exprimierte Protein in humanen Zellen die Chromosomenanordnung während der Prometaphase. Dies erfolgt über das Genprodukt von ***Bub1b*** (117), welches G2/M-Phase spezifisch transkribiert wird (118) und ein Spindel-Kontrollpunkt-Protein codiert (119). Außerdem stehen induzierte Genexpressionslevel in humanen Zellen mit einem hohen mitotischen Index in Zusammenhang (120). Die anhand der eigenen Daten beobachtete gestagenbedingte Repression von *Bub1b* im Rattenuterus kann daher über einen vergleichbaren Wirkmechanismus in genomischer Instabilität resultieren (119) und den Zellzyklus hemmen.

Apoptose

Für apoptotische Prozesse bedeutend ist beispielsweise das Gen ***Top2a*** (121). So ist das entsprechend exprimierte Protein als wichtiger Bestandteil der Zellteilungs-Maschinerie nicht nur für die DNA-Replikation während der S-Phase entscheidend, sondern reguliert als Enzym auch die chromosomale Struktur von Zellen und die Trennung der Tochter-DNA-Moleküle während der Mitose. Die Inhibition des Proteins kann so zu Doppelstrangbrüchen der DNA führen, die in Abwesenheit von DNA-Reparaturmechanismen in Apoptose resultieren können (122). Als Proliferationsmarker (123) steht eine Überexpression von *Top2a* beim Menschen auch mit Hyperplasie und Krebserkrankungen des Uterus in Zusammenhang (124). Die am Uterus der Ratte durch alle vier Gestagene detektierte Repression dieses Gens könnte daher über vergleichbare Wirkmechanismen indirekt zu einer Steigerung apoptotischer Ereignisse beitragen. Eine direkte Steigerung ließ sich hingegen infolge der im Rattenuterus beobachteten Deregulierung des Gens ***Dnase113*** vermuten. So führt dessen Induktion in verschiedenen Organen der Ratte beispielsweise dazu, dass dessen Genprodukt, eine Endonuklease, vermehrt DNA spaltet und diese DNA-Degradierung in vermehrter Apoptose resultieren kann (125; 126). Eine Verminderung apoptotischer Ereignisse hingegen kann indirekt aus der bereits erwähnten und beobachteten gestagenbedingten Repression des Gens ***Mmp7*** (102-104)

resultieren. So können hohe Level des entsprechend exprimierten Proteins vermehrt membrangebundene Liganden von Apoptose-Induktoren, wie Fas-Ligand (FasL) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), freisetzen, die beim Menschen über die entsprechende Rezeptorbindung zur Apoptose von Zellen führen (101). Über vergleichbare Wirkmechanismen bei der Ratte werden durch die mit am stärksten und durch alle vier Progestine beobachtete Repression von *Mmp7* im Uterus dieser Spezies apoptotische Ereignisse hingegen vermindert stattfinden.

6.1.2 Charakterisierung spezifischer Substanzeffekte

Spezifische Substanzeffekte am Uterus zeigten sich im Vergleich aller Behandlungsgruppen insbesondere bei den Tieren der hohen MPA-Dosis. So ließen diese bereits in der Histologie abweichende Befunde erkennen, wobei das beobachtete verminderte absolute und relative Organgewicht den atrophischen Zustand der Mucosa im Uterus corpus bzw. Gebärmutterhals reflektierte.

Des Weiteren separierte sich diese Behandlungsgruppe aufgrund des unterschiedlichen Genexpressionsprofils der Uteri auch in der PCA und dem Hierarchischen Clustering deutlich. Die Gene, die dabei am stärksten zur Separierung der Uterus-Proben der hohen MPA-Dosis beitrugen, waren auch unter den Markergenen zur Charakterisierung des gemeinsamen Gestageneffekts am Rattenuterus in der pharmakologisch wirksamen Dosis vertreten. Da dieser hauptsächlich auf den übereinstimmenden Effekten der Progestine am PR und ER beruht, tragen vermutlich die unterschiedlichen Wechselwirkungen von MPA mit weiteren Steroidhormonrezeptoren zur differenzierten Wirkung dieses Progestins bei. So ist MPA im Gegensatz zu R5020 und P4 nicht nur ein potentes Progestin (28; 127) und Antiestrogen (20; 26), sondern weist darüber hinaus auch androgene und starke glucocorticoide Aktivität auf (19; 20; 26-28). Während Progestine daher im Allgemeinen Signale vorrangig über den PR generieren (28), ist im Falle von MPA außerdem die Signalgenerierung über den AR und GR möglich (19; 20). Diese zusätzlichen Bindungen an und unterschiedlichen Affinitäten zu diesen verschiedenen steroidal Rezeptoren (19) führen letztlich dazu, dass sich MPA gewebe- und dosisabhängig hinsichtlich seiner Genregulation von den übrigen Progestinen unterscheidet (28).

Zur näheren Charakterisierung dieser differenzierten Wirkung der hohen MPA-Dosis wurden die ausschließlich innerhalb dieser Behandlungsgruppe im Rattenuterus deregulierten Gene herangezogen. Sie scheinen hinsichtlich der beobachteten MPA-spezifischen Effekte von hoher Relevanz zu sein, konnten jedoch nur vereinzelt dessen zusätzlichen Partialeffekten zugeordnet werden, da es bislang keine umfassenden Daten zur Genregulation durch Progestine gibt (28).

Androgener Partialeffekt

MPA entfaltet im Gegensatz zu R5020 und P4 starke androgene Aktivität am AR (28). Beispielhaft kann hierfür möglicherweise die als am stärksten beobachtete Repression des Gens ***S100g*** im Rattenuterus herangezogen werden. So wird dessen Expression im Uterus der Ratte durch Geschlechtshormone reguliert, wobei E2 zur Induktion führt, Testosteron und P4 hingegen zu geringen Leveln und einer Blockierung dieses E2-Effekts führen (128-130). Die ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis beobachtete deutliche Repression von *S100g* im Rattenuterus, kann daher vermutlich insbesondere auf den

zusätzlichen androgenen Partialeffekt von MPA (28) zurückgeführt werden, verstärkt durch dessen starke gestagene und antiestrogene Wirkung (19; 26). Da das *S100g*-Genprodukt im Rattenuterus als Bindungsprotein der Aufrechterhaltung geringer zytoplasmatischer Calciumionen-Level dient (129), kann die beobachtete Repression des entsprechenden Gens indirekt zu einer Steigerung der verfügbaren intrazellulären Calciumionen-Level und damit der Aktivierung des Protein Kinase C (PKC) Signalwegs führen (131). Über diesen Wirkmechanismus könnte wiederum die beobachtete Induktion des Gens ***Gabra1*** plausibilisiert werden. So steht das entsprechend exprimierte Protein als $\alpha 1$ -Untereinheit des γ -Aminobuttersäure-A-Rezeptors bislang zwar nur mit Schizophrenie beim Menschen in Zusammenhang (132). Dass jedoch eine Aktivierung des PKC-Signalwegs, z.B. infolge der Repression von *S100g*, die Induktion von *Gabra1* in Rattenzellen vermitteln kann (133), lässt eine analoge Regulation infolge der hohen MPA-Dosis im Rattenuterus vermuten. Da *Gabra1* mit deutlichem Abstand am stärksten und ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis induziert wurde, scheint es hinsichtlich der beobachteten MPA-spezifischen Effekte von besonderer Bedeutung zu sein.

Glucocorticoider Partialeffekt

Im Gegensatz zu R5020 und P4 entfaltet MPA auch starke glucocorticoidale Aktivität am GR (19; 20; 26; 27; 30). Über diese GR-vermittelte Wirkung von MPA können Gene verschiedenster biologischer und physiologischer Prozesse, bei der Maus beispielsweise die Immunantwort betreffend, dereguliert werden (134). Als Beispiel hierfür können die Gene ***Cfi*** und ***Ccl11*** herangezogen werden. So gehörten beide nicht nur zu den ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis und am stärksten deregulierten Genen, sondern stehen bei verschiedenen Säugern mit der Vermittlung der zellulären Immunantwort in Zusammenhang (135; 136). Darüber hinaus beinhaltet der *Ccl11*-Promotor bei Mensch und Maus glucocorticoidale Response-Elemente (GRE) (136), was eine GR-vermittelte Genregulation durch MPA im Uterus der Ratte vermuten lässt.

Weitere Partialeffekte

Ein weiteres der am stärksten und ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis im Rattenuterus induzierten Gene ist ***Gal***. Als eines der essenziellen Regulatoren des Reproduktionsprozesses der Ratte (137) induziert das entsprechend exprimierte Protein als parakriner oder autokriner Mediator beispielsweise die myometriale Kontraktilität im Uterus dieser Spezies (138). Vermittelt wird dies dabei durch eine Steigerung intrazellulärer Calciumionen-Level und der daraus resultierenden Aktivierung des PKC-Signalweges (131). Reguliert wird das Gen in der Ratte durch ovarielle Geschlechtshormone und wird so E2-vermittelt induziert (137). Über welchen Mechanismus *Gal* am Rattenuterus in diesem Ausmaß und ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis induziert wurde, kann damit nicht abschließend plausibilisiert werden. So moduliert MPA zwar Effekte über den ER (139), entfaltet hier allerdings analog zu P4 nicht estrogene, sondern antiestrogene Aktivität (20; 26).

6.1.3 Substanzeffekte an ELT 3-Zellen

Im Zuge der Entwicklung von Gestagenen ist die möglichst frühe Beurteilung der pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen potenzieller Arzneimittelkandidaten am Zielorgan von immenser Bedeutung. Um hierfür einen Ansatz zu bieten, wurde ein geeignetes In-vitro-System identifiziert, das eine Prädiktion von Substanzeffekten in vivo ermöglicht. Anschließend wurde anhand der beschriebenen In-vivo-Experimente an Ratten und bekannten Humangenene ein Set an Markergenen zusammengestellt, das den gemeinsamen Effekt von Gestagenen am Uterus charakterisiert. Vor dem Hintergrund begrenzter Substanzverfügbarkeit und Bemühungen, die Anzahl an Tierexperimenten zunehmend zu reduzieren (3R-Prinzip (32)), sollten diese Markergene schließlich hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit im Rahmen eines frühen In-vitro-Screeningsystems zur Charakterisierung gestagener Wirkung am Rattenuterus bewertet werden.

Als geeignetes In-vitro-System erwies sich anhand der eigenen Experimente die ELT 3-Zelllinie, eine aus uterinen Leiomyomen der Eker-Ratte (33) etablierte stabile Zelllinie myometrialen Ursprungs (34). Aufgrund ihrer beschriebenen Eigenschaften, wie der zum normalen Rattenuterus ähnlichen (37-39) Expression nukleärer Rezeptoren (34; 36) und der Ansprechbarkeit auf Progestine (39), kann diese als In-vitro-Modell für mechanistische Untersuchungen hormoneller Wirkungen am Uterus herangezogen werden (34; 35). Die Versuchsbedingungen, die sich in den durchgeführten In-vitro-Experimenten als am zuverlässigsten erwiesen, um eine gestagene Wirkung von Substanzen zu untersuchen, beinhalten die zwölfstündige Inkubation mit einer 10-fach höheren Gestagenkonzentration, als im Transaktivierungsassay ermittelt. Hinsichtlich der Anwendbarkeit der bestätigten Markergene hat sich herausgestellt, dass von den ursprünglich 91 identifizierten Genen *Sgk1*, *Spp1* und *Dnase1l3* die zuverlässigsten zu sein scheinen. Insbesondere das Gen ***Sgk1*** erwies sich dabei als geeigneter Biomarker, dessen Induktion die gestagene Wirkung eines Arzneimittelkandidaten am Uterus der Ratte andeuten kann. Dieses Gen wurde in den ELT 3-Zellen als Einziges nach Inkubation mit allen vier Gestagenen in beiden Konzentrationen und bereits nach sechsstündiger, wie auch nach zwölf- und 24-stündiger Inkubation analog zu den Ergebnissen der In-vivo-Experimente an Ratten induziert. Als bekanntes Humangen wird *Sgk1* im natürlichen Menstruationszyklus reguliert und dessen dreifache Induktion im humanen sekretorischen Endometrium bereits belegt (80). Auch im Rattenuterus wurde das Gen nach Gestagenbehandlung zwei- bis dreifach induziert. Übereinstimmend dazu wurde *Sgk1* im ELT 3-Probenmaterial gestagenabhängig dereguliert und auch hier je nach Progestin und Inkubationsdauer bis zu vierfach induziert. Damit wies die Expression von *Sgk1* von allen Markergenen die beste Vergleichbarkeit zwischen den Spezies Mensch und Ratte sowie den In-vivo- und In-vitro-Testsystemen auf und stellt möglicherweise einen frühen Biomarker gestagener Wirkung am Uterus dar. Des Weiteren scheinen die Gene ***Spp1*** und ***Dnase1l3*** als Biomarker zur Charakterisierung gestagener Effekte am Rattenuterus geeignet zu sein, da diese zusammen mit *Sgk1* unabhängig von der Inkubationsdauer in den ELT 3-Zellen der hohen Konzentration aller Gestagene analog zu den In-vivo-Proben induziert wurden. *Spp1* und *Dnase1l3* wurden anhand der Uterus-Proben der Ratten als gestagene Markergene identifiziert und hier durch alle vier Progestine gemeinsam mit am stärksten induziert. Dass beide auch im ELT 3-Probenmaterial induziert wurden beweist, dass sie durch die Wirkung der untersuchten Gestagene reguliert werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ist hinsichtlich *Spp1* bekannt, dass dessen Expressionslevel im humanen Endometrium während der zweiten Zyklushälfte P4-abhängig,

vermutlich ausschließlich über den PR-B reguliert, stark ansteigen (97). Die in vitro beobachtete Induktion bestätigt dies für ELT 3-Zellen. Für *Dnase1/3* hingegen ist bislang kein Zusammenhang mit einer hormonellen Regulation bekannt. Die beobachtete Induktion in den ELT 3-Zellen lässt jedoch einen gestagenabhängigen Mechanismus vermuten.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen erwiesen sich über *Sgk1*, *Spp1* und *Dnase1/3* hinaus zehn weitere Gene als geeignet, um im Rahmen eines frühen In-vitro-Screeningsystems mit ELT 3-Zellen gestagene Effekte am Rattenuterus anzuzeigen. Diese sind *Ccna2*, *Ccnb2*, *Cdc2*, *Cdkn3*, *Ckap2*, *Hgd*, *Kif2c*, *Plk1*, *Slc16a3* und *Ttk*. Alle 13 Gene wurden im Rattenuterus nicht nur infolge der pharmakologisch wirksamen Gestagendosis von vier Progestinen analog dereguliert und als Markergene gestagener Wirkung identifiziert, sondern auch infolge der pharmakologisch wirksamen Dosis eines weiteren Progestins, LNG. Darüber hinaus wurden sie auch im In-vitro-System nach Inkubation mit den gleichen vier Progestinen analog dereguliert. Somit erwiesen sich diese 13 Gene als geeignet, um im Rahmen eines frühen In-vitro-Screeningsystems mit ELT 3-Zellen wie auch in vivo am Rattenuterus zum Nachweis gestagener Effekte von Testsubstanzen herangezogen werden zu können.

6.1.3.1 Bewertung der Methoden zur Genexpressionsanalyse

Im Rahmen der molekularbiologischen Charakterisierung der Gestagenwirkung am Rattenuterus wurde die Genexpression ausgewählter Markergene mittels zweier unterschiedlicher Methoden, Affymetrix GeneChips® und qRT-PCR im TLDA-Format, verglichen. Der direkte Vergleich dieser unterschiedlichen Technologien erfolgte dabei anhand der gleichen zwölf ausgewählten Uterus-Proben der In-vivo-Experimente nach Behandlung mit der pharmakologisch wirksamen Dosis von R5020, MPA bzw. P4 sowie der Vehikelkontrollen.

Der Methodenvergleich gab zu erkennen, dass teilweise deutliche Unterschiede der Signalintensität gleicher Gene in gleichem Probenmaterial ermittelt wurden, wobei die Richtung der Deregulierung gleicher Gene in fast allen Fällen identisch war. Zurückzuführen sind diese Unterschiede möglicherweise auf falsch-positiv generierte Daten der Affymetrix GeneChips® oder das unterschiedliche Vorgehen beider Methoden zur Prozessierung und Generierung der Daten. Die ermittelten Genexpressionssignale sind daher quantitativ nicht direkt vergleichbar, qualitativ hingegen, bezogen auf die Richtung einer Deregulierung, durchaus. Außerdem könnten Unterschiede in der Amplifizierungseffizienz von Ziel- und Referenzsequenz in der qRT-PCR ursächlich für die beobachteten Differenzen sein. So ist deren identische, nahezu bei 100 % befindliche Amplifizierungseffizienz Voraussetzung für die Auswertung mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung. Dass dies bei den kommerziell erworbenen Gene Expression Assays der TLDAs der Fall ist, wird vom Hersteller zwar angegeben, konnte jedoch unter den eigenen Versuchsbedingungen nur für wenige Gene bestätigt werden (Tabelle 20, 8.14). Der Einsatz von Assays, die dieses Kriterium erfüllen, könnte für die entsprechenden Gene möglicherweise übereinstimmende Ergebnisse liefern. Auch das Vorgehen bei der Auswertung selbst kann zu den gesehenen Unterschieden beitragen. So zeigte die Überprüfung der Stabilität des verwendeten endogenen Kontrollgens *Gapdh*, dass diese deutlich geringer als beispielsweise die der ebenfalls analysierten endogenen Kontrollgene *Actb1*, *Actb2*, *Ppia* oder *Rps18* war (Tabelle 21, 8.15). Da die Berechnung der relativen Expression jedoch auf *Gapdh* beruhte, kann auch dessen instabile Expression zu den beobachteten Unterschieden beitragen. Der

Auswertung von Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR sollten daher mehrere endogene Kontrollgene zu Grunde gelegt werden, um die Variabilität der ermittelten Expression einzelner Gene zu verbessern (52).

Zusammenfassend ist abzuleiten, dass die beiden Methoden Affymetrix GeneChips® und qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Unter der Voraussetzung, dass die für beide Methoden notwendigen Qualitäts- und Auswertekriterien erfüllt werden, sind die Ergebnisse beider Methoden jedoch qualitativ, hinsichtlich der Richtung einer Deregulierung, vergleichbar.

6.1.4 Bewertung speziesübergreifender Markergene

Die Expression ausgewählter Markergene ist zwischen den Spezies Mensch und Ratte vergleichbar. Dies deutete die Untersuchung bekannter Gene an, die den gemeinsamen Effekt von Gestagenen am humanen Uterus charakterisieren und hinsichtlich ihrer Expression im Uterus des Menschen mit der im Uterus der Ratte verglichen wurden. Zwar ließen sich von insgesamt 58 gestagenspezifischen Humangenengen lediglich 20 in das orthologe Rattengen übersetzen, diese wurden jedoch alle auch im Rattenuterus nach Gestagengabe dereguliert (teilweise ungeachtet statistischer Signifikanz). Insbesondere stimmte die Expression der Gene *Sgk1*, *Cyb5b*, *Cxcl14* und *Cldn4* zwischen Mensch und Ratte überein. So wurden diese Markergene im humanen Endometrium während des natürlichen Menstruationszyklus dereguliert und waren auch unter den statistisch signifikant deregulierten Genen im Rattenuterus infolge der Gestagenbehandlung vertreten. Von besonderer Bedeutung scheint hierbei möglicherweise *Cxcl14* zu sein, da dieses sogar zu den durch alle vier Progestine am stärksten deregulierten Genen im Rattenuterus gehörte. Die beste Vergleichbarkeit von Daten über diese Spezies hinaus, auch zwischen den In-vivo- und In-vitro-Testsystemen, bot *Sgk1*. Als gestagenes Markergene im humanen Endometrium identifiziert, wurde dieses Gen nicht nur analog im Uterus der Ratte dereguliert, sondern darüber hinaus auch in entsprechenden In-vitro-Experimenten mit Zelllinien aus Ratten.

6.2 Bewertung unterschiedlicher Methoden der Materialgewinnung zur Analyse gestagenbedingter Genexpressionsprofile der Rattenmammas

Um die Wirkung von Progestinen an der Rattenmammas zu untersuchen, wurde zunächst die Methode der LCM zur Separierung und Analyse spezifischer Zielzellen von Gestagenen aus dem komplexen Mammas-Gewebe etabliert. Anschließend wurde diese Methode mit der Aufarbeitung des entsprechenden Gesamtgewebes verglichen und hinsichtlich ihrer Eignung zur Analyse umfassender gestagenbedingter Genexpressionsprofile der Mammas bewertet. Dazu wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf Genexpressionsebene ermittelt, basierend auf In-vivo-Experimenten an Ratten nach 28-tägiger Behandlung mit dem 10-fachen der pharmakologisch wirksamen Dosis der vier Progestine. Zur Bewertung der Zellspezifität des jeweiligen Probenmaterials wurde die Detektion zielzellspezifischer Gene näher untersucht. Hierbei wurden für bestimmte Probe Sets Abweichungen deutlich. Aufarbeitungsschritte, die für Unterschiede ursächlich sein können, wurden identifiziert und hinsichtlich ihres Einflusses auf das Genexpressionsprofil charakterisiert.

6.2.1 Anwendungsmöglichkeiten der LCM

Nach 28-tägiger Behandlung weiblicher Ratten mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 in der jeweiligen höchsten Dosis spiegelten sich deutliche Unterschiede zwischen den Genexpressionsdaten der Drüsenepithelien und des Gesamtgewebes der Mammae wider. So verdeutlichte das Hierarchische Clustering die eindeutige Separierung der Proben des Gesamtgewebes in Abhängigkeit von der jeweiligen Gestagenbehandlung, während dieser Effekt für die LCM-Proben nicht deutlich wurde. Die Genexpression sämtlicher weiterer Zellpopulationen, wie Fett-, Muskel-, Nerven- und Bindegewebszellen, die die Drüsenepithelien der Rattenmamma umgeben (3), scheint damit erheblich zum umfassenden gestagenbedingten Genexpressionsprofil dieses Organs beizutragen und so einen wesentlichen Beitrag zur Beschreibung gestagener Effekte an der Mamma der Ratte zu leisten.

Hinsichtlich zelltypspezifischer Genexpressionsanalysen an der Rattenmamma, insbesondere zur Untersuchung einzelner Zielgene, scheint die Probenaufarbeitung mittels LCM hingegen sehr gut geeignet zu sein. So wiesen die LCM-Proben überwiegend die Zielpopulationen der Drüsenepithelien auf, was sich anhand wesentlich höherer Expressionslevel spezifischer epithelialer Differenzierungsmarker wie *Wap*, *Lalba*, *Csn1s1* oder *Csn3* (58) in diesen Proben verglichen mit denen des Gesamtgewebes der Mamma verdeutlichte. In diesem Zusammenhang scheinen die angrenzenden Zellen um die Zielzellen herum einen gewissen Verdünnungseffekt in den Proben des Gesamtgewebes zu bewirken und so zielzellspezifische Genexpressionssignale abzuschwächen. Dass jedoch die Expressionslevel dieser spezifischen Differenzierungsmarker in beiden Probentypen gestagenbedingt reguliert und detektiert wurden, belegt die Vergleichbarkeit der beobachteten biologischen Effekte.

Untersuchungen an humanen Mamma- und Rectal-Carzinomen deuten jedoch an, dass die Eignung der LCM im Vergleich zur Aufarbeitung von Gesamtgewebe vom jeweiligen Gewebe und der Fragestellung abhängig ist. So erwies sich zur Analyse von Genexpressionsprofilen epithelialer Tumorzellen der Mamma die Aufarbeitung mittels LCM als besser geeignet, um Daten zur Charakterisierung tumorzellspezifischer Genexpressionsprofile zu liefern (41). Im Falle von Rectal-Carzinomen hingegen wurde dafür die wesentlich schnellere und günstigere Aufarbeitung des Gesamtgewebes als zuverlässiger befunden, da sich hier aufgrund von Unterschieden in mRNA-Mengen der Einfluss von Stromazellen auf das gesamte Genexpressionsprofil geringer erwies als der Einfluss epithelialer Tumorzellen (140).

6.2.2 Sensitivität der Detektion differenziell exprimierter Gene

Hinsichtlich der Detektion differenziell exprimierter Gene scheint die Aufarbeitung mittels LCM im Vergleich zur Aufarbeitung von Gesamtgeweben eine wesentliche Sensitivitätssteigerung zur Folge zu haben. So wurden in den LCM-Proben im Vergleich zu den Gesamtgeweben wesentlich mehr differenziell exprimierte Gene detektiert. Bestärkt wurde dieser Effekt dadurch, dass die meisten dieser Gene zwar auch innerhalb der Proben der entsprechenden amplifizierten und nicht amplifizierten Gesamtgewebe induziert bzw. reprimiert wurden, nicht jedoch die festgelegten Akzeptanzkriterien erfüllten.

Eine solche Sensitivitätssteigerung scheint jedoch von zwei Faktoren abhängig zu sein. So ist sie einerseits vermutlich spezifisch für die mittels LCM isolierten Zellpopulationen (141), da dieser Effekt in den entsprechenden Proben des Gesamtgewebes vergleichsweise

weniger stark ausgeprägt war. Andererseits scheint dieser Effekt auch Folge des Amplifizierungsprozesses zu sein, da in den Proben amplifizierten Gesamtgewebes wesentlich mehr differenziell exprimierte Gene detektiert wurden, als in den gleichen Proben nicht amplifizierten Gesamtgewebes. So konnte bereits anhand von humanen Carzinomzellen gezeigt werden, dass es durch den Prozess der linearen Amplifizierung zu einer Steigerung der Signalintensität von Genen ursprünglich geringer Kopienzahl in der Ausgangs-mRNA und damit zu einer Steigerung der Sensitivität kommt. Während solche Gene in nicht amplifizierten Proben im Hintergrundrauschen untergehen können, werden die gleichen Gene nach Amplifizierung vermutlich detektiert. Eine gesteigerte Anzahl differenziell exprimierter Gene in amplifizierten Proben kann daher Konsequenz geringen Ausgangsmaterials nach Amplifizierung sein. Je geringer dieses dabei ist, um so größer ist die daraus resultierende Datenvariabilität. So steigert die Verminderung der RNA-Menge, die in die Amplifizierung eingesetzt wird, aufgrund der zufälligen Verteilung von Genen geringer Kopienzahl die Wahrscheinlichkeit von Verlusten und Veränderungen der Daten (Monte Carlo-Effekt; (142)) (143).

Im Rahmen der Untersuchung einer solchen Sensitivitätssteigerung wurde außerdem deutlich, dass im Gegensatz zu den Proben des Gesamtgewebes in den LCM-Proben deutlich mehr reprimierte als induzierte Gene detektiert wurden und insbesondere reprimierte Gene in den LCM-Proben auch wesentlich sensitiver detektiert wurden als in den gleichen Proben des nicht amplifizierten Gesamtgewebes. Beobachtet wurde eine derartige sensitivere Detektion insbesondere reprimierter Gene nach Aufarbeitung mittels LCM bereits anhand von humanen Prostata- (144) und Adeno-Carzinomen der Lunge (141) und ist vermutlich auf eine gesteigerte Sensitivität infolge der Analyse spezifischer Zellpopulationen zurückzuführen (141).

Weitere Ursache für die deutlich sensitivere Detektion insbesondere reprimierter Gene in LCM-Proben könnte auch eine verminderte Qualität deren RNA sein. So wurde anhand der aus Hoden adulter Ratten (145) und der aus humanen Mamma-Carzinomen (49) isolierten RNA deutlich, dass die Hybridisierung degradierter aRNA auf Microarrays in einer starken Verzerrung der Genexpressionsprofile der Proben resultiert, was eine Repression von Genen imitieren und zu falsch-positiven Signalen führen kann (145). Um einen solchen Effekt zu verhindern, sollten demzufolge ausschließlich Proben mit einer RIN ≥ 6 analysiert werden (49). In Übereinstimmung damit erfüllten alle eigenen Proben des amplifizierten und nicht amplifizierten Gesamtgewebes dieses Kriterium, während die RIN der analysierten LCM-Proben teilweise darunter lag. Zurückzuführen sind diese Unterschiede vermutlich auf einen negativen Einfluss verschiedener Aufarbeitungsschritte auf die Qualität der isolierten RNA (140). So standen die LCM-Proben in direktem Kontakt mit dem Einbettmedium und froren deutlich langsamer als die Proben zur Aufarbeitung des Gesamtgewebes in flüssigem Stickstoff. Außerdem wurden sie während der Entwässerung in direkten Kontakt mit einer Reihe von Alkoholen und Xylen gebracht. Dass die anschließende Isolierung spezifischer Zellpopulationen mittels LCM bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, kann infolge der Aktivität RNA-degradierender Enzyme (RNasen) in einer verminderten RNA-Qualität resultiert haben (49). Des Weiteren umfassten die notwendigen Aufarbeitungsschritte doppelt so viele Einfrier- und Auftauzyklen wie die Aufarbeitung der Gesamtgewebe, waren insgesamt wesentlich zeitintensiver und lieferten deutlich geringere Mengen an Ausgangs-mRNA, die schließlich linear amplifiziert werden mussten. Letztlich scheint auch der Amplifizierungsprozess einen negativen Einfluss auf die RNA-Qualität zu entfalten, da die Verwendung von Random Primern nachweislich zu einer verminderten Transkriptgröße führt

(140). So können vermutlich derartige Einwirkungen zu einer vergleichsweise verminderten Qualität der isolierten und nachfolgend analysierten RNA und damit der Imitierung der Repression von Genen in den LCM-Proben beigetragen haben.

6.2.3 Bewertung von Einflussfaktoren auf das Genexpressionsprofil

Die Datenanalyse mittels Hierarchischem Clustering verdeutlichte, dass der Prozess der linearen Amplifizierung unabhängig von jeglicher Substanzbehandlung den Hauptunterschied zwischen den einzelnen Proben darstellt. Dass die größten Ähnlichkeiten demzufolge zwischen den Genexpressionsprofilen der LCM-Proben und den entsprechenden amplifizierten Gesamtgeweben bestehen, wurde anhand der detektierten Anzahl gemeinsam deregulierter Gene zwischen den Proben dieser beiden Aufarbeitungsmethoden bestätigt. Zurückzuführen ist dieser Effekt damit vermutlich auf den Prozess der linearen Amplifizierung. So wurde bereits anhand von humanen Rectal-Carzinomen gezeigt, dass die Expressionsprofile von Proben nur schwer unverändert bleiben, wenn die zweite Amplifizierungsrunde unter Verwendung von Random Primern durchgeführt wird (140). Dass neben der Amplifizierung jedoch auch weitere Faktoren das Genexpressionsprofil der Proben beeinflussen, wurde durch die klare untergeordnete Separierung der LCM-Proben von den Proben amplifizierten Gesamtgewebes verdeutlicht. Die hauptsächlichen Unterschiede zwischen den detektierten Expressionsdaten sind demnach der jeweiligen Aufarbeitungsmethode zuzuschreiben.

Ebenso wurde deutlich, dass eine eindeutige Korrelation zwischen der Lokalisation eines Probe Sets innerhalb der entsprechenden Gensequenz und dessen detektierte Expressionsintensität besteht. So wiesen die meisten Probe Sets, die ausschließlich innerhalb der nicht amplifizierten Gesamtgewebe als induziert detektiert wurden, wesentlich geringere Expressionslevel innerhalb der entsprechenden amplifizierten Gesamtgewebe und LCM-Proben auf (ungeachtet statistischer Signifikanz). Eine solche Verzerrung von Expressionsleveln scheint jedoch nicht zufällig stattzufinden, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit insbesondere solche Probe Sets zu betreffen, die zunehmend weit vom 3'-Terminus des jeweiligen Gens lokalisiert sind (141). So wurden für gleiche Probe Sets, die mehr als 600 bp vom jeweiligen 3'-Terminus des Gens entfernt liegen, in den amplifizierten Proben des Gesamtgewebes wesentlich niedrigere Expressionslevel detektiert als in den entsprechenden nicht amplifizierten Proben des Gesamtgewebes. In Übereinstimmung damit wurde anhand von Untersuchungen an humanen Adeno-Carzinomen bereits gezeigt, dass eine Entfernung von Probe Sets über 600 bp zum 3'-Terminus des entsprechenden Gens eine kritische Grenze hinsichtlich Basenpaarverlusten während des Amplifizierungsprozesses darstellt und die Aussagekraft von Expressionsleveln linear amplifizierter Proben beeinträchtigt (141).

Dass dieser Effekt Folge des Amplifizierungsprozesses ist, lassen auch die unterschiedlichen Expressionslevel der vier Probe Sets zur Detektion des epithelzellspezifischen Gens *Crb3* (59) in den LCM-Proben und denen des Gesamtgewebes vermuten. So wurden in den LCM-Proben nicht nur zunehmende Expressionslevel dieser Probe Sets mit deren abnehmender Distanz zum 3'-Terminus des Gens detektiert. Außerdem wurden lediglich für das Probe Set, dessen Distanz zum 3'-Terminus des Gens unter 600 bp liegt, deutlich höhere Expressionslevel in den LCM-Proben als in den entsprechenden Proben des Gesamtgewebes detektiert, während die übrigen mehr als 600 bp entfernt lokalisierten Probe Sets übereinstimmend geringere Expressionslevel

aufwiesen. In diesem Zusammenhang bestärken die eigenen Resultate die Möglichkeit von Verlusten am 5'-Terminus eines Gens während der linearen Amplifizierung, infolge dessen Verluste oder Verminderungen von Expressionssignalen der entsprechenden Probe Sets möglich sind, sofern deren Abstand zum 3'-Terminus des Gens oberhalb der kritischen Grenze von 600 bp liegt (141).

6.2.4 Abschließende Bewertung der LCM

Zusammenfassend lässt sich die Eignung der LCM als gewebspezifisch und abhängig von der jeweiligen Fragestellung bewerten. So erwies sich diese Methode zur Untersuchung umfassender gestagenbedingter Genexpressionsprofile der Rattenmamma im Vergleich zur Aufarbeitung von Gesamtgeweben als weniger geeignet, da neben den Drüsenepithelien auch die übrigen Zelltypen des Mamma-Gewebes einen erheblichen Einfluss auf das gestagenbedingte Genexpressionsprofil dieses Organs haben. Außerdem ist die Aufarbeitung mittels LCM wesentlich zeit- und kostenintensiver als die Aufarbeitung von Gesamtgeweben, liefert jedoch Proben mit hoher zielzellspezifischer Information und sollte daher in Betracht gezogen werden, wann immer eine zelltypspezifische Genexpression für eine umfassende Bewertung erforderlich ist. Berücksichtigt werden muss allerdings eine gewisse Verzerrung des umfassenden Genexpressionsprofils der Proben infolge der notwendigen Aufarbeitungsprozesse, insbesondere den erforderlichen Prozess der linearen Amplifizierung. Da diese unter bestimmten Voraussetzungen in verminderten Expressionsintensitäten bestimmter Gene resultieren können, sollten bei der Analyse von Genexpressionsprofilen basierend auf LCM-Proben ausschließlich relative Genexpressionsveränderungen verglichen (141) bzw. identisch aufgearbeitete Proben korreliert werden. In Bezug zur wesentlichen biologischen Aussage erwies sich diese technische Variabilität jedoch anhand der eigenen Untersuchungen und in Übereinstimmung mit Ergebnissen an humanem Mamma-Gewebe (146) als schwächer.

6.3 Gestagene Wirkung an der Mamma

6.3.1 Charakterisierung gemeinsamer Substanzeffekte

Nach 28-tägiger Behandlung weiblicher Ratten mit PRL, R5020, MPA bzw. P4 in der jeweiligen pharmakologisch wirksamen bzw. dazu 10-fach höheren Dosis wurden an der Mamma weitgehend übereinstimmende histologische Befunde erhoben. So wurden bei den Tieren aller Behandlungsgruppen Sekretion und lobuläre Hyperplasie vergleichbaren Stärkegrads beobachtet. Diese Befunde können als Nachweis der gestagene Wirkung der vier Progestine an der Mamma herangezogen werden, da sie nicht nur in beiden Dosierungen für alle Gestagene übereinstimmend erhoben wurden, sondern auch den erwarteten pharmakodynamischen Effekten dieser Substanzklasse entsprachen. So ähnelte das morphologische Erscheinungsbild der beobachteten Veränderungen der physiologischen Hyperplasie der Mamma während der Lactation.

Ein gemeinsamer Effekt der vier untersuchten Gestagene spiegelte sich auch in den Genexpressionsdaten wider. So bildeten alle Behandlungsgruppen in der PCA ein gemeinsames Cluster, ausgenommen den Mamma-Proben der hohen MPA-Dosis.

Ähnlichkeiten insbesondere zwischen den Genexpressionsprofilen der Mammæ bei der pharmakologisch wirksamen Gestagendosis verdeutlichte auch das Hierarchische Clustering. Die gemeinsame gestagene Wirkung zeigte sich schließlich anhand der identifizierten gemeinsam deregulierten Gene zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Mit insgesamt 14 Genen bei der pharmakologisch wirksamen Dosis, von denen vier auch durch die 10-fach höhere Dosis entsprechend dereguliert wurden, ist die Anzahl jedoch begrenzt. Die wesentlich ausgeprägteren Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzeffekten an der Rattenmamma spiegelten sich in der Deregulierung überwiegend anderer Gene sowie im unterschiedlichen Ausmaß der Induktion bzw. Repression gleicher Gene wider. Sie beruhen vermutlich nicht nur auf den verschiedenen Partialeffekten der Progestine (19), sondern auch auf dem komplexen Zusammenspiel von Steroid- und Peptidhormonen, vornehmlich den lactogenen Hormonen (Prolactin, Insulin, Hydrocortison), auf die die Regulation gewebs- und entwicklungsspezifischer Genexpression in der Säugermamma zurückzuführen ist (4; 7; 58).

Zur näheren Charakterisierung des beobachteten pharmakologischen Effekts der vier Testsubstanzen wurden die gemeinsam deregulierten Gene biologisch plausibilisiert. Dazu wurden sie teilweise speziesübergreifend behandelt. Hierbei zeigte sich, dass die gemeinsame Wirkung der vier Progestine an der Rattenmamma hauptsächlich in der Regulation von Wachstum und Differenzierung besteht, um deren wesentliche physiologische Funktionen zu stimulieren. Wie bei allen Säugern umfassen diese insbesondere die Produktion und Sekretion der Muttermilch (8; 147), infolge dessen beispielsweise die Synthese von Milchproteinen, Milchfetten und immunologischen Agenzien gesteigert wird (9).

Whey acidic protein (Wap)

Hinsichtlich eines gemeinsamen Effekts der untersuchten Progestine an der Rattenmamma scheint insbesondere **Wap** von besonderer Bedeutung zu sein. So wurde dieses Gen nicht nur durch alle vier Gestagene und in beiden Dosierungen induziert, sondern gehörte auch als einziges zu den am stärksten deregulierten Genen aller Behandlungsgruppen. Nahezu ausschließlich in der Mamma exprimiert, codiert *Wap* eines der Hauptmilchproteine von Nagern und repräsentiert einen der molekularen Marker funktioneller Differenzierung der Mamma. Reguliert wird das Gen bei Säugern unter anderem durch das komplexe Zusammenspiel von Steroid- und Peptidhormonen und spiegelt so gewebs- und entwicklungsspezifische Expressionsmuster wider (58; 148). Die Induktion von *Wap* wird dabei über verschiedene Signalwege wie beispielsweise den Jak/Stat-Signalweg vermittelt, der durch die Bindung extrazellulärer Hormone, Zytokine oder Wachstumsfaktoren an den entsprechenden Transmembranrezeptor initiiert werden kann. Die Rezeptorbindung führt zu dessen Homodimerisierung, die wiederum in der Aktivierung assoziierter Jak2-Moleküle resultiert. Folge ist die Phosphorylierung des Rezeptors, die zur Aktivierung von Stat5 führt, welches daraufhin dimerisiert und in den Zellkern transloziert. Dort bindet das Dimer an entsprechende Bindungsstellen der DNA und moduliert die Aktivität der Zielgene wie *Wap* (58; 149-152). Die in der Rattenmamma beobachtete deutliche Induktion des Gens durch alle vier Progestine wurde auf einen analogen Wirkmechanismus zurückgeführt. Dass MPA dabei zur stärksten Induktion von *Wap* geführt hat, beruht vermutlich auf dessen glucocorticoidem Partialeffekt, durch den sich dieses Progestin im Unterschied zu den übrigen drei auszeichnet (19; 20; 26; 27). So kann die Transkription von *Wap* bei der Ratte

zusätzlich gesteigert werden, indem intrazelluläre GR-Dimere hormonegebunden, z.B. an MPA, in den Zellkern translozieren und nach Bindung an GREs zur Modulation der Aktivität der Zielgene beitragen (58; 151; 153-155).

Fatty acid binding protein 3 (Fabp3)

Auch das Gen **Fabp3** wurde in der Rattenmamme durch alle vier Progestine und in beiden Dosierungen induziert, was deren stimulierenden Effekt auf die Milchsynthese und die funktionelle Differenzierung der Mamme andeutet. So codiert *Fabp3* ein fettsäurebindendes Protein und erfüllt als solches vermutlich nicht nur Transport- und Synthesefunktionen von und mit Fettsäuren (156), sondern spielt auch in deren Aufnahme durch die Epithelzellen der Mamme eine Rolle (147). Außerdem fördert es die Synthese von Milchproteinen, wie beispielsweise β -Casein (157; 158). Darüber hinaus konnten für das epithelzellspezifisch exprimierte Protein wachstumshemmende und differenzierungsfördernde Eigenschaften an der Mamme der Maus nachgewiesen werden (157-159). Zur Expression von *Fabp3* ist neben dessen Autostimulation (158) auch dessen hormonelle Regulation beschrieben. So ist bekannt, dass die Transkription und Expression von *Fabp3* bei der Maus durch mammeogene Hormone wie Prolactin, Cortisol oder Aldosteron induziert wird, wobei die Beteiligung weiterer Hormone ungeklärt blieb (159). Die anhand der eigenen Daten beobachtete Induktion des Gens durch alle vier Progestine lässt jedoch eine gestagenbedingte Regulation über vergleichbare Wirkmechanismen in der Mamme der Ratte vermuten. Dass MPA dabei zur stärksten Induktion von *Fabp3* geführt hat, ist vermutlich auf dessen zusätzliche Signalgenerierung über den GR bzw. MR zurückzuführen, über den Cortisol bzw. Aldosteron ihre Wirkung entfalten (160) und so vermutlich zur Induktion von *Fabp3* bei der Maus beitragen (159). Da MPA als einziges der vier Progestine eindeutig starke glucocorticoid Wirkung am GR und keine antimineralcorticoid Wirkung am MR entfaltet (19; 20; 26; 27), wäre die in der Rattenmamme beobachtete Deregulierung von *Fabp3* durch MPA über diese zusätzlichen Partialeffekte zu erklären.

Aquaporin 3 (Aqp3)

Als Bestandteil der Muttermilch fließen Wasser und Glycerol im Zuge der maternalen Milchproduktion aus dem Blut über die basolaterale Membran epithelialer Mammezellen in das Drüsenlumen (147; 161). Dort können sie direkt zur Synthese von Triglyceriden verwendet werden, die den Hauptbestandteil der Milchfette der Muttermilch ausmachen (162). Der dazu notwendige Transport kann durch membranständige Kanalproteine wie Aquaglyceropore ermöglicht werden, die für Wasser ebenso wie für Glycerol permeabel sind (161). So codiert beispielsweise das Gen **Aqp3** ein Aquaglyceroporin, das in der Mamme für die Synthese und / oder Sekretion der Milch wesentlich zu sein scheint und in der Rattenmamme in den sekretorischen und duktalem Epithelzellen vorliegt (163). Über eine gestagenbedingte Regulation von *Aqp3* ist bislang nichts bekannt. Die bei allen vier untersuchten Gestagenen in beiden Dosierungen beobachtete Induktion des Gens in der Rattenmamme lässt dies jedoch vermuten und scheint für deren gemeinsame Wirkung an der Rattenmamme charakteristisch zu sein.

Mucin 1 (Muc1)

Neben der Synthese und Sekretion von Muttermilch scheint ein weiterer wesentlicher gestagener Effekt an der Mamma in der Modulation der Immunantwort zu bestehen. So wurde auch **Muc1** in der Rattenmamma durch alle vier untersuchten Gestagene und in beiden Dosierungen induziert. Dieses Gen codiert ein Mucin, welches eine selektive physikalische Barriere zwischen extrazellulärem Milieu, Plasmamembran und Zellinnerem darstellt und in Zellen der Ratte die Modulation von Immunfunktionen vermittelt. Neben dieser protektiven Funktion spielt das Mucin außerdem eine Rolle in der epithelialen Morphogenese, beispielsweise bei der Maus. So wird es auf der Oberfläche luminaler Epithelzellen exprimiert und korreliert in der Mamma mit dem epithelialen Differenzierungsstatus. Hinsichtlich der Regulation von *Muc1* ist die Stimulation durch lactogene Hormone wie Prolactin und Hydrocortison in der murinen Mamma bekannt (164; 165), während eine direkte PR-abhängige Regulation am Uterus-Epithel verschiedener Säugerspezies nachgewiesen wurde. So wird *Muc1* in humanen Uterus-Epithelien über den PR-B induziert und diese Antwort über den PR-A in humanen wie auch murinen Uterus-Epithelien gleichzeitig antagonisiert (166). Die in der Rattenmamma beobachtete mäßige Induktion von *Muc1* durch alle vier Progestine ist demnach vermutlich auf vergleichbare gestagenvermittelte Wirkmechanismen in dieser Spezies zurückzuführen.

6.3.2 Charakterisierung spezifischer Substanzeffekte

Spezifische Substanzeffekte an der Rattenmamma zeigten sich im Vergleich aller Behandlungsgruppen insbesondere für die Tiere der hohen MPA-Dosis. So ließen diese bereits in der Histologie abweichend von den übrigen Progestinen mehrschichtige Epithelien in den hyperplastischen Lobuli der Mammae erkennen. Dieser Befund, der außerdem bei den Tieren der pharmakologisch wirksamen MPA-Dosis erhoben wurde, nahm hinsichtlich des Stärkegrades dosisabhängig zu und reflektierte einen zusätzlichen Proliferationseffekt dieses Gestagens.

Des Weiteren separierte sich diese Behandlungsgruppe aufgrund des unterschiedlichen Genexpressionsprofils der Mammae auch in der PCA und dem Hierarchischen Clustering deutlich. Die Gene, die dabei am stärksten zur Separierung der Proben der hohen MPA-Dosis und damit ebenso zu dem beobachteten Dosisseffekt dieser Testsubstanz beitrugen, waren teilweise auch unter den am stärksten differenziell exprimierten Genen innerhalb dieser Behandlungsgruppe vertreten. Zurückzuführen sind die spezifischen Substanzeffekte von MPA an der Rattenmamma vermutlich hauptsächlich auf dessen zusätzlichen androgenen und glucocorticoiden Partialeffekt, durch den sich dieses Progestin im Vergleich zu den übrigen drei auszeichnet (19; 20; 26-28). Die ausschließlich nach Behandlung mit der hohen MPA-Dosis deregulierten Gene scheinen daher hinsichtlich dessen beobachteter spezifischer und dosisabhängiger Wirkung an der Rattenmamma von hoher Relevanz zu sein und können zur näheren Charakterisierung relevanter Wirkmechanismen dieses Gestagens herangezogen werden.

Androgener Partialeffekt

Für den androgenen Partialeffekt von MPA können vermutlich **Prol1** und **Vcsa1** beispielhaft herangezogen werden, die beide zu den ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis in der Rattenmamma deregulierten Genen gehörten. Da *Prol1* das mit deutlichem Abstand

am stärksten induzierte Gen war, scheint es hinsichtlich des im Vergleich zu den übrigen Gestagenen spezifischen Substanz- und Dosiseffekts von MPA von wesentlicher Bedeutung zu sein. Als Mitglied der Opiorphin-Genfamilie stellt *Pro1* das humane Analogon zum Gen *Vcsa1* der Ratte dar, deren Genprodukte beide in der männlichen Sexualfunktion eine wesentliche Rolle spielen und hinsichtlich ihrer Expression mit den endogenen Androgenleveln korrelieren (167-169). So wird *Vcsa1* durch das Androgen Testosteron in glatten Muskelzellen von Drüsengewebe der Ratte induziert (169; 170), was eine analoge Regulation im Drüsengewebe der Mamma aufgrund des androgenen Partialeffekts von MPA vermuten lässt. Darüber hinaus wurden Gensequenzen identifiziert, die eine Bindung und damit Regulation von *Vcsa1* über den AR, GR und PR ermöglichen (171). Da sich MPA durch androgene Wirkung am AR und starke glucocorticoide Wirkung am GR von den übrigen drei Progestinen unterscheidet (19; 20; 26-28) und im Vergleich zu diesen außerdem eine deutlich höhere Bindungsaffinität zum PR aufweist (19; 20), wäre die ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis beobachtete Induktion von *Vcsa1* und *Pro1* über diese Partialeffekte zu erklären.

Glucocorticoider Partialeffekt

Ein weiteres Gen, das zur Charakterisierung der spezifischen und dosisabhängigen Wirkung von MPA an der Mamma herangezogen werden kann, ist ***Cyp2b1***, da auch dieses zu den ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis deregulierten Genen gehörte. Es codiert ein Enzym, das im oxidativen Metabolismus endogener und exogener Substanzen eine wesentliche Rolle spielt und so beispielsweise zur Eliminierung von Xenobiotika beiträgt (172). Hinsichtlich der Expression von *Cyp2b1* konnte bereits bei der Maus gezeigt werden, dass der GR für dessen Induktion durch Steroide essenziell ist (173; 174). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf GREs, die in der entsprechenden Gensequenz der Maus wie auch der Ratte bereits nachgewiesen werden konnten und damit die Beteiligung des GR an der Genregulation von *Cyp2b1* in diesen Spezies vermuten lassen (175). Die ausschließlich durch MPA beobachtete Induktion dieses Gens ist daher vermutlich durch dessen zusätzlichen glucocorticoiden Partialeffekt über den GR zu erklären (19; 20; 26; 27).

Auch die Repression des Gens ***Bdnf*** scheint für die Wirkung von MPA an der Rattenmamma charakteristisch zu sein, da es ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis dereguliert wurde. Dieses Gen codiert ein Protein der Neurotrophin-Familie, das beispielsweise die Viabilität und Morphologie von Neuronen sowie die Gedächtnisfunktion beeinflusst und im Hippocampus der Ratte hoch exprimiert vorliegt. Dass eine Repression von *Bdnf* im Gehirn von Ratten infolge der Aktivierung des GR und MR bereits gezeigt werden konnte (176; 177), lässt einen analogen Wirkmechanismus in deren Mamma vermuten. So entfaltet MPA als einziges der vier untersuchten Progestine eindeutig starke glucocorticoide Wirkung am GR und keine antimineralcorticoide Wirkung am MR (19; 20; 26; 27; 127). In Übereinstimmung damit wäre die beobachtete Repression von *Bdnf* in der Rattenmamma ausschließlich durch MPA auf diese Partialeffekte zurückzuführen, wenn auch zum Regulationsmechanismus von *Bdnf* in der Mamma nichts bekannt ist und diese Gen bislang lediglich mit Gehirnfunktionen in Zusammenhang steht (176).

6.3.2.1 Charakterisierung spezifischer Proliferationseffekte

In der Histologie wurden bei den Tieren der pharmakologisch wirksamen und 10-fach höheren MPA-Dosis abweichend von den übrigen drei Progestinen mehrschichtige Epithelien in den hyperplastischen Lobuli der Mammae beobachtet. Immunhistochemisch konnte dieser Befund bestätigt und visualisiert werden, der einerseits den proliferativen Zustand des Organs infolge von Gestageneinwirkung reflektierte (4), hinsichtlich der Mehrschichtigkeit der Epithelien jedoch einen wesentlichen Unterschied zu den anderen drei untersuchten Progestinen darstellte. Außerdem wurde deutlich, dass infolge der Proliferation der Drüsenepithelien auch der OXTR vermehrt im Mamma-Gewebe vorlag, der hier nicht nur die Kontraktion myoepithelialer Zellen zur Milchsekretion vermittelt, sondern beim Menschen auch mit der Regulation proliferativer Effekte in Zusammenhang steht (178). So ist dieser Rezeptor in normalem humanen Mamma-Gewebe zwar im Wesentlichen in der Zellmembran und dem Zytoplasma basaler Myoepithelzellen lokalisiert. In benignen Läsionen mit epithelialer Hyperplasie konnte er hingegen analog zu den eigenen Ergebnissen an der Mamma der Ratte zusätzlich zum Myoepithel auch im mehrschichtig angeordneten Epithel nachgewiesen werden (56). Die zusätzliche Proliferation der Drüsenepithelien ausschließlich nach MPA-Behandlung könnte daher als möglicher Hinweis auf ein enthemmtes Wachstum gedeutet werden und sollte vor diesem Hintergrund näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Genexpressionsprofile der Mammae aller gestagenbehandelten Tiere auf Grundlage ausgewählter Tumormarkergene verglichen, die mit der Tumorigenese sowie überwiegend auch mit der Proliferation und / oder Differenzierung der Mamma verschiedener Säugerspezies in Zusammenhang stehen.

Im Wesentlichen veranschaulichte diese Analyse einen gemeinsamen Proliferationseffekt aller vier untersuchten Progestine. Analog zu den histologischen Beobachtungen ließ sich jedoch auch anhand der Genexpressionsprofile der Mammae erkennen, dass die Tiere der hohen MPA-Dosis hinsichtlich der ausgewählten Tumormarkergene leichte Unterschiede zu denen der übrigen drei Progestine aufwiesen. Zur näheren Charakterisierung dieses beobachteten spezifischen Effekts der hohen MPA-Dosis wurde daher die Expression der zu Grunde gelegten Tumormarkergene in den Mammae dieser Behandlungsgruppe herangezogen.

Jak/Stat-Signalweg

Hinsichtlich des an der Rattenmamma beobachteten zusätzlichen Proliferationseffekts von MPA ist möglicherweise die Signalgenerierung über den Jak/Stat-Signalweg von besonderer Bedeutung. So wird über diesen nicht nur die Synthese der Hauptmilchproteine in der Säugermamma gesteigert (151), sondern auch die epitheliale Proliferation und alveoläre Differenzierung reguliert. Infolge dessen kann dieser Signalweg bei Deregulation auch in die Tumorigenese der Mamma involviert sein (149). In diesem Zusammenhang spielen insbesondere die Gene **Jak2**, **Stat3**, **Stat5a** sowie **Stat5b** eine wesentliche Rolle. Sie codieren zentrale Signalmoleküle der Jak/Stat-Signaltransduktions-Kaskade (150; 153; 179), sind unter den ausgewählten Tumormarkergenen vertreten und wurden teilweise nur bei den Tieren der hohen MPA-Dosis in der Mamma dereguliert.

Beispielsweise wurde **Stat5a** ausschließlich durch die hohe MPA-Dosis induziert, was in einer gesteigerten Jak/Stat-Signalgenerierung resultieren kann. So bindet das Stat5-Dimer im Zellkern an die entsprechende Bindungsstelle der DNA, moduliert dadurch die Aktivität verschiedener Zielgene, wie auch **Stat5** selbst (149-151), und stimuliert so die zelluläre

Proliferation und Differenzierung in der Säugermamma (148). Da die Aktivität dieses Moleküls einen kritischen Faktor für die Epithelzellproliferation in der Mamma darstellt, kann bereits eine latente Deregulierung von *Stat5* das Gewebe zur Tumorigenese prädisponieren (149).

Darüber hinaus trägt vermutlich auch der glucocorticoide Partialeffekt von MPA zu einer gesteigerten Jak/Stat-Signalgenerierung in der Mamma und damit deren Proliferation bei. So stellt der ligandgebundene GR einen zusätzlichen stimulierenden Faktor des Jak/Stat-Signalwegs dar, der mit Stat3 oder Stat5 synergistisch die Transkription von Zielgenen regulieren kann (153). Da MPA im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Progestinen als einziges glucocorticoide Aktivität am GR entfaltet und diesen Rezeptor mit höchster Affinität bindet (19; 20; 26; 27), könnte die beobachtete Induktion von *Stat5a* ausschließlich durch MPA sowie dessen beobachteter zusätzlicher Proliferationseffekt vermutlich auf diesen weiteren Stimulus zurückgeführt werden.

Wnt-Signalweg

Auch der Wnt-Signalweg erfüllt regulatorische Schlüsselfunktion zur Kontrolle der Embryonalentwicklung wie auch der epithelialen Proliferation und Differenzierung der Säugermamma und kann daher bei Deregulation in deren Tumorigenese involviert sein (10; 180). In diesem Zusammenhang spielen insbesondere die Gene ***Ccnd1***, ***Egfr***, ***Fzd7***, ***Mmp7***, ***Myc*** und ***Wnt2b*** eine bedeutende Rolle. So codieren diese zentrale Signalmoleküle bzw. Zielgene der Wnt-Signaltransduktions-Kaskade (10; 181), sind unter den ausgewählten Tumormarkergenen vertreten und wurden teilweise ausschließlich bei den Tieren der hohen MPA-Dosis in der Mamma dereguliert.

Kontrolliert wird die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Wnt-Proteine. Induziert durch P4 binden diese extrazellulär an entsprechende Rezeptoren, was in der Phosphorylierung eines zytoplasmatischen Mediator-Proteins und der Inhibition der Serin/Threonin-Kinase GSK3 β resultiert. Folge dieser Inaktivierung ist die zytoplasmatische Akkumulation der Schlüsselkomponente des Wnt-Signalwegs, β -Catenin, die daraufhin in den Zellkern transloziert und infolge der Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren in der Dislokation von Transkriptionsrepressoren resultiert. Nach Rekrutierung von Coaktivatoren führt diese Aktivierung des Wnt-Signalwegs letztlich zur Induktion von Zielgenen, wie *Ccnd1*, *Egfr*, *Fzd7*, *Mmp7* und *Myc*, die Regulatoren von Wachstum und Differenzierung der Säugermamma codieren (10; 181; 182).

Dass der beobachtete zusätzliche Proliferationseffekt von MPA möglicherweise auch über die Wnt-Signalgenerierung vermittelt wird, lässt sich aufgrund der beobachteten Deregulation von *Fzd7* und *Mmp7* sowie *Ccnd1* und *Egfr* vermuten. So wurden lediglich erstere erwartungsgemäß induziert (181), während letztere reprimiert wurden. Dass *Fzd7* und *Mmp7* außerdem nur durch die hohe MPA-Dosis in der Mamma dereguliert wurden und *Ccnd1* durch die übrigen Progestine teilweise induziert wurde, kann eine differenzielle Modulation der Wnt-Signalgenerierung durch MPA andeuten und in einem unterschiedlichen Proliferationsstimulus durch dieses Progestin resultieren. Zurückzuführen wäre dieser dabei beispielsweise auf die resultierenden hohen Level des *Mmp7*-Genprodukts, infolge derer IGFbPs vermehrt degradiert werden. Damit steigt die Bioverfügbarkeit von IGFs, was letztlich zur Stimulation der Zellproliferation führen kann (101). Ebenso sind für diese differenzielle Deregulation vermutlich der androgene und glucocorticoide Partialeffekt ursächlich, durch die sich im Vergleich zu den übrigen drei untersuchten Progestinen nur

MPA auszeichnet (19; 20; 26; 27). So reprimieren sowohl der hormonegebundene AR als auch GR die Wnt-Signalgenerierung und können die beobachtete Repression von Zielgenen wie *Ccnd1* bedingen. Als Regulator der G0/G1-Zellzyklusprogression resultieren verminderte Level des entsprechend exprimierten Proteins Cyclin D1 zwar in der Hemmung der Proliferation (182), dass MPA in der Rattenmamma jedoch zu einer gesteigerten Proliferation der Epithelzellen geführt hat und sich durch die Art der Modulation der Zellproliferation deutlich von übrigen drei Progestinen unterscheidet, kann möglicherweise als Hinweis auf relevante Wirkmechanismen für die beobachteten Unterschiede herangezogen werden.

6.4 Abschließende Diskussion

Nach 28-tägiger Behandlung weiblicher Ratten mit vier synthetischen Gestagenen in der jeweiligen pharmakologisch wirksamen bzw. dazu 10-fach höheren Dosis sollten die Wirkprofile dieser Progestine in den Zielorganen Uterus und Mamma charakterisiert werden. Dazu wurden konventionelle toxikologische Parameter wie Organgewichte und Histologie sowie molekularbiologische Untersuchungen herangezogen.

In beiden Zielorganen spiegelten sich die mittels konventioneller Parameter erhobenen gestagenen Effekte in den Genexpressionsdaten wider. Dabei ermöglichten die weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen zusätzlich die biologische Interpretation der beobachteten Effekte sowie die Ableitung relevanter Wirkmechanismen der vier Progestine. So zeigte sich histologisch, wie auch auf Genexpressionsebene, dass die synthetischen Gestagene PRL, R5020, MPA und P4 in der jeweiligen pharmakologisch wirksamen Dosis gleichartige Effekte am entsprechenden Zielorgan der Ratte entfalteten, die mit den erwarteten physiologischen Effekten übereinstimmten. Auf Grundlage der untersuchten Genexpressionsprofile konnten schließlich spezielle Markergene identifiziert werden, die die gemeinsame Wirkung der vier Gestagene am entsprechenden Zielorgan charakterisieren und zur Ableitung relevanter Wirkmechanismen herangezogen werden konnten. So wurde am Uterus ein inhibitorischer Effekt auf den Zellzyklus deutlich, infolge dessen die E2-vermittelte Proliferation vermindert wurde. Vorgänge zur Differenzierung und Dezidualisierung wurden gesteigert, um den Uterus letztlich auf eine potenzielle Implantation vorzubereiten. An der Mamma hingegen wurde histologisch ein stimulativer Effekt deutlich, dessen Mechanismus ebenfalls anhand der Genexpressionsprofile näher charakterisiert werden konnte. Demnach wurden Wachstum und Differenzierung induziert, um insbesondere die Produktion und Sekretion der Muttermilch zu steigern und die Mamma so auf ihre wesentliche physiologische Funktion vorzubereiten, die Ernährung der Nachkommen (8).

Darüber hinaus konnten anhand der Genexpressionsprofile der Rattenuteri Korrelationen zwischen In-vivo- und In-vitro-Testsystemen untersucht werden. So wurde zum Einen die Expression bekannter Humangene, die den Effekt von Gestagenen am humanen Uterus charakterisieren, mit der im Rattenuterus verglichen. In diesem Zusammenhang wies das Gen *Sgk1* die besten Übereinstimmungen zwischen den Spezies Mensch und Ratte auf. Durch die anschließende Anwendung der identifizierten Markergene auf ein geeignetes In-vitro-Testsystem, uterine Leiomyomzellen der Ratte, wurde schließlich eine Korrelation zwischen der Ratte als In-vivo- und diesem In-vitro-Testsystem aufgezeigt, wodurch sich die Möglichkeit zur frühen Prädiktion der pharmakologischen Wirkungen neuer Gestagene am Rattenuterus in vivo bietet. So erwiesen sich 13 der in den In-vivo-Experimenten ermittelten Gene, insbesondere die Gene *Sgk1*, *Spp1* und *Dnase1l3*, als geeignet, um im Rahmen eines

frühen In-vitro-Screeningsystems mit ELT 3-Zellen zum Nachweis gestagener Effekte von Testsubstanzen am Rattenuterus herangezogen werden zu können.

Einen weiteren Beitrag zur pharmakologisch-toxikologischen Charakterisierung der vier Gestagene lieferten die molekularbiologischen Untersuchungen durch die Möglichkeit der Identifizierung von Genen, die für individuelle Effekte der Testsubstanzen charakteristisch waren. So wurde histologisch identifiziert, dass die hohe MPA-Dosis neben den gemeinsamen Gestageneffekten im Vergleich zu den übrigen Progestinen auch spezifische Substanzeffekte an Uterus und Mamma der Ratte entfaltet hat. Dass diese in beiden Zielorganen vermutlich auf den androgenen und glucocorticoiden Partialeffekt ausschließlich dieses Progestins (19; 20; 26-28) zurückzuführen waren, konnte dabei anhand der untersuchten Genexpressionsprofile abgeleitet werden. So wurde der an der Mamma beobachtete zusätzliche Proliferationseffekt nach MPA-Behandlung vermutlich über eine modulierte Stimulation des Jak-Stat- und /oder Wnt-Signalwegs vermittelt. Die immunhistochemischen Untersuchungen dienten letztlich zur Verdeutlichung, dass dieser zusätzliche Proliferationsstimulus bei den Tieren der hohen MPA-Dosis vorrangig auf die Epithelzellschicht der Mamma beschränkt war.

Um beispielsweise derartige zellspezifische Effekte an der Mamma eingehender untersuchen und relevante Wirkmechanismen identifizieren zu können, wurde die LCM etabliert. Diese Methode erwies sich zur Isolierung und Analysierung ausgewählter Zellpopulationen im Vergleich zur Analyse des Gesamtgewebes zwar als weniger geeignet, da für die umfassende Charakterisierung der Gestagenwirkung an der Mamma auch das umliegende Gewebe von Bedeutung ist. Für Fragestellungen hinsichtlich einer zelltypspezifischen Genexpression erwies sich die LCM jedoch als sehr gut geeignet.

Die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen ergänzten damit den Informationsgehalt der konventionellen toxikologischen Parameter wesentlich. Durch zusätzliche Informationen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise der vier Testsubstanzen konnten sie einen zusätzlichen Beitrag zu deren pharmakologisch-toxikologischer Charakterisierung leisten.

7 Literaturverzeichnis

1. Spencer TE, Hayashi K, Hu J, Carpenter KD. Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr.Top.Dev.Biol.* 2005;68:85-122.
2. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol.Pathol.* 2008;36:375-384.
3. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2000;5:165-185.
4. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr.Rev.* 1997;18:502-519.
5. Boorman GA, Wilson JTh, Van Zwieten MJ, Eustis SL. Mammary Gland. In: Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, Jr., MacKenzie WF, eds. *Pathology of the Fischer Rat.* San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, Inc., 1990:295-313.
6. Reece RP. Mammary Gland Development and Function. In: Velardo JT, ed. *The Endocrinology of Reproduction.* New York: Oxford Univ. Press: 1958:213-240.
7. Hennighausen L, Robinson GW. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev.Cell* 2001;1:467-475.
8. Imagawa W, Yang J, Guzman R, Nandi S. Control of Mammary Gland Development. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, Ltd., 1994:1033-1063.
9. Medina D. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 1996;1:5-19.
10. Lamb R, Harrison H, Clarke RB. Mammary development, carcinomas and progesterone: role of Wnt signalling. *Ernst.Schering.Found.Symp.Proc.* 2007;1-23.
11. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 1998;19:253-286.
12. Lydon JP, Demayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 1995;9:2266-2278.
13. Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M. Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2000;5:211-225.
14. Chan L, O'Malley BW. Mechanism of action of the sex steroid hormones (first of three parts). *N.Engl.J.Med.* 1976;294:1322-1328.

15. Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R, Lam EW. Steroid receptor action. *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* 2004;18:265-283.
16. Mulac-Jericevic B, Lydon JP, Demayo FJ, Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:9744-9749.
17. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Arnett-Mansfield R. Progesterone signaling in mammary gland development. *Ernst.Schering.Found.Symp.Proc.* 2007;45-54.
18. Ilenchuk TT, Walters MR. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [3H]R5020 photoaffinity labeling: evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 1987;120:1449-1456.
19. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 2003;46 Suppl 1:S7-S16
20. Winneker RC, Bitran D, Zhang Z. The preclinical biology of a new potent and selective progestin: trimegestone. *Steroids* 2003;68:915-920.
21. Sitruk-Ware R. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 2008;61:151-157.
22. Nickisch K, Beier S, Bittler D, Elger W, Laurent H, Losert W, Nishino Y, Schillinger E, Wiechert R. Aldosterone antagonists. 4. Synthesis and activities of steroidal 6,6-ethylene-15,16-methylene 17-spirolactones. *J.Med.Chem.* 1991;34:2464-2468.
23. Birkhäuser M. Klinische Bedeutung von gestagenen Partialwirkungen. *Gynäkologische Endokrinologie* 2006;4:52-64.
24. Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzemeier KH. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. *Contraception* 1996;54:243-251.
25. Sitruk-Ware R. New progestogens: a review of their effects in perimenopausal and postmenopausal women. *Drugs Aging* 2004;21:865-883.
26. Bray JD, Jelinsky S, Ghatge R, Bray JA, Tunkey C, Saraf K, Jacobsen BM, Richer JK, Brown EL, Winneker RC, Horwitz KB, Lyttle CR. Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem.Mol Biol.* 2005;97:328-341.
27. Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. Effects of drospirenone on cardiovascular markers in human aortic endothelial cells. *Climacteric.* 2009;12:80-87.
28. Ghatge RP, Jacobsen BM, Schittone SA, Horwitz KB. The progestational and androgenic properties of medroxyprogesterone acetate: gene regulatory overlap with dihydrotestosterone in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R1036-R1050
29. Schneider W, Gauthier Y, Shyamala G. Effects of progesterone, promegestone and RU 486 on glucocorticoid receptor levels in primary cultures of mouse mammary epithelial cells. *J.Steroid Biochem.* 1988;29:599-604.

30. Guthrie GP, Jr., John WJ. The in vivo glucocorticoid and antiglucocorticoid actions of medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 1980;107:1393-1396.
31. Otto C, Fuchs I, Altmann H, Klewer M, Walter A, Prella K, Vonk R, Fritzscheier KH. Comparative analysis of the uterine and mammary gland effects of drospirenone and medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 2008;
32. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London: 1959.
33. Eker R, Mossige J. A Dominant Gene for Renal Adenomas in the Rat. *Nature* 1961;189:858-859.
34. Howe SR, Gottardis MM, Everitt JI, Goldsworthy TL, Wolf DC, Walker C. Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Establishment and characterization of tumor-derived cell lines. *Am.J.Pathol.* 1995;146:1568-1579.
35. Walker CL. Role of hormonal and reproductive factors in the etiology and treatment of uterine leiomyoma. *Recent Prog.Horm.Res.* 2002;57:277-294.
36. Howe SR, Everitt JI, Gottardis MM, Walker C. Estrogen/antiestrogen responsiveness in an in vivo/in vitro model for myometrial tumorigenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1995;761:373-375.
37. Han Z, Kokkonen GC, Roth GS. Effect of aging on populations of estrogen receptor-containing cells in the rat uterus. *Exp.Cell Res.* 1989;180:234-242.
38. Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 1993;132:2371-2379.
39. Hodges LC, Houston KD, Hunter DS, Fuchs-Young R, Zhang Z, Wineker RC, Walker CL. Transdominant suppression of estrogen receptor signaling by progesterone receptor ligands in uterine leiomyoma cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 2002;196:11-20.
40. Everitt JI, Wolf DC, Howe SR, Goldsworthy TL, Walker C. Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Clinical and pathological features. *Am.J.Pathol.* 1995;146:1556-1567.
41. Yang F, Foekens JA, Yu J, Sieuwerts AM, Timmermans M, Klijn JG, Atkins D, Wang Y, Jiang Y. Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways. *Oncogene* 2006;25:1413-1419.
42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* 1983;65:55-63.
43. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998-1001.
44. Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 2000;53:666-672.

45. Morrogh M, Olvera N, Bogomolny F, Borgen PI, King TA. Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. *Biotechniques* 2007;43:41-2, 44, 46.
46. Goldstein SR, McQueen PG, Bonner RF. Thermal modeling of laser capture microdissection. *Appl.Opt.* 1998;37:7378-7391.
47. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997;278:1481,1483.
48. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC.Mol Biol.* 2006;7:3
49. Strand C, Enell J, Hedenfalk I, Ferno M. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis--a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC.Mol.Biol.* 2007;8:38
50. Warrington JA, Dee S, Trulson M. *Microarray Biochip Technology*. Eaton Publishing Company/Biotechniques Books, 2000.
51. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.* 1996;14:1675-1680.
52. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0034
53. R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing.* (2.9.0). 2009. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL.
54. Kohl, M. *SLqPCR: Functions for analysis of real-time quantitative PCR data at SIRS-Lab GmbH.* 2007. R package, SIRS-Lab GmbH.Jena.
55. Spiess AN, Feig C, Ritz C. Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry. *BMC.Bioinformatics.* 2008;9:221
56. Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A. Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast. *Am.J.Pathol.* 1996;148:1895-1903.
57. Lehr, S. and Hilpert, J. Molecular characterization and classification (levonorgestrel vs. mid luteal phase of a natural menstrual cycle) of endometrial tissue from premenopausal healthy volunteers. Biomarker Report No. A25327, 1-112. 26-11-2007. Bayer Schering Pharma AG, Global Drug Discovery Statistics.
58. Rosen JM, Wyszomierski SL, Hadsell D. Regulation of milk protein gene expression. *Annu.Rev.Nutr.* 1999;19:407-436.

59. Makarova O, Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 2003;302:21-29.
60. Beekman JM, Reischl J, Henderson D, Bauer D, Ternes R, Pena C, Lathia C, Heubach JF. Recovery of microarray-quality RNA from frozen EDTA blood samples. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 2009;59:44-49.
61. Sternlicht MD, Sunnarborg SW. The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia*. 2008;13:181-194.
62. McBryan J, Howlin J, Napoletano S, Martin F. Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia*. 2008;13:159-169.
63. Jin R, Huang J, Tan PH, Bay BH. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathol.Oncol.Res*. 2004;10:74-79.
64. Wang M, Yu B, Westerlind K, Strange R, Khan G, Patil D, Boeneman K, Hilakivi-Clarke L. Prepubertal physical activity up-regulates estrogen receptor beta, BRCA1 and p53 mRNA expression in the rat mammary gland. *Breast Cancer Res.Treat*. 2009;115:213-220.
65. Visvader JE, Lindeman GJ. Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int.J.Biochem.Cell Biol*. 2003;35:1034-1051.
66. Lange CA, Yee D. Progesterone and breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)*. 2008;4:151-162.
67. Lazar H, Baltzer A, Gimmi C, Marti A, Jaggi R. Over-expression of erbB-2/neu is paralleled by inhibition of mouse-mammary-epithelial-cell differentiation and developmental apoptosis. *Int.J.Cancer* 2000;85:578-583.
68. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol.Med*. 2002;8:S62-S67
69. Lewis MT. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Res*. 2000;2:158-169.
70. Lin CQ, Singh J, Murata K, Itahana Y, Parrinello S, Liang SH, Gillett CE, Campisi J, Desprez PY. A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2000;60:1332-1340.
71. Shan L, Yu M, Qiu C, Snyderwine EG. Id4 regulates mammary epithelial cell growth and differentiation and is overexpressed in rat mammary gland carcinomas. *Am.J.Pathol*. 2003;163:2495-2502.
72. Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, Kurek R, Neubauer HJ. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res*. 2006;66:5278-5286.
73. Nass SJ, Dickson RB. Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res.Treat*. 1997;44:1-22.

74. Lynch CC, Vargo-Gogola T, Martin MD, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor. *Cancer Res.* 2007;67:6760-6767.
75. Wang J, Jarrett J, Huang CC, Satcher RL, Jr., Levenson AS. Identification of estrogen-responsive genes involved in breast cancer metastases to the bone. *Clin Exp. Metastasis* 2007;24:411-422.
76. Wagner KU, Rui H. Jak2/Stat5 signaling in mammaryogenesis, breast cancer initiation and progression. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 2008;13:93-103.
77. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb. Haemost.* 2004;91:450-456.
78. Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 2001;6:419-429.
79. Li X, Lonard DM, O'Malley BW. A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mech. Ageing Dev.* 2004;125:669-678.
80. Feroze-Zaidi F, Fusi L, Takano M, Higham J, Salker MS, Goto T, Edassery S, Klingel K, Boini KM, Palmada M, Kamps R, Groothuis PG, Lam EW, Smith SK, Lang F, Sharkey AM, Brosens JJ. Role and regulation of the serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in fertile and infertile human endometrium. *Endocrinology* 2007;148:5020-5029.
81. Brosens JJ, Gellersen B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J. Mol. Endocrinol.* 2006;36:389-398.
82. Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev.* 2006;86:1151-1178.
83. Lundgren DW, Moore JJ, Chang SM, Collins PL, Chang AS. Gestational changes in the uterine expression of an inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997;216:57-64.
84. Mitchell BF, Fang X, Wong S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? *Rev. Reprod.* 1998;3:113-122.
85. Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 1992;68:809-818.
86. Trezise AE, Linder CC, Grieger D, Thompson EW, Meunier H, Griswold MD, Buchwald M. CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. *Nat. Genet.* 1993;3:157-164.
87. Rochwerger L, Buchwald M. Stimulation of the cystic fibrosis transmembrane regulator expression by estrogen in vivo. *Endocrinology* 1993;133:921-930.
88. Wright AF, Rudan I, Hastie ND, Campbell H. A 'complexity' of urate transporters. *Kidney Int.* 2010;

89. Ishibashi K, Matsuzaki T, Takata K, Imai M. Identification of a new member of type I Na/phosphate co-transporter in the rat kidney. *Nephron Physiol* 2003;94:10-18.
90. Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Miller J, Ferrer K, Bulun SE. Stromal PRs mediate induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrial epithelium: a paracrine mechanism for inactivation of E2. *Mol.Endocrinol.* 2001;15:2093-2105.
91. Jeong JW, Lee KY, Kwak I, White LD, Hilsenbeck SG, Lydon JP, Demayo FJ. Identification of murine uterine genes regulated in a ligand-dependent manner by the progesterone receptor. *Endocrinology* 2005;146:3490-3505.
92. Lutz JD, Dixit V, Yeung CK, Dickmann LJ, Zelter A, Thatcher JE, Nelson WL, Isoherranen N. Expression and functional characterization of cytochrome P450 26A1, a retinoic acid hydroxylase. *Biochem.Pharmacol.* 2009;77:258-268.
93. Baldwin RM, Jewell WT, Fanucchi MV, Plopper CG, Buckpitt AR. Comparison of pulmonary/nasal CYP2F expression levels in rodents and rhesus macaque. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004;309:127-136.
94. Downie D, McFadyen MC, Rooney PH, Cruickshank ME, Parkin DE, Miller ID, Telfer C, Melvin WT, Murray GI. Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin.Cancer Res.* 2005;11:7369-7375.
95. Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Pelkonen O, Saarikoski S, Cresteil T, Pasanen M. Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem.Pharmacol.* 1996;52:379-383.
96. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 2003;1:116
97. Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol.Reprod.* 2003;69:1458-1471.
98. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* 2004;128:139-146.
99. Conneely OM, Lydon JP. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000;65:571-577.
100. Rutanen EM. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the endometrium. Effect of intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum.Reprod.* 2000;15 Suppl 3:173-181.
101. li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2006;231:20-27.
102. Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM, Navre M, Giudice LC, Gorstein F. Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1993;168:253-260.

103. Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:10129-10133.
104. Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM, Osteen KG. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:7362-7366.
105. Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 2000;260:1-12.
106. Jager R, Werling U, Rimpf S, Jacob A, Schorle H. Transcription factor AP-2gamma stimulates proliferation and apoptosis and impairs differentiation in a transgenic model. *Mol.Cancer Res.* 2003;1:921-929.
107. Kaldis P, Aleem E. Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. *Cell Cycle* 2005;4:1491-1494.
108. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 2009;28:2925-2939.
109. Yasmeeen A, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 2003;3:617-633.
110. Nishihara K, Masuda S, Nakagawa S, Yonezawa A, Ichimura T, Bonventre JV, Inui K. Impact of Cyclin B2 and Cell division cycle 2 on tubular hyperplasia in progressive chronic renal failure rats. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2010;298:F923-F934
111. Gong D, Ferrell JE, Jr. The Roles of Cyclin A2, B1, and B2 in Early and Late Mitotic Events. *Mol.Biol.Cell* 2010;
112. Tang L, Wang TT, Wu YT, Zhou CY, Huang HF. High expression levels of cyclin B1 and Polo-like kinase 1 in ectopic endometrial cells associated with abnormal cell cycle regulation of endometriosis. *Fertil.Steril.* 2009;91:979-987.
113. Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat.Cell Biol.* 2003;5:143-148.
114. Yuan J, Horlin A, Hock B, Stutte HJ, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am.J.Pathol.* 1997;150:1165-1172.
115. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett.* 2001;169:41-49.
116. Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Kobel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br.J.Cancer* 2004;90:815-821.
117. Matsumura S, Toyoshima F, Nishida E. Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J.Biol.Chem.* 2007;282:15217-15227.

118. Myslinski E, Gerard MA, Krol A, Carbon P. Transcription of the human cell cycle regulated BUB1B gene requires hStaf/ZNF143. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:3453-3464.
119. Rao CV, Yamada HY, Yao Y, Dai W. Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice. *Carcinogenesis* 2009;30:1469-1474.
120. Li W, Lan Z, Wu H, Wu S, Meadows J, Chen J, Zhu V, Dai W. BUBR1 phosphorylation is regulated during mitotic checkpoint activation. *Cell Growth Differ.* 1999;10:769-775.
121. Tsiambas E, Alexopoulou D, Lambropoulou S, Gerontopoulos K, Karakitsos P, Karameris A. Targeting topoisomerase IIa in endometrial adenocarcinoma: a combined chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry study based on tissue microarrays. *Int.J.Gynecol.Cancer* 2006;16:1424-1431.
122. Chhatriwala H, Jafri N, Salgia R. A review of topoisomerase inhibition in lung cancer. *Cancer Biol.Ther.* 2006;5:1600-1607.
123. Brustmann H. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), topoisomerase IIalpha expression, and apoptosis in endometrial adenocarcinoma and atypical hyperplasia. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 2005;24:184-192.
124. Bildrici K, Tel N, Ozalp SS, Yalcin OT, Yilmaz V. Prognostic significance of DNA topoisomerase II-alpha (Ki-S1) immunoexpression in endometrial carcinoma. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 2002;23:540-544.
125. Liu QY, Pandey S, Singh RK, Lin W, Ribocco M, Borowy-Borowski H, Smith B, LeBlanc J, Walker PR, Sikorska M. DNaseY: a rat DNaseI-like gene coding for a constitutively expressed chromatin-bound endonuclease. *Biochemistry* 1998;37:10134-10143.
126. Liu QY, Ribocco M, Pandey S, Walker PR, Sikorska M. Apoptosis-related functional features of the DNaseI-like family of nucleases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;887:60-76.
127. Muddana SS, Peterson BR. Fluorescent cellular sensors of steroid receptor ligands. *Chembiochem.* 2003;4:848-855.
128. Delorme AC, Danan JL, Acker MG, Ripoche MA, Mathieu H. In rat uterus 17 beta-estradiol stimulates a calcium-binding protein similar to the duodenal vitamin D-dependent calcium-binding protein. *Endocrinology* 1983;113:1340-1347.
129. Bruns ME, Overpeck JG, Smith GC, Hirsch GN, Mills SE, Bruns DE. Vitamin D-dependent calcium binding protein in rat uterus: differential effects of estrogen, tamoxifen, progesterone, and pregnancy on accumulation and cellular localization. *Endocrinology* 1988;122:2371-2378.
130. L'Horset F, Perret C, Brehier A, Thomasset M. 17 beta-estradiol stimulates the calbindin-D9k (CaBP9k) gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels in the rat uterus. *Endocrinology* 1990;127:2891-2897.

131. Sun MK, Alkon DL. Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch.Pharm.(Weinheim)* 2009;342:689-698.
132. Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20:687-702.
133. Hu Y, Lund IV, Gravielle MC, Farb DH, Brooks-Kayal AR, Russek SJ. Surface expression of GABAA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of cAMP-response element-binding protein and its binding partner inducible cAMP early repressor. *J.Biol.Chem.* 2008;283:9328-9340.
134. Koubovec D, Berghe WV, Vermeulen L, Haegeman G, Hapgood JP. Medroxyprogesterone acetate downregulates cytokine gene expression in mouse fibroblast cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 2004;221:75-85.
135. Sim RB, Day AJ, Moffatt BE, Fontaine M. Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods Enzymol.* 1993;223:13-35.
136. Nolen BM, Lokshin AE. Targeting CCL11 in the treatment of ovarian cancer. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 2010;14:157-167.
137. Rossmannith WG, Clifton DK, Steiner RA. Galanin gene expression in hypothalamic GnRH-containing neurons of the rat: a model for autocrine regulation. *Horm.Metab Res.* 1996;28:257-266.
138. Niiro N, Nishimura J, Hirano K, Nakano H, Kanaide H. Mechanisms of galanin-induced contraction in the rat myometrium. *Br.J.Pharmacol.* 1998;124:1623-1632.
139. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, Baldacci C, Genazzani AR. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology* 2004;145:5745-5756.
140. de Bruin EC, van de PS, Lips EH, van Eijk R, van der Zee MM, Lombaerts M, van Wezel T, Marijnen CA, van Krieken JH, Medema JP, van de Velde CJ, Eilers PH, Peltenburg LT. Macrodissection versus microdissection of rectal carcinoma: minor influence of stroma cells to tumor cell gene expression profiles. *BMC.Genomics* 2005;6:142
141. Klee EW, Erdogan S, Tillmans L, Kosari F, Sun Z, Wigle DA, Yang P, Aubry MC, Vasmatazis G. Impact of sample acquisition and linear amplification on gene expression profiling of lung adenocarcinoma: laser capture micro-dissection cell-sampling versus bulk tissue-sampling. *BMC.Med.Genomics* 2009;2:13
142. Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, Bennett AB, Bostock RM, Martineau B, Lucas WJ, Gilchrist DG, Alexander D. In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:3814-3818.
143. Nygaard V, Holden M, Loland A, Langaas M, Myklebost O, Hovig E. Limitations of mRNA amplification from small-size cell samples. *BMC.Genomics* 2005;6:147
144. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, Kalyana-Sundaram S, Wei JT, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM.

- Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat.Genet.* 2007;39:41-51.
145. Spiess AN, Mueller N, Ivell R. Amplified RNA degradation in T7-amplification methods results in biased microarray hybridizations. *BMC.Genomics* 2003;4:44
 146. King C, Guo N, Frampton GM, Gerry NP, Lenburg ME, Rosenberg CL. Reliability and reproducibility of gene expression measurements using amplified RNA from laser-microdissected primary breast tissue with oligonucleotide arrays. *J.Mol.Diagn.* 2005;7:57-64.
 147. Shennan DB, Peaker M. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev.* 2000;80:925-951.
 148. Hennighausen L. Molecular mechanisms of hormone controlled gene expression in the breast. *Mol.Biol.Rep.* 1997;24:169-174.
 149. Barash I. Stat5 in the mammary gland: controlling normal development and cancer. *J.Cell Physiol* 2006;209:305-313.
 150. Greenhalgh CJ, Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm.IGF.Res.* 2004;14:200-206.
 151. Watson CJ, Burdon TG. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Rev.Reprod.* 1996;1:1-5.
 152. Jura J, Jura J, Murzyn K, Wegrzyn P, Zarebski A. Cloning and characterization of 5' upstream promoter region of rat WAP gene. *Biochim.Biophys.Acta* 2005;1727:58-64.
 153. Rogatsky I, Ivashkiv LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 2006;68:1-12.
 154. Quirk SJ, Slattery JA, Funder JW. Mammary gland whey acidic protein: ontogeny and changing patterns of steroid sensitivity. *Mol.Cell Endocrinol.* 1989;66:135-141.
 155. Li S, Rosen JM. Glucocorticoid regulation of rat whey acidic protein gene expression involves hormone-induced alterations of chromatin structure in the distal promoter region. *Mol.Endocrinol.* 1994;8:1328-1335.
 156. Ockner RK. Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. *Mol.Cell Biochem.* 1990;98:3-9.
 157. Yang Y, Spitzer E, Kenney N, Zschiesche W, Li M, Kromminga A, Muller T, Spener F, Lezius A, Veerkamp JH, . Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J.Cell Biol.* 1994;127:1097-1109.
 158. Kurtz A, Spitzer E, Zschiesche W, Wellstein A, Grosse R. Local control of mammary gland differentiation: mammary-derived growth inhibitor and pleiotrophin. *Biochem.Soc.Symp.* 1998;63:51-69.
 159. Binas B, Spitzer E, Zschiesche W, Erdmann B, Kurtz A, Muller T, Niemann C, Blenau W, Grosse R. Hormonal induction of functional differentiation and mammary-derived growth inhibitor expression in cultured mouse mammary gland explants. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 1992;28A:625-634.

160. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J.Endocrinol.* 2005;186:1-20.
161. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J.Physiol* 2002;542:3-16.
162. GARTON GA. THE COMPOSITION AND BIOSYNTHESIS OF MILK LIPIDS. *J.Lipid Res.* 1963;4:237-254.
163. Matsuzaki T, Machida N, Tajika Y, Ablimit A, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. Expression and immunolocalization of water-channel aquaporins in the rat and mouse mammary gland. *Histochem.Cell Biol.* 2005;123:501-512.
164. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu.Rev.Physiol* 1995;57:607-634.
165. Parry G, Li J, Stubbs J, Bissell MJ, Schmidhauser C, Spicer AP, Gendler SJ. Studies of Muc-1 mucin expression and polarity in the mouse mammary gland demonstrate developmental regulation of Muc-1 glycosylation and establish the hormonal basis for mRNA expression. *J.Cell Sci.* 1992;101 (Pt 1):191-199.
166. Brayman MJ, Julian J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Edwards DP, Carson DD. Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Mol.Endocrinol.* 2006;20:2278-2291.
167. Morris K, Kuo B, Wilkinson MD, Davison JS, Befus AD, Mathison RD. Vcsa1 gene peptides for the treatment of inflammatory and allergic reactions. *Recent Pat Inflamm.Allergy Drug Discov.* 2007;1:124-132.
168. Tong Y, Tar M, Melman A, Davies K. The opiorphin gene (ProL1) and its homologues function in erectile physiology. *BJU.Int.* 2008;102:736-740.
169. Chua RG, Calenda G, Zhang X, Siragusa J, Tong Y, Tar M, Aydin M, DiSanto ME, Melman A, Davies KP. Testosterone regulates erectile function and Vcsa1 expression in the corpora of rats. *Mol.Cell Endocrinol.* 2009;303:67-73.
170. Rosinski-Chupin I, Tronik D, Rougeon F. High level of accumulation of a mRNA coding for a precursor-like protein in the submaxillary gland of male rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85:8553-8557.
171. Rosinski-Chupin I, Rougeon F. The gene encoding SMR1, a precursor-like polypeptide of the male rat submaxillary gland, has the same organization as the preprothyrotropin-releasing hormone gene. *DNA Cell Biol.* 1990;9:553-559.
172. Tompkins LM, Wallace AD. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 2007;21:176-181.
173. Schuetz EG, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K, Cole TJ. The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 2000;28:268-278.
174. Audet-Walsh E, Anderson A. Dexamethasone induction of murine CYP2B genes requires the glucocorticoid receptor. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:580-588.

175. Stoltz C, Vachon MH, Trottier E, Dubois S, Paquet Y, Anderson A. The CYP2B2 phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal phenobarbital responsiveness. *J.Biol.Chem.* 1998;273:8528-8536.
176. Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress.* 2000;3:201-208.
177. Reul JM, De Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985;117:2505-2511.
178. Cassoni P, Sapino A, Marrocco T, Chini B, Bussolati G. Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation. *J.Neuroendocrinol.* 2004;16:362-364.
179. Himpe E, Kooijman R. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 2009;35:76-81.
180. Faraldo MM, Teuliere J, Deugnier MA, Taddei-De La Hossieraye I, Thiery JP, Glukhova MA. Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2005;10:211-219.
181. Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci.* 2008;99:631-637.
182. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr.Rev.* 2005;26:898-915.
183. Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 2000;21:128-134.
184. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin.Sci.(Lond)* 2005;109:365-379.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A

AK	Antikörper
AKT (= PKB)	Proteinkinase B
<i>Aqp3</i>	aquaporin 3-Gen
AR	Androgen-Rezeptor
aRNA	antisense RNA (zur mRNA komplementäre einzelsträngige RNA)

B

BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
bioB	Gen des Biotinstoffwechsels von <i>Escherichia coli</i>
bioC	Gen des Biotinstoffwechsels von <i>Escherichia coli</i>
bioD	Gen des Biotinstoffwechsels von <i>Escherichia coli</i>
bp	base pair (Basenpaar)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)

C

c	concentration (Konzentration)
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
<i>Ccna2</i>	cyclin A2-Gen
<i>Ccnb2</i>	cyclin B2-Gen
CCD	charge-coupled device (ladungsgekoppelter Baustein)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
*.CEL-file	Datei, die die von der Analyse-Software berechnete Datenintensität eines jeden Features von Affymetrix GeneChips® enthält
<i>Cldn4</i>	claudin 4-Gen
CO ₂	Kohlendioxid
cre	Rekombinase-Gen von P1-Bakteriophagen
<i>Csn1s1</i>	casein alpha s1-Gen
<i>Csn3</i>	casein kappa-Gen
C _T	Cycle of Threshold (Schwellenwert-Zyklus)
<i>Cxcl14</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 14-Gen
<i>Cyb5b</i>	cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)-Gen

D

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dap	Diaminopimelat
*.DAT-file	Datei, die die Datenintensität jedes Pixels (Datenpunktes) von Affymetrix GeneChips® enthält
$\Delta\Delta C_T$	delta delta C _T

D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Dnase1/3</i>	deoxyribonuclease 1-like 3-Gen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	
E2	Estrogen
ECL	Enhanced Chemiluminescence (gesteigerte Chemilumineszenz)
ED ₅₀	Effektivdosis 50 %
EDTA	Ethylenediamine-Tetraacetic Acid Disodium Salt Solution (Ethylendiamintetraacetat)
ELT	Eker Leiomyoma/Myosarcoma Tumor-derived
ER	Estrogen-Rezeptor
Erk	extracellular signal-regulated protein kinase
F	
<i>Fabp3</i>	fatty acid binding protein 3-Gen
FC	Fold Change
FFPE	Formalin-fixed, Paraffin-embedded
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FU	Fluorescence Units (Fluoreszenz-Intensität)
G	
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen
GCOS	Analyse-Software zur Generierung von *CEL-files aus *DAT-files von Genexpressionsdaten auf Affymetrix GeneChips®
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	glucocorticoides Response-Element
GTR TRG	Global Therapeutic Research Therapeutic Research Group
H	
h	hour (Stunde)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ham's F-12	F-12 Nutrient Mixture
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HRE	Hormon-Response-Element
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HRT	Hormone Replacement Therapy (Hormonersatztherapie)

I

i.g.	intra-gastral
IGF	Insulin-Like Growth Factor
<i>Igfbp1</i>	insulin-like growth factor binding protein 1-Gen
IgG	Immunglobulin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

J

Jak	Janus-Kinase
-----	--------------

K

k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid

L

L	Liter
<i>Lalba</i>	alpha lactalbumin-Gen
LCM	Laser Capture Microdissection (lasergestützte Mikrodisektionstechnik)
LH	Luteinisierendes Hormon
LNG	Levonorgestrel
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
lys	Lysin

M

m	Milli/Meter
M	Molar (Mol pro Liter)
MAS 5.0	mathematischer Algorithmus zur Kondensierung von Genexpressionsdaten auf Affymetrix GeneChips®
MEM	Minimum Essential Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
<i>Mmp7</i>	matrix metalloproteinase 7-Gen
MPA	Medroxyprogesteronacetat
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
<i>Muc1</i>	mucin 1-Gen

N

n	Nano
N/A	Not Available (nicht verfügbar)
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nucleotide (Nukleotid)

O

O.C.T.	Optimal Cutting Temperature
OD	Optische Dichte

OXTR	Oxytocin-Rezeptor
P	
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P4	Progesteron
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Principal Component (Hauptkomponente)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	pondus Hydrogenii/potentia Hydrogenii
phe	Phenylalanin
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB (= AKT)	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteron-Rezeptor
PRL	Progesteron-Rezeptor-Ligand
Q	
qRT-PCR	quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion
R	
R5020	Promegeston
Ras	Rat sarcoma
RIN	RNA Integrity Number (RNA-Integritätsnummer)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomal RNA (ribosomale RNA)
S	
s	second (Sekunde)
S	Sedimentationskonstante
s.c.	subcutan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
<i>Sgk1</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1-Gen
<i>Spp1</i>	secreted phosphoprotein 1-Gen
Src	steroid receptor coactivator
Stat	Signal transducer and activator of transcription
T	
T ₃	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin
<i>Tcfap2c</i>	transcription factor AP-2, gamma-Gen
thr	Threonin
TLDA	TaqMan [®] Low Density Array
TBS	Tris Buffered Saline (trisgepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris Buffered Saline Polysorbate 20 (trisgepufferte Salzlösung-Polysorbat-20 (Tween [®] 20))

tRNA	transfer RNA (Transfer-RNA)
U	
μ	Mikro
UV	ultraviolettes Licht
V	
V	Volt
W	
<i>Wap</i>	whey acidic protein-Gen
w/v	weight per volume (Raumgewicht)

8.2 Verwendete Feinchemikalien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Reinheitsstufe der Chemikalien entsprach Analysequalität.

2-Propanol	Merck (Darmstadt)
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Accutase	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat (#A-6154)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Avidin Solution	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Benzylbenzoat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Biotinylated Goat anti-Rabbit Immunglobuline, Rabbit-Link (#HK326-UR)	BioGenex (San Ramon, CA, USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Citratpuffer, 10x	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG (Hamburg)
Common AB Diluent	BioGenex (San Ramon, CA, USA)
Concentrated Label, Streptavidin Peroxidase	BioGenex (San Ramon, CA, USA)
Cremophor EL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Cryomold	VWR International GmbH (Darmstadt)
DAB-Substratkit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG (Hamburg)
d-Biotin Solution	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Destilliertes Wasser, DNase, RNase frei, entionisiert	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Diluent for Streptavidin Peroxidase	BioGenex (San Ramon, CA, USA)

Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
D-MEM	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
D-MEM/F-12 Medium, phenolrot-frei	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
D-PBS + CaCl ₂ /MgCl ₂	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
EDTA (0,5 M, pH 8.0)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Eisensulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethanol, 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethanol, 96 %, reinst Eukitt®	Merck (Darmstadt) O. Kindler GmbH (Freiburg)
F-12 Nutrient Mixture (Ham's F-12 Medium)	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Fetales Kälberserum	Biochrom AG (Berlin)
Formalin, Neutral gepuffert, 10%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Goat Serum, 100 %	Abcam (Cambridge, UK)
Hämatoxylin (Mayer)	MEDITE GmbH (Burgdorf)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Hypochlorid-Lösung	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Levonorgestrel	Bayer Schering Pharma AG (Berlin)
Link-Diluent	BioGenex (San Ramon, CA, USA)
Medroxyprogesteronacetat	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
MEM Natrium-Pyruvat	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich (Fluka, Buchs, Schweiz)
Natrium-Molybdat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

Natriumselenit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Natronlauge, 5M	Merck (Darmstadt)
NuPAGE [®] Antioxidant	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer, 4x	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer, 20x	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent, 10x	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Oxytocin Receptor antibody (#SP4440P)	Acris Antibodies GmbH (Herford)
Paraffin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Positive Control Lysate for Progesterone Receptor	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Progesteron	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Progesterone Receptor (SP2) (#RM-9102-S)	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Progesteron-Rezeptor-Ligand	Bayer Schering Pharma AG (Berlin)
Promegeston	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Protease-Inhibitoren Complete, Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen (Hilden)
Rhizinusöl (Castor Oil, Ph Eur)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
RNaseZAP	Ambion (Austin, TX, USA)
Salzsäure, 1M	Merck (Darmstadt)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Steriles Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Superscript [™] III Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Super Sensitive Negative Control, Rabbit	BioGenex (San Ramon, CA, USA)

TBS, pH 7,6, 0,05 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
TBS-T, pH 8,0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Tris-Kochsalz-Puffer-Konzentrat, 50x, pH 7,6, 0,05 M	ProTaq [®] GmbH & Co. KG (Luckenwalde)
TaqMan [®] Array Micro Fluidic Cards	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
TaqMan [®] Gene Expression Assays	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
TaqMan [®] Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium	Sakura Finetek USA, Inc. (Torrance, CA, USA)
Transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Vasopressin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck (Darmstadt)
Xylol, reinst	Merck (Darmstadt)

8.3 Verwendete Kits

1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA)
ECL kit	Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, USA)
HistoGene™ LCM Frozen Section Staining Kit	Arcturus (Sunnyvale, CA, USA)
LCM Staining Kit	Ambion (Austin, TX, USA)
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
PicoPure™ RNA Isolation Kit	Arcturus (Sunnyvale, CA, USA)
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Purification Components Amplification Kit	Arcturus (Sunnyvale, CA, USA)
RiboAmp® HS ^{Plus} RNA Amplification Kit	Arcturus (Sunnyvale, CA, USA)
RNA-6000-Nano LabChip Kit Series II	Agilent Technologies (Waldbronn)
RNA-6000-Pico LabChip Kit Series II	Agilent Technologies (Waldbronn)
RNeasy®-Kit Lipid Tissue Mini-Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy®-Kit, Mini-Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy® MinElute Cleanup Kit	Qiagen (Hilden)
Wash and Stain Kit	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)

8.4 Verwendete Gebrauchslösungen

In-vitro-Experimente

Kulturmedium	D-MEM und Ham's F-12 Medium (1+1)	
	10 %	FKS
	0,025 mg/mL	Insulin
	$1,6 \times 10^{-6}$ M	Eisensulfat
	$5,0 \times 10^{-8}$ M	Natriumselenit
	$1,2 \times 10^{-8}$ M	Vasopressin
	$1,0 \times 10^{-8}$ M	Cholesterol
	$2,0 \times 10^{-7}$ M	Hydrocortison
	$1,0 \times 10^{-9}$ M	Transferrin
	$1,0 \times 10^{-9}$ M	T ₃
Basalmedium	D-MEM/F-12 Medium, phenolrot-frei	
	1 %	BSA
	0,45 %	MEM Natrium-Pyruvat
	$1,6 \times 10^{-6}$ M	Eisensulfat
	$5,0 \times 10^{-8}$ M	Natriumselenit
	$1,2 \times 10^{-8}$ M	Vasopressin
	$1,0 \times 10^{-8}$ M	Cholesterol
	$2,0 \times 10^{-7}$ M	Hydrocortison
	$1,0 \times 10^{-9}$ M	Transferrin
	$1,0 \times 10^{-9}$ M	T ₃
MTT-Assay		
MTT-Desorb	2-Propanol	
	0,7 %	SDS
RNA-Isolierung		
Lysis-Puffer	RLT-Puffer (RNeasy [®] -Kit)	
	1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
DNase-Lösung	1500 units	RNase-free DNase I, lyophilisiert (RNase-Free DNase Set)
	550 µL	RNase-freies Wasser (RNase-Free DNase Set)
	3,85 mL	RDD-Puffer (RNase-Free DNase Set)

Immunoblotting

Hochsalzextraktionspuffer, pH 8,0	10 mM 20 mM 1,5 mM 600 mM 1 mM 1 mM 1Tab/10 mL	Tris-HCl Natrium-Molybdat EDTA KCl PMSF DTT Protease-Inhibitoren
Probenpuffergemisch	4x 10x	NuPAGE® LDS Sample Buffer NuPAGE® Sample Reducing Agent
Antioxidantien		NuPAGE® Antioxidant
Laufpuffer	20x	NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer
Blocking Solution, pH 8,0	TBS-T, pH 8,0 2 % (w/v)	ECL Advance Blocking Agent (ECL Kit)

Immunhistochemie

Citratpuffer, pH 6,0	10 % 90 %	10x Citratpuffer destilliertes Wasser
Wasserstoffperoxidlösung, 3 %	10 % 90 %	30 %iges H ₂ O ₂ -Konzentrat destilliertes Wasser
Proteinblocking-Serum	50 % 50 %	Goat Serum, 100 % TBS, pH 7,6
Negativkontrollserum		Super Sensitive Negative Control, Rabbit
Streptavidin-Peroxidase-Gebrauchslösung (HRP-Label)	1 Anteil 19 Anteile	Concentrated Label, Streptavidin Peroxidase Diluent for Streptavidin Peroxidase
Chromogenlösung (DAB)	1 Tropfen 1 mL	DAB-Konzentrat DAB-Substratpuffer (DAB-Substratkit)

8.5 Verwendete Verbrauchsmaterialien

5-Place Slide	Heathrow Scientific LLC (Vernon Hills, IL, USA)
6-Well-Mikrotiterplatten	Falcon / BD Bioscience (Heidelberg)
96-Well-Mikrotiterplatten	Falcon / BD Bioscience (Heidelberg)
162er Zellkulturflaschen	Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Affymetrix Rat Genome 230A 2.0 GeneChips®	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
CapSure Macro LCM Caps	Arcturus (Sunnyvale, CA, USA)
Combitips plus (1-25 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Einmal-Filterhalter (Rotrand), 0,2 µm, steril, pyrogenfrei#	Schleicher & Schuell (Dassel)
Einstreu	Rettenmaier und Söhne GmbH und Co. KG (Rosenberg)
Einwegschutzhandschuhe	Sempermed / Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H. (Wien, Österreich)
Einweg-Skalpelle	B. Braun (Melsungen)
Filter und Spritzen (steril)	Sartorius AG (Göttingen)
KLIBA NAFAG 3883, pulverisiert	Provimi Kliba AG (Kaiseraugst, Schweiz)
Kodak® BioMax™ MR film	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Küvetten für UV-Bereich	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskopische Deckgläser, Nr.1 (24x50 mm)	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Mikrotom-Einmalklingen Typ C 35	PFM Medical AG (Köln)
Nageknochen	Plexx B.V. (International Homepage)
Nagerhäuschen	Plexx B.V. (International Homepage)
Nitrocellulose-Membran	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Midi Gel	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Objekträger	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Objekträger, Super Frost® Plus	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)

Ohrmarken für Labortiere aus Messing	HAUPTNER Instrumente GmbH (Dietlikon-Zürich)
Optical caps	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Pasteur-Pipetten, Glas	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Pipettenspitzen, gestopft, nukleasefrei	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
RNA Nano Chips	Agilent Technologies (Waldbronn)
RNA Pico Chips	Agilent Technologies (Waldbronn)
RNase-/DNase-freie Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
RNase-/DNase-freie Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Eppendorf (Hamburg)
RNase-/DNase-freie Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Eppendorf (Hamburg)
RNase-free DNase Set I	Qiagen (Hilden)
Safe Lock Tubes (0,5 mL; RNase-/DNase-frei)	Eppendorf (Hamburg)
Ssniff® R/M – H, pulverisiert	Provimi Kliba AG (Kaiseraugst, Schweiz)
Stahlkugeln (5mm)	Qiagen (Hilden)
Thermo-Fast 96 PCR Detektionsplatte	Falcon / BD Bioscience (Heidelberg)
Thin-Walled Reaction Tubes with Domed Cap (0,5 mL)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Tubes ambra 1,5 mL	Eppendorf (Hamburg)
Wägeschälchen	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA)
Zentrifugenröhrchen (13 mL)	Sarstedt AG und Co. (Nümbrecht)

8.6 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

96-Well-Mikrotiterplatten-Reader	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
2100-Retriever	proLab GmbH (Lollar)
7900HT Fast-Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
7900HT TaqMan Array Micro Fluidic Card Upgrade	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Agilent-2100-Bioanalyzer	Agilent Technologies (Waldbronn)
AutoPix™ Automated Laser Capture Microdissection System	Arcturus (Sunnyvale, CA, USA)
Axioskop 40	Zeiss (Jena)
AxioVision LE	Zeiss (Jena)
Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
BioPhotometer®	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Chip-Priming-Station	Agilent Technologies (Waldbronn)
Clean Bench	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Coverslipping Machine RCM 7000	MEDITE GmbH (Burgdorf)
Cryostat Leica CM 1950	Leica Microsystems (Nussloch)
Electrophoresis Power Supply – EPS 601	Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, USA)
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Expressionist Analyst Pro Software	GeneData AG (Basel, Schweiz)
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Taylor-Wharton (Mildstedt)
Freezing Container, Nalgene® Mr. Frosty	
GCOS-Software	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
GeneChip-3000Scanner with Autoloader and Barcode-Reader	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
GeneChip Fluidics-Station 450	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
GeneChip Hybridisation Oven 640	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
Hämozytometerkammer	
Heatingblock	Eppendorf (Hamburg)
Hydrophobic Slide Marker, Pap Pen	BioGenex (San Ramon, CA, USA)

iBlot® Dry Blotting System	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Inkubationskammer für Objektträger	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
Kühlschrank	Liebherr (Rostock)
Magnetrührer IKA IKAMAG RCT	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Makrolon®-Käfig	Tecniplast Deutschland GmbH (Hohenpeißenberg)
Matrix Cell Mate® II	Matrix Technologies GmbH (Feldkirchen)
Mehrkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Metallbehälter, Fur 1	Ebeco (Castrop-Rauxel)
Mikroliterpipetten (0,1-1000 µL)	Eppendorf (Hamburg)
Mikrozentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Mini Horizontal Submarine Unit	Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, USA)
Multipette stream	Eppendorf (Hamburg)
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Products (Wilmington, DE, USA)
NanoDrop spectrophotometer	NanoDrop Products (Wilmington, DE, USA)
Notebook Amilo Pro V-2000	Siemens AG (München)
PCR Cooler	Eppendorf (Hamburg)
PCR Mastercycler	Eppendorf (Hamburg)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pinzetten	Aeskulap (Tuttlingen)
Präzisionswaage	Mettler-Toledo GmbH (Giessen)
Rotor-Homogenizer	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
RQ Manager Version 2.1 Software	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Schüttler, IKA-VIBRAX-VXA	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Schwingmühle MM 200	Retsch GmbH (Haan)
Sequence Detector Version 2.0 Software	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Sigma 2KD centrifuge	SIGMA Laborzentrifugen. GmbH (Osterode am Harz)
SoftMax Pro Version 5.2	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
Sterilbank/Produktschutzbank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Thermocycler	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)

Tiefkühlschrank (-20 °C)	Bosch (Stuttgart)
Tiefstkühlschrank (-80 °C)	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Tischwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Tough-Spots™	USA Scientific, Inc. (Orlando, FL, USA)
Tränkflaschen	Ebeco (Castrop-Rauxel)
Ultrazentrifuge Optima™ Max-XP	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Vortex/Whirl-Mixer	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Vortex-Mixer Modell MS2-S9	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Wärmeschrank/Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Wellmixx 3	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
Zentrifuge mit Ausschwingrotor TTH-750	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

8.7 Wachstumsverhalten der ELT 3-Zellen

Um die Substanztestungen an den ELT 3-Zellen während deren Wachstumsphase durchführen zu können und damit optimale Bedingungen für die nachfolgenden Genexpressionsanalysen zu gewährleisten, wurde deren Wachstumsverhalten mittels MTT-Assay untersucht. Hierzu wurde die Viabilität unbehandelter Zellen verschiedener initialer Zellzahlen (3 , 5 und 8×10^4 Zellen/mL) in Kulturmedium (8.4) nach 24, 48, 72 und 96 h anhand deren metabolischer Aktivität bestimmt. Am jeweiligen Versuchsende wurden dazu 10 % (v/v) des schwach gelben 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) in das Medium gegeben. Dieses dringt während der zweistündigen Inkubation in die Zellen ein, wobei dessen Tetrazoliumring durch die Aktivität der Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien der Zellen reduziert wird. Es entsteht das alkohollösliche dunkelblaue Formazan. Nach Absaugen des wässrigen Gemischs wird dieses durch die anschließende Lyse der Zellen mittels MTT-Desorb (8.4) freigesetzt und während des nachfolgenden 15-minütigen Schüttelns gelöst. Die Extinktion (optische Dichte) der alkoholischen Formazanlösung ist ein Maß für die Menge metabolisch aktiver und damit lebender Zellen. Sie wurde mittels 96-Well-Mikrotiterplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch bestimmt, die Absorption bei 630 nm diente als Referenzwellenlänge. Die Messdatei wurde mit der Software „SoftMax Pro“ (Molecular Devices) erstellt. Die resultierenden Wachstumskurven der ELT 3-Zellen sind in Abbildung 30 dargestellt.

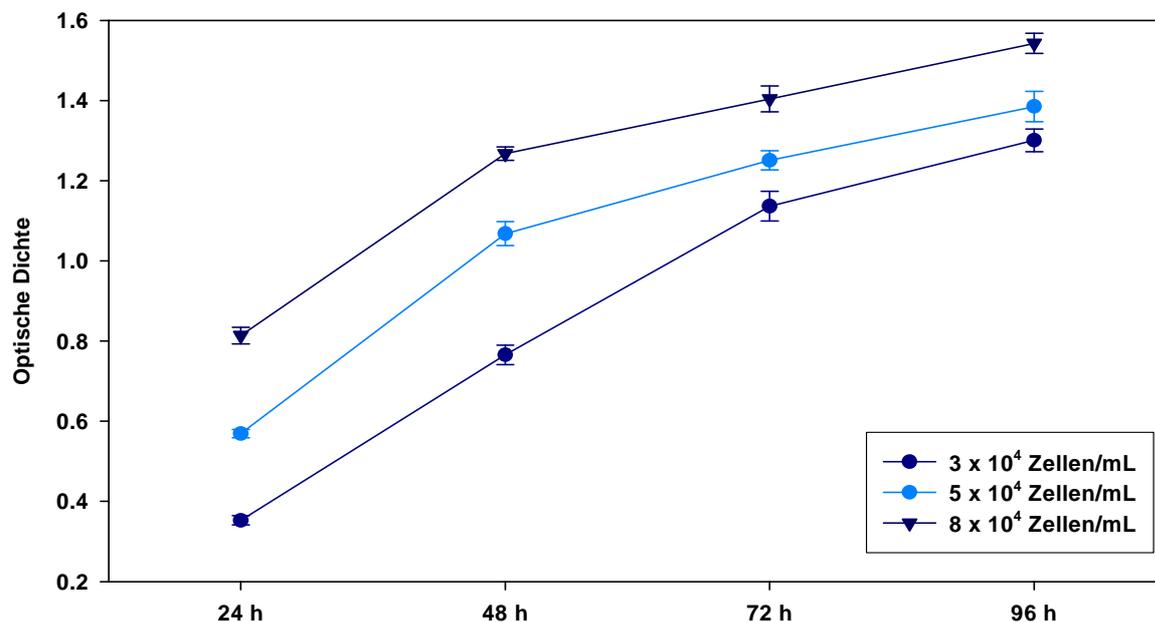


Abbildung 30 – Wachstumskurven der ELT 3-Zellen unterschiedlicher initialer Zellzahlen über 96 h nach Zellaussaat.

Den Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der kultivierten ELT 3-Zellen entsprechend sind initiale Zellzahlen von 3 , 5 und 8×10^4 Zellen/mL Medium für Substanzinkubationen geeignet, da alle Zellen über 96 h nach Zellaussaat stark proliferieren. Optimale Zeitpunkte für Substanzinkubationen liegen damit ebenfalls in diesem zeitlichen Rahmen.

8.8 Zytotoxische Substanzeffekte an ELT 3-Zellen

Um zytotoxische Effekte der vier Testsubstanzen oder des Lösungsmittels an ELT 3-Zellen ausschließen zu können, wurde deren Viabilität mittels MTT-Assay (beschrieben unter 8.7) nach 24-stündiger Inkubation geeigneter Substanzkonzentrationen in Basalmedium (8.4) untersucht. Der resultierende Kurvenverlauf ist in Abbildung 31 dargestellt.

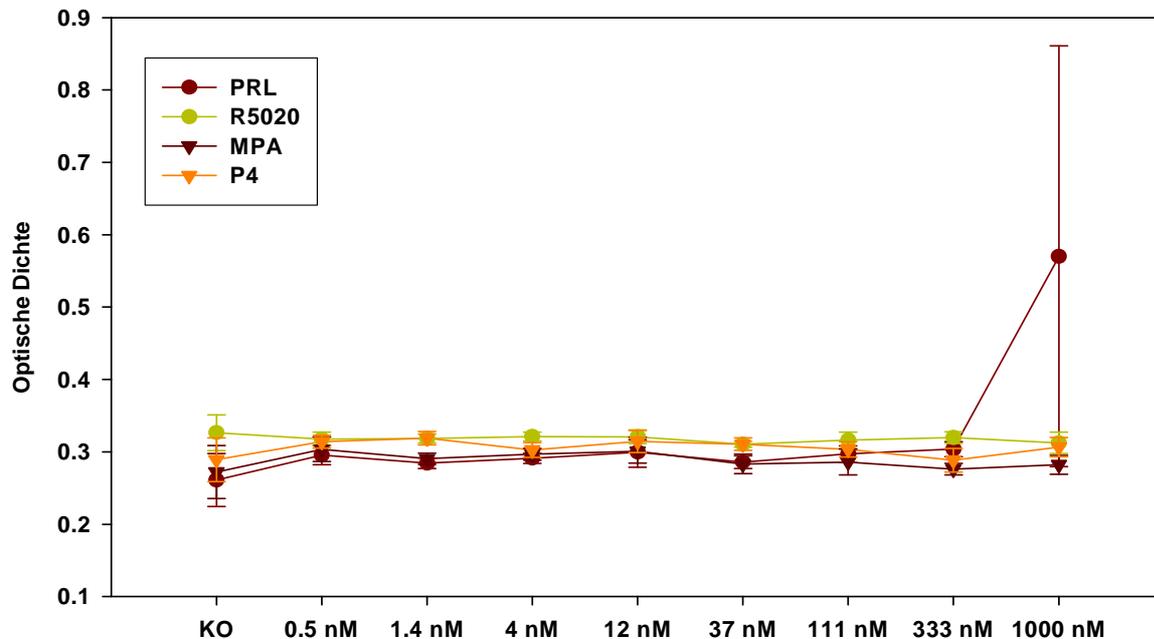


Abbildung 31 – MTT-Assay zur Beurteilung zytotoxischer Substanzeffekte an ELT 3-Zellen im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 1000 nM der Testsubstanzen PRL, R5020, MPA bzw. P4 über 24 h.

Anhand der ermittelten Kurvenverläufe waren im festgelegten Konzentrationsbereich für keine der vier Testsubstanzen oder das Lösungsmittel (KO) zytotoxische Substanzeffekte zu erkennen, da die Viabilität der Zellen über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich konstant blieb. Die auffallend hohe Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation von 1000 nM PRL wurde als Ausreißer bewertet.

8.9 Quantifizierung Biotin-markierter aRNA mittels NanoDrop

Die Quantität und Reinheit der aufgereinigten Biotin-markierten aRNA wurde mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Dazu wurde ein Probenvolumen von 1 µL aufgereinigter aRNA für 2 min bei 70 °C denaturiert, auf das Ende eines Glasfaserkabels pipettiert und mit einem zweiten Glasfaserkabel in Kontakt gebracht. Durch die Oberflächenspannung kommt es zur Ausbildung einer Flüssigkeitssäule, wodurch der mechanisch kontrollierte 1 mm große Abstand zwischen den beiden Glasfaserkabeln überbrückt wird. Eine gepulste Xenon-Blitzlampe stellt die Lichtquelle dar, während ein Spektrophotometer unter Verwendung eines linearen CCD-Arrays der Analyse des durch die Probe gegangenen Lichts dient. Die RNA-Konzentration wird durch die Messung der OD bei

260 nm bestimmt, die Reinheit über den Quotienten aus der $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{280\text{ nm}}$ sowie der $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{230\text{ nm}}$. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels integrierter PC-Software. Zur Hybridisierung auf die Affymetrix GeneChips[®] wurde eine Mindestmenge von 10 µg aRNA benötigt wurde.

8.10 Qualitätskontrolle isolierter RNA mittels Bioanalyser

Zur Qualitätskontrolle isolierter RNA mittels Agilent-2100-Bioanalyser (Agilent Technologies) wurden die Nucleinsäuren mit einem interkalierenden Gel gefärbt und die RNA-Fragmente, ribosomale RNA (rRNA) und RNA-Transkripte verschiedener Größen, in einem Mikrokanalsystem ihrem Molekulargewicht entsprechend elektrophoretisch separiert und mittels ihrer Laser-induzierten Fluoreszenz (670 - 700 nm; (183)) detektiert. Das Ausmaß der gemessenen Fluoreszenz korreliert dabei mit der Menge der RNA gegebener Größe (48). Der Vergleich zum mitgeführten Standard ermöglicht die quantitative Analyse der Proben. Durch die Berechnung der RIN wird die Qualität der Gesamt-RNA bewertet. Sie ermöglicht deren Klassifikation entsprechend eines numerischen Systems von 1 (gänzlich degradiert) bis 10 (intakt) in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Degradationsprodukten, die im Elektropherogramm sichtbar werden (Abbildung 32).

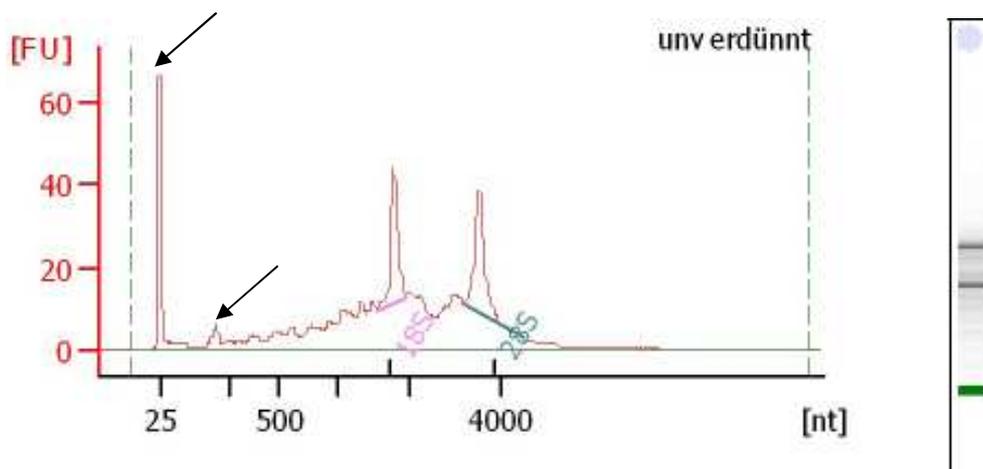


Abbildung 32 - Elektropherogramm der isolierten Gesamt-RNA aus der Mamma einer Ratte der In-vivo-Experimente nach 28-tägiger Behandlung mit 150 mg/kg/d P4 nach LCM mit zugehörigem gelähnlichen Bild (Agilent-2100-Bioanalyser, Agilent Technologies; RNA Pico Chip). Dargestellt ist die Intensität der Fluoreszenz (Fluorescence Units, FU) in Abhängigkeit von der Größe der entsprechenden RNA-Fragmente in Nucleotiden (nt). Im Elektropherogramm (links) stellt der erste Peak bei 25 nt den Marker-Peak dar (vorderer Pfeil), der zweite die 5S-Region (hinterer Pfeil), die kleinere rRNA- (5S und 5,8S rRNA) und tRNA-Fragmente beinhaltet (48). Bei einer Größe von 1552 und 3198 nt erscheinen die Peaks der 18S und 28S rRNA der aufgetragenen RNA-Probe. Die berechnete RIN dieser Probe beträgt 7,0 (1: gänzlich degradiert; 10: intakt). Im gelähnlichen Bild (rechts) repräsentiert die untere grüne Bande den aufgetragenen Marker, die folgenden die 18S und 28S rRNA der Probe.

8.11 quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Im so genannten TaqMan[®]-PCR-Assay wird zusätzlich zu den Primern eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die den exponentiellen Anstieg der Amplikonmenge während der PCR-Reaktion sichtbar macht. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert ist und am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher trägt. Während der Reaktion lagern sich die hybridisierende Sonde und die Primer sequenzspezifisch an den Matrizenstrang an, wobei die Sonde zwischen forward und reverse Primer paart. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs jedoch aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Sobald die Taq-Polymerase in der Elongationsphase auf die Sonde trifft, beginnt sie, diese aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität zu hydrolysieren. Durch diesen Abbau wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben, die Fluoreszenz des Reporters wird detektierbar und steigt entsprechend der Menge des PCR-Produktes mit jedem Zyklus an. Im optimalen Fall wird so bei jeder Bildung eines PCR-Produkts genau ein Sondenmolekül gespalten und der Anstieg der Fluoreszenz verläuft proportional zur Produktzunahme. Freie, nicht hybridisierte Sonden werden nicht hydrolysiert, so dass es möglich ist, die Amplifikation und den quantitativen Nachweis des PCR-Produktes in einem Reaktionsgefäß durchzuführen (184).

8.12 Angewendetes PCR-Temperaturprogramm

<i>qRT-PCR im TLDA-Format</i>	einmalig:	2 min	50,0 °C
		10 min	94,5 °C
	40 Zyklen:	30 s	97,0 °C
		1 min	59,7 °C

8.13 Durchführung des immunhistochemischen Nachweises

Im Folgenden ist die Durchführung des HRP-basierten immunhistochemischen Nachweises an FFPE-Gewebeschnitten stichpunktartig aufgeführt (LSAB-Methode):

1. Entparaffinieren in Xylol 10 min
 Spülen in absteigender Alkoholreihe
 2 x spülen in destilliertem Wasser

2. Wärmeverbehandlung im Schnellkochtopf (2100-Retriever)
 - Überführen in die zugehörigen Kunststoffküvetten
 - Vollständiges Bedecken mit Citratpuffer (8.4)
 - Starten des Zyklus 20 min
 - Abkühlen bei RT 20 min

- 3 x spülen in Trispufferlösung (TBS) (pH 7,6; 0,05 M)
3. Blocken der endogenen Peroxidase in 3 %-iger Wasserstoffperoxidlösung (8.4) 15 min
 4. 3 x Spülen in TBS (pH 7,6; 0,05 M) für insgesamt
Abklopfen des überschüssigen Puffers ≤ 5 min
 5. Blocken unspezifischer Proteinbindungen
 - a) Auftragen der Avidin Solution 10 min
3 x Spülen in TBS (pH 7,6; 0,05 M) für insgesamt
Abklopfen des überschüssigen Puffers ≤ 5 min
 - b) Auftragen der d-Biotin Solution 10 min
3 x Spülen in TBS (pH 7,6; 0,05 M) für insgesamt
Abklopfen des überschüssigen Puffers ≤ 5 min
 - c) Auftragen des Proteinblocking-Serums (8.4) 10 min
Abkippen der überschüssigen Gebrauchslösung
 6. Auftragen des spezifischen Primärantikörpers bzw. des
Negativkontrollserums (8.4) (Isotyp-Kontrolle)
Inkubation in Inkubationskammer für Objektträger bei RT 60 min
 7. 3 x Spülen in TBS (pH 7,6; 0,05 M) für insgesamt
Abklopfen des überschüssigen Puffers ≤ 5 min
 8. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers (Link)
Inkubation in Inkubationskammer für Objektträger bei RT 20 min
 9. 3 x Spülen in TBS (pH 7,6; 0,05 M) für insgesamt
Abklopfen des überschüssigen Puffers ≤ 5 min
 10. Auftragen der Streptavidin-Peroxidase-Gebrauchslösung (HRP-Label) (8.4)
Inkubation in Inkubationskammer für Objektträger bei RT 20 min
 11. 3 x Spülen in TBS (pH 7,6; 0,05 M) für insgesamt
Abklopfen des überschüssigen Puffers ≤ 5 min
 12. Inkubation in Chromogenlösung (DAB) (8.4) unter mikroskopischer Kontrolle 1 min
 13. Spülen in destilliertem Wasser ≤ 5 min
 14. Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer 30-60 s
 15. Abspülen der überschüssigen Farbe in destilliertem Wasser

16. Wässern in Leitungswasser ≤ 10 min
17. Spülen in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol
18. Eindecken in Eukitt

8.14 Überprüfung der Amplifizierungseffizienz der verwendeten TaqMan[®] Gene Expression Assays

Die Amplifizierungseffizienz der verwendeten TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) wurde mittels Software-Paket R (Version 2.9.0) (53) mit dem Paket qpcR (55) überprüft. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20 – Übersicht über die geschätzten Amplifizierungseffizienzen der verwendeten TaqMan® Gene Expression Assays.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Assay ID	Effizienzschatzer
actin, beta 1	<i>Actb1</i>	Rn01412977_g1	1,72320182663233
actin, beta 2	<i>Actb2</i>	Rn00667869_m1	1,48593292250399
aldolase B, fructose-bisphosphate	<i>Aldob</i>	Rn01636758_m1	1,61786201149656
annexin A2	<i>Anxa2</i>	Rn01530533_g1	1,81885001016057
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	Rn01451446_m1	1,68324389115386
aquaporin 5	<i>Aqp5</i>	Rn00562837_m1	1,54785800304162
aquaporin 8	<i>Aqp8</i>	Rn00569732_m1	1,55134078536685
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	<i>Abcb1b</i>	Rn00561753_m1	1,63271862985874
aurora kinase B	<i>Aurkb</i>	Rn01460656_m1	1,46268570223148
beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	<i>Bcmo1</i>	Rn00586409_m1	1,58593049511666
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	Rn01485664_m1	1,79248754790605
calbindin 1	<i>Calb1</i>	Rn00583140_m1	1,78364373525971
calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	<i>Calca</i>	Rn00692433_s1	1,68672183280407
carbonic anhydrase 4	<i>Car4</i>	Rn00569826_m1	1,37713858387459
Cd55 molecule	<i>Cd55</i>	Rn00709472_m1	1,50887688881302
Cd69 molecule	<i>Cd69</i>	Rn01459575_m1	1,54594643585608
CDW92 antigen	<i>Cdw92</i>	Rn00585181_m1	1,67077053516175
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	<i>Cdc2</i>	Rn00570728_m1	1,72601882855279
chemokine (C-C motif) ligand 20	<i>Ccl20</i>	Rn00570287_m1	1,50220555799909
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	<i>Cxcl14</i>	Rn01441840_m1	1,80154614029308
claudin 4	<i>Cldn4</i>	Rn01196224_s1	1,79380751316255
complement component 4 binding protein, alpha	<i>C4bpa</i>	Rn00560896_m1	1,60835848418846
cyclin A2	<i>Ccna2</i>	Rn01493715_m1	1,46895150682943
cyclin B2	<i>Ccnb2</i>	Rn02346769_g1	1,64873860537796
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	<i>Cdkn3</i>	Rn01414656_m1	1,61556159531285
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	<i>Cfr</i>	Rn01455979_m1	1,66544065270742
cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	<i>Cyb5b</i>	Rn00577982_m1	1,75490003101125
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	Rn00570779_m1	1,5129372582036
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp26a1</i>	Rn00590308_m1	1,69740544882311
cytoskeleton associated protein 2	<i>Ckap2</i>	Rn01482187_g1	1,88639410453042
D-amino-acid oxidase	<i>Dao</i>	Rn00671228_m1	1,9034315702044
defensin beta 1	<i>Defb1</i>	Rn00582613_m1	1,53289049649779
deoxyribonuclease 1-like 3	<i>Dnase1l3</i>	Rn00588160_m1	1,63999420039804
DEP domain containing 1	<i>Depdc1</i>	Rn01521456_m1	1,57415209244371
dynein light chain Tctex-type 3	<i>Dynl3</i>	Rn01756152_m1	1,46783943024483
E2F transcription factor 8	<i>E2f8</i>	Rn01476915_m1	1,66024256421826
fatty acid binding protein 5, epidermal	<i>Fabp5</i>	Rn00821817_g1	1,52983849635321
fibrinogen alpha chain	<i>Fga</i>	Rn01462589_m1	1,4874521470367
ficolin B	<i>Fcnb</i>	Rn00586231_m1	1,6196736712149
GLI-Kruppel family member GLI1	<i>Gli1</i>	Rn01504237_m1	1,56627372448407
glutamate decarboxylase 1	<i>Gad1</i>	Rn00566593_m1	1,66441882241176
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	Rn99999916_s1	1,57371971499971
guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	<i>Guca2a</i>	Rn00565426_m1	1,70599133269772
guanylate cyclase activator 2B	<i>Guca2b</i>	Rn00574127_m1	1,63358386896997
homogentisate 1,2-dioxygenase	<i>Hgd</i>	Rn01444029_m1	1,69327718522836
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	<i>Hsd17b2</i>	Rn00577779_m1	1,63741780283909
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	<i>Hsd11b1</i>	Rn00567167_m1	1,93580888191371
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	Rn00565713_m1	1,55927218497732
interferon stimulated exonuclease 20	<i>Isg20</i>	Rn01478001_m1	1,56751007556783
kinesin family member 2C	<i>Kif2c</i>	Rn00593292_m1	1,5604994475681
lipase, gastric	<i>Lipf</i>	Rn00569224_m1	1,54367518270803
low density lipoprotein-related protein 2	<i>Lrp2</i>	Rn00578067_m1	1,79478611049993
maternal embryonic leucine zipper kinase	<i>Melk</i>	Rn01439634_m1	1,65130906359357
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	Rn00563467_m1	1,5806254377376
napsin A aspartic peptidase	<i>Napsa</i>	Rn00581508_m1	1,48658548376395
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	<i>Opcml</i>	Rn00587759_m1	1,54352635640316
oxytocin, prepropeptide	<i>Oxt</i>	Rn00564446_g1	1,3668837774529
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	<i>Ppia</i>	Rn00690933_m1	1,51174372481701
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	<i>Phlpp</i>	Rn00572211_m1	1,76811221447007
phenazine biosynthesis-like protein domain containing	<i>Pbid</i>	Rn00593485_m1	1,71769759194929
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	<i>Pla2g2a</i>	Rn00580999_m1	1,65755974691201
plasminogen activator, urokinase	<i>Plau</i>	Rn00565261_m1	1,51252906475592
polo-like kinase 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>Plk1</i>	Rn00690926_m1	1,90724435995921
potassium channel, subfamily K, member 1	<i>Kcnk1</i>	Rn00572452_m1	1,48967226850275
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	<i>Kcnj1</i>	Rn00566732_m1	1,39922524738165
prion protein 2 (dublet)	<i>Prnd</i>	Rn03062198_s1	1,5771573627875
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	<i>Ptgds2</i>	Rn00581276_m1	1,59844145807259
protein regulator of cytokinesis 1	<i>Prc1</i>	Rn01477765_g1	1,82360039101092
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	<i>Rarres1</i>	Rn01455446_m1	1,78234938663258
ribonucleotide reductase M2	<i>Rrm2</i>	Rn01768873_g1	1,4545110856851
ribosomal protein S18	<i>Rps18</i>	Hs99999901_s1	1,85437141758002
S100 calcium binding protein B	<i>S100b</i>	Rn00566139_m1	1,42467510918719
secreted frizzled-related protein 4	<i>Sfrp4</i>	Rn00585549_m1	1,55559690518493
secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	Rn00681031_m1	1,57583256226328
serum/glucocorticoid regulated kinase 1	<i>Sgk1</i>	Rn00570285_m1	1,52544610067675
solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	<i>Slc1a1</i>	Rn00564705_m1	1,45005553468954
solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	<i>Slc10a1</i>	Rn00566894_m1	1,48613186473584
solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	<i>Slc16a3</i>	Rn00578115_m1	1,38730575206354
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	<i>Slc17a3</i>	Rn00596500_m1	1,6205196833683
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	<i>Slc2a13</i>	Rn00592414_m1	1,70471706982723
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	<i>Slc4a10</i>	Rn00710136_m1	1,52778732361448
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	<i>Slc5a11</i>	Rn01510983_m1	1,6203100033926
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	<i>Slc04a1</i>	Rn00592382_m1	1,67004891180322
SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Spc25</i>	Rn01484156_m1	1,751149453197
stimulated by retinoic acid gene 6	<i>Stra6</i>	Rn01418200_m1	1,6498839091615
synaptotagmin VI	<i>Syt6</i>	Rn00573432_m1	1,54979793122775
tenascin N	<i>Tnn</i>	Rn01491027_m1	1,76594098795472
tetraspanin 3	<i>Tspan3</i>	Rn01421801_m1	1,44994187529481
topoisomerase (DNA) II alpha	<i>Top2a</i>	Rn00573347_m1	1,75430222781872
transcription factor AP-2, gamma	<i>Tcfap2c</i>	Rn01528879_m1	1,57727110012007
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	Rn01447543_m1	1,815718453207
tumor-associated calcium signal transducer 2	<i>Tacstd2</i>	Rn01425046_s1	1,79909654391549
ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	<i>Ube2t</i>	Rn01490839_m1	1,8069735405477
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	<i>Vtn1</i>	Rn01534344_m1	1,63605537766848
wingless-type MMTV integration site family, member 4	<i>Wnt4</i>	Rn00584577_m1	1,55798657460506
wingless-type MMTV integration site family, member 7A	<i>Wnt7a</i>	Rn01425352_m1	1,55774977636917

Ein Effizienzschatzer von zwei entspricht einer Amplifizierungseffizienz von 100 %.

8.15 Überprüfung der Stabilität der endogenen Kontrollgene

Die Schätzung der Stabilität (52) des endogenen Kontrollgens *Gapdh* erfolgte mittels Software-Paket R (Version 2.9.0) (53) mit dem Paket SLqPCR (54) im Vergleich zu den ebenfalls analysierten verwendbaren endogenen Kontrollgenen *Actb1*, *Actb2*, *Ppia* und *Rps18*. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21 – Mittlere Stabilitätswerte der Genexpression der endogenen Kontrollgene *Actb1*, *Actb2*, *Gapdh*, *Ppia* und *Rps18*.

Gencode (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Assay ID	Reference Sequence	Stabilitätswert
Endogenes Kontrollgen				
<i>actin, beta 1</i>	<i>Actb1</i>	Rn01412977_g1	NM_031144.2	0,1390597
<i>actin, beta 2</i>	<i>Actb2</i>	Rn00667869_m1	NM_031144.2	0,1572675
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Gapdh</i>	Rn99999916_s1	NM_017008.3	0,2541457
<i>peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i>	<i>Ppia</i>	Rn00690933_m1	NM_017101.1	0,1512598
<i>ribosomal protein S18</i>	<i>Rps18</i>	Hs99999901_s1	NM_213557.1	0,2241076

Das Kontrollgen mit dem geringsten Stabilitätswert gilt als das stabilste (52).

8.16 Tabellen

Tabelle 22 – Übersicht über die 96 TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) zur qRT-PCR im TLDA-Format.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Assay ID	Reference Sequence
actin, beta 1	Actb1	Rn01412977_g1	NM_031144.2
actin, beta 2	Actb2	Rn00667869_m1	NM_031144.2
aldolase B, fructose-bisphosphate	Aldob	Rn01636758_m1	NM_012496.2
annexin A2	Anxa2	Rn01530533_g1	NM_019905.1
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Mki67	Rn01451446_m1	XM_225460.4
aquaporin 5	Aqp5	Rn00562837_m1	NM_012779.1
aquaporin 8	Aqp8	Rn00569732_m1	NM_019158.2
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	Abcb1b	Rn00561753_m1	NM_012623.2
aurora kinase B	Aurkb	Rn01460656_m1	NM_053749.1
beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	Bcmo1	Rn00586409_m1	NM_053648.2
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	Bub1b	Rn01485664_m1	NM_342494.3
calbindin 1	Calb1	Rn00583140_m1	NM_031984.2
calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	Calca	Rn00692433_s1	NM_017338.2
carbonic anhydrase 4	Car4	Rn00569826_m1	NM_019174.1
Cd55 molecule	Cd55	Rn00709472_m1	NM_022269.2
Cd69 molecule	Cd69	Rn01459575_m1	NM_134327.1
CDW92 antigen	Cdw92	Rn00585181_m1	NM_053492.2,NM_001033852.1
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Cdc2	Rn00570728_m1	NM_019296.1
chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	Rn00570287_m1	NM_019233.1
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	Rn01441840_m1	NM_001013137.2
claudin 4	Cldn4	Rn01196224_s1	NM_001012022.1
complement component 4 binding protein, alpha	C4bpa	Rn00560896_m1	NM_012516.2
cyclin A2	Ccna2	Rn01493715_m1	NM_053702.3
cyclin B2	Ccnb2	Rn02346769_g1	NM_001009470.1
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	Rn01414656_m1	NM_001106208.1
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	Ctfr	Rn01455979_m1	NM_031506.1, XM_001062374.1
cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	Cyb5b	Rn00577982_m1	NM_030586.2
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	Cyp2f4	Rn00570779_m1	NM_019303.1
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Cyp26a1	Rn00590308_m1	NM_130408.2
cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	Rn01482187_g1	XM_224970.4
D-amino-acid oxidase	Dao	Rn00671228_m1	NM_053626.1
defensin beta 1	Defb1	Rn00582613_m1	NM_031810.1
deoxyribonuclease 1-like 3	Dnase1l3	Rn00588160_m1	NM_053907.1
DEP domain containing 1	Depdc1	Rn01521456_m1	XM_227798.4
dynein light chain Tctex-type 3	Dynll3	Rn01756152_m1	NM_001013228.1
E2F transcription factor 8	E2f8	Rn01476915_m1	XM_218601.4
fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	Rn00821817_g1	NM_145878.1
fibrinogen alpha chain	Fga	Rn01462589_m1	NM_001008724.1
ficolin B	Fcnb	Rn00586231_m1	NM_053634.1
GLI-Kruppel family member GLI1	Gli1	Rn01504237_m1	XM_345832.3
glutamate decarboxylase 1	Gad1	Rn00566593_m1	NM_017007.1
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	Rn99999916_s1	NM_017008.3
guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	Guca2a	Rn00565426_m1	NM_013118.1
guanylate cyclase activator 2B	Guca2b	Rn00574127_m1	NM_022284.2
homogentisate 1, 2-dioxygenase	Hgd	Rn01444029_m1	NM_001012145.1
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	Rn00577779_m1	NM_024391.1
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	Hsd11b1	Rn00567167_m1	NM_017080.2
insulin-like growth factor binding protein 1	Igfbp1	Rn00565713_m1	NM_013144.1
interferon stimulated exonuclease 20	Isg20	Rn01478001_m1	NM_001008510.1
kinesin family member 2C	Kif2c	Rn00593292_m1	NM_134472.3,NM_001085369.1
lipase, gastric	Lipf	Rn00569224_m1	NM_017341.1
low density lipoprotein-related protein 2	Lrp2	Rn00578067_m1	NM_030827.1
maternal embryonic leucine zipper kinase	Melk	Rn01439634_m1	NM_001108662.1
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	Rn00563467_m1	NM_012864.2
napsin A aspartic peptidase	Napsa	Rn00581508_m1	NM_031670.2
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	Opcml	Rn00587759_m1	NM_053848.1
oxytocin, prepropeptide	Oxt	Rn00564446_g1	NM_012996.2
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Ppia	Rn00690933_m1	NM_017101.1
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	Phlpp	Rn00572211_m1	NM_021657.1
phenazine biosynthesis-like protein domain containing	Pbid	Rn00593485_m1	NM_138530.2
phospholipase A2, group IIa (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	Rn00580999_m1	NM_031598.3
plasmidogen activator, urokinase	Plau	Rn00565261_m1	NM_013085.3
polo-like kinase 1 (<i>Drosophila</i>)	Plk1	Rn00690926_m1	NM_017100.1
potassium channel, subfamily K, member 1	Kcnk1	Rn00572452_m1	NM_021688.3
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kcnj1	Rn00566732_m1	NM_017023.1
prion protein 2 (dublet)	Pripd	Rn03062198_s1	NM_001102431.1
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	Ptgsd2	Rn00581276_m1	NM_031644.2
protein regulator of cytokinesis 1	Prc1	Rn01477765_g1	NM_001107529.1
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Rarres1	Rn01455446_m1	NM_001014790.1
ribonucleotide reductase M2	Rrm2	Rn01768873_g1	NM_001025740.1
ribosomal protein S18	Rps18	Hs99999901_s1	NM_213557.1
S100 calcium binding protein B	S100b	Rn00566139_m1	NM_013191.1
secreted frizzled-related protein 4	Sfrp4	Rn00585549_m1	NM_053544.1
secreted phosphoprotein 1	Spp1	Rn00681031_m1	NM_012881.2
serum/glucocorticoid regulated kinase 1	Sgk1	Rn00570285_m1	NM_019232.2
solute carrier family 1 (neuron/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	Slc1a1	Rn00564705_m1	NM_013032.3
solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	Slc10a1	Rn00566894_m1	NM_017047.1
solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	Slc16a3	Rn00578115_m1	NM_030834.1
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	Rn00596500_m1	NM_153622.2
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	Slc2a13	Rn00592414_m1	NM_133611.1
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	Slc4a10	Rn00710136_m1	NM_178092.2
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	Slc5a11	Rn01510983_m1	NM_001100482.1
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	Slc04a1	Rn00592382_m1	NM_133608.2
SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Spc25	Rn01484156_m1	NM_001009654.1
stimulated by retinoic acid gene 6	Stra6	Rn01418200_m1	NM_001029924.1
synaptotagmin VI	Syt6	Rn00573432_m1	NM_022191.1
tenascin N	Tnn	Rn01491027_m1	NM_001107189.1
tetraspanin 3	Tspan3	Rn01421801_m1	NM_001005547.1
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	Rn00573347_m1	NM_022183.2
transcription factor AP-2, gamma	Tcfap2c	Rn01528879_m1	NM_201420.2
Tik protein kinase	Tik	Rn01447543_m1	NM_001108172.1
tumor-associated calcium signal transducer 2	Tacstd2	Rn01425046_s1	NM_001009540.2
ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	Ube2t	Rn01490839_m1	NM_001108344.2
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	Vctn1	Rn01534344_m1	NM_001024244.1
wingless-type MMTV integration site family, member 4	Wnt4	Rn00584577_m1	NM_053402.1
wingless-type MMTV integration site family, member 7A	Wnt7a	Rn01425352_m1	XM_342723.3, XM_001062984.1

Tabelle 23 A – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen im Uterus.

Gennamen (<i>Rattus norvegicus</i>) PRL 10 µg/kg/d	Gensymbol	Affymatrix ID	Reference Sequence	Fold Change
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	1368608_at	NM_019303.1	286
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp26a1</i>	1387583_at	NM_130408.2	178
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	<i>Slc17a3</i>	1390591_at	NM_153622.2	135
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	<i>Kcnj1</i>	1369451_a_at	NM_017023.1	122
Cd69 molecule	<i>Cd69</i>	1384837_at	NM_134327.1	80
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	<i>Slc4a10</i>	1373326_at	NM_178092.2	76
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	1368160_at	NM_013144.1	60
napsin A aspartic peptidase	<i>Napsa</i>	1368521_at	NM_031670.2	50
secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	1367581_a_at	NM_012881.2	36
aldolase B, fructose-bisphosphate	<i>Aldob</i>	1370299_at	NM_012496.2	26
cytoskeleton associated protein 2	<i>Ckap2</i>	1384068_at	XM_224970.4	-22
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	1368766_at	NM_012864.2	-20
ficolin B	<i>Fcnb</i>	1387378_at	NM_053634.1	-16
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	1379448_at	NM_001108172.1	-16
tenascin N	<i>Tnn</i>	1379331_at	NM_001107189.1	-14
cyclin A2	<i>Ccna2</i>	1379582_a_at	NM_053702.3	-13
p10n protein 2 (doublet)	<i>Prnd</i>	1384924_at	NM_001102431.1	-13
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	1383926_at	XM_342494.3	-12
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	<i>Slc5a11</i>	1381922_at	NM_001100482.1	-12
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	1374775_at	XM_225460.4	-11
PRL 100 µg/kg/d				
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	<i>Kcnj1</i>	1369451_a_at	NM_017023.1	240
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp26a1</i>	1387583_at	NM_130408.2	185
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	<i>Slc17a3</i>	1390591_at	NM_153622.2	156
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	1368608_at	NM_019303.1	147
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	<i>Slc4a10</i>	1373326_at	NM_178092.2	119
guanylate cyclase activator 2B	<i>Guca2b</i>	1387253_at	NM_022284.2	101
secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	1367581_a_at	NM_012881.2	77
ATP-binding growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	1368160_at	NM_013144.1	74
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	<i>Abcb1b</i>	1370583_s_at	NM_012623.2	65
defensin beta 1	<i>Defb1</i>	1369660_at	NM_031810.1	59
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	1368766_at	NM_012864.2	-372
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	1379448_at	NM_001108172.1	-41
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	<i>Cdkn3</i>	1372685_at	NM_001106028.1	-35
transcription factor AP-2, gamma	<i>Tcfap2c</i>	1383937_at	NM_201420.2	-24
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	1374775_at	XM_225460.4	-23
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	1383926_at	XM_342494.3	-20
cytoskeleton associated protein 2	<i>Ckap2</i>	1384068_at	XM_224970.4	-19
GLI-Kruppel family member GLI1	<i>Gli1</i>	1378720_at	XM_345832.3	-19
cyclin A2	<i>Ccna2</i>	1379582_a_at	NM_053702.3	-18
stimulated by retinoic acid gene 6	<i>Stra6</i>	1390525_a_at	NM_001029924.1	-18

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d); B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 23 B – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen im Uterus.

Gennamen (<i>Rattus norvegicus</i>) R5020 100 µg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	1368608_at	NM_019303.1	180
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp26a1</i>	1387583_at	NM_130408.2	164
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	<i>Kcnj1</i>	1369451_a_at	NM_017023.1	141
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	<i>Slc17a3</i>	1390591_at	NM_153622.2	134
guanylate cyclase activator-2B	<i>Guca2b</i>	1387253_at	NM_022284.2	133
secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	1367581_a_at	NM_012881.2	64
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	<i>Slc4a10</i>	1373326_at	NM_178092.2	62
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	1368160_at	NM_013144.1	56
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	<i>Abcb1b</i>	1370583_s_at	NM_012623.2	43
napsin A aspartic peptidase	<i>Napsa</i>	1368521_at	NM_031670.2	42
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	1368766_at	NM_012864.2	-37
transcription factor AP-2, gamma	<i>Tcfap2c</i>	1383937_at	NM_201420.2	-13
ribonucleotide reductase M2	<i>Rrm2</i>	1393848_at	NM_001025740.1	-12
stimulated by retinoic acid gene 6	<i>Stra6</i>	1390525_a_at	NM_001029924.1	-12
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	<i>Cfr</i>	1384960_at	NM_031506.1, XM_001062374.1	-12
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	1383926_at	XM_342494.3	-11
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	<i>Sic5a11</i>	1381922_at	NM_001100482.1	-11
cyclin A2	<i>Ccn2</i>	1379582_a_at	NM_053702.3	-11
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	1379448_at	NM_001108172.1	-10
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	1374775_at	XM_225460.4	-9
R5020 1000 µg/kg/d				
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	1368608_at	NM_019303.1	273
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp26a1</i>	1387583_at	NM_130408.2	222
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	<i>Kcnj1</i>	1369451_a_at	NM_017023.1	195
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	<i>Slc17a3</i>	1390591_at	NM_153622.2	171
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	1368160_at	NM_013144.1	61
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 12	<i>Serpinb12</i>	1376243_at	NM_001135867.1	53
natriuretic peptide precursor A	<i>Nppa</i>	1367564_at	NM_012612.2	47
Cd69 molecule	<i>Cd69</i>	1384837_at	NM_134327.1	46
aquaporin 8	<i>Aqp8</i>	1368316_at	NM_019158.2	46
guanylate cyclase activator-2B	<i>Guca2b</i>	1387253_at	NM_022284.2	45
ribonucleotide reductase M2	<i>Rrm2</i>	1393848_at	NM_001025740.1	-52
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	1368766_at	NM_012864.2	-46
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	1379448_at	NM_001108172.1	-38
lipase, gastric	<i>Lipf</i>	1387245_at	NM_017341.1	-36
ficolin B	<i>Fcnb</i>	1387378_at	NM_053634.1	-30
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	<i>Cfr</i>	1384960_at	NM_031506.1, XM_001062374.1	-22
cyclin A2	<i>Ccn2</i>	1379582_a_at	NM_053702.3	-22
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	1383926_at	XM_342494.3	-19
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	1374775_at	XM_225460.4	-17
topoisomerase (DNA) II alpha	<i>Top2a</i>	1388650_at	NM_022183.2	-17

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d), B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 23 C – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen im Uterus.

Gennamen (<i>Rattus norvegicus</i>) MPA 1 mg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kcnj1	1369451_a_at	NM_017023.1	230
cytochrome P450, family 2, subfamily 1, polypeptide 4	Cyp2f4	1368608_at	NM_019303.1	219
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Cyp26a1	1387583_at	NM_130408.2	200
guanylate cyclase activator 2B	Guca2b	1387253_at	NM_022284.2	178
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	1390591_at	NM_153622.2	156
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	Slc4a10	1373326_at	NM_178092.2	120
insulin-like growth factor binding protein 1	Igfbp1	1368160_at	NM_013144.1	61
Cd69 molecule	Cd69	1384837_at	NM_134327.1	57
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	Abcb1b	1370583_s_at	NM_012623.2	56
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 12	Serpincb12	1376243_at	NM_00135867.1	56
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	-257
Ttk protein kinase	Ttk	1379448_at	NM_001108172.1	-33
prion protein 2 (dublet)	Prnd	1384924_at	NM_001102431.1	-32
ficolin B	Fcnb	1387378_at	NM_053634.1	-25
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	1372685_at	NM_001106028.1	-21
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	Slc5a11	1381922_at	NM_001100482.1	-19
ribonucleotide reductase M2	Rrm2	1393848_at	NM_001025740.1	-19
cyclin A2	Ccna2	1379582_a_at	NM_053702.3	-18
cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	1384068_at	XM_224970.4	-18
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1388650_at	NM_022183.2	-15
MPA 10 mg/kg/d				
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	Gabra1	1380828_at	NM_183326.2	441
deoxyribonuclease I	Dnase1	1368084_at	NM_013097.2	68
GDNF family receptor alpha 4	Gfra4	1369730_a_at	NM_023967.1	53
galanin prepropeptide	Gal	1387088_at	NM_033237.1	37
D-amino-acid oxidase	Dao	1369491_at	NM_053626.1	31
tryptase alpha/beta 1	Tpsab1	1387162_at	NM_019322.2	30
gulonolactone (L-) oxidase	Gulo	1369837_at	NM_022220.2	30
FERM and PDZ domain containing 1	Fimpd1	1377693_at	NM_001107937.1	29
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Plazg2a	1368128_at	NM_031598.3	23
solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5	Slc13a5	1383600_at	NM_170668.1	21
lipase, gastric	Lipf	1387245_at	NM_017341.1	-64
gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, pi	Gabrp	1387600_at	NM_031029.1	-59
S100 calcium binding protein G	S100g	1368339_at	NM_012521.1	-53
Ttk protein kinase	Ttk	1379448_at	NM_001108172.1	-25
complement factor I	Cfi	1368205_at	NM_024157.1	-21
ficolin B	Fcnb	1387378_at	NM_053634.1	-17
oxytocin, prepropeptide	Oxt	1368312_at	NM_012996.2	-17
regenerating islet-derived 3 gamma	Reg3g	1370631_at	NM_173097.1	-16
chloride channel calcium activated 3	Clica3	1390238_at	NM_001107449.1	-13
prion protein 2 (dublet)	Prnd	1384924_at	NM_001102431.1	-13

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d); B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 23 D – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen im Uterus.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>) P4 15 mg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	Cyp2f4	1368608_at	NM_019303.1	322
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Cyp26a1	1387583_at	NM_130408.2	218
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kcni1	1369451_a_at	NM_017023.1	174
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	1390591_at	NM_153622.2	144
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	Slc4a10	1373326_at	NM_178092.2	91
guanylate cyclase activator 2B	Guca2b	1387253_at	NM_022284.2	72
Cd69 molecule	Cd69	1384837_at	NM_134327.1	68
insulin-like growth factor binding protein 1	Igfbp1	1368160_at	NM_013144.1	65
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 12	Serp1nb12	1376243_at	NM_001135867.1	56
secreted phosphoprotein 1	Spp1	1367581_a_at	NM_012881.2	54
Ttk protein kinase	Ttk	1379448_at	NM_001108172.1	-61
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	-54
ribonucleotide reductase M2	Rrm2	1393848_at	NM_001025740.1	-25
ficollin B	Fcnb	1387378_at	NM_053634.1	-24
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1372186_a_at	NM_022183.2	-18
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Mki67	1374775_at	XM_225460.4	-16
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	1372685_at	NM_001106028.1	-16
cyclin A2	Ccna2	1379582_a_at	NM_053702.3	-15
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1388650_at	NM_022183.2	-13
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	Cfr	1384960_at	NM_031506.1, XM_001062374.1	-13
P4 150 mg/kg/d				
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	Cyp2f4	1368608_at	NM_019303.1	388
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Cyp26a1	1387583_at	NM_130408.2	184
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kcni1	1369451_a_at	NM_017023.1	164
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	1390591_at	NM_153622.2	144
Cd69 molecule	Cd69	1384837_at	NM_134327.1	78
insulin-like growth factor binding protein 1	Igfbp1	1368160_at	NM_013144.1	57
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	Slc4a10	1373326_at	NM_178092.2	41
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 12	Serp1nb12	1376243_at	NM_001135867.1	37
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14	GalNAc-T14	1396238_at	NM_001012109.1	35
aquaporin 8	Aqp8	1368316_at	NM_019158.2	34
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	-103
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	1372685_at	NM_001106028.1	-54
ribonucleotide reductase M2	Rrm2	1393848_at	NM_001025740.1	-36
prion protein 2 (dublet)	Prnd	1384924_at	NM_001102431.1	-33
Ttk protein kinase	Ttk	1379448_at	NM_001108172.1	-29
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1372186_a_at	NM_022183.2	-27
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	Bub1b	1383926_at	XM_342494.3	-27
cyclin A2	Ccna2	1379582_a_at	NM_053702.3	-23
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Mki67	1374775_at	XM_225460.4	-21
cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	1384068_at	XM_224970.4	-19

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikellkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d); B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 24 – Übersicht über die Relative Expression und den entsprechenden FC der 91 Markergene zur Charakterisierung der gemeinsamen Wirkung der vier Progestine am Rattenuterus.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Reference Sequence	Relative Expression (TLDA)			Fold Change (GeneChip)			
			R5020	MPA	P4	R5020	MPA	P4	
Genset 1									
cytochrome P450, family 2, subfamily 1, polypeptide 4	Cyp2f4	NM_019303.1	846		847	1717	186	221	295
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Cyp26a1	NM_130408.2	2099		2366	3118	170	208	205
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kerj1	NM_017023.1	n.v.		n.v.	n.v.	103	202	127
guanylate cyclase activator 2B	Gucac2b	NM_022284.2	4963		10323	3719	77	134	47
insulin-like growth factor binding protein 1	Igfbp1	NM_013144.1	52		69	105	17	19	20
Cd69 molecule	Cd69	NM_134327.1	9		42	52	20	111	100
secreted phosphoprotein 1	Spp1	NM_012881.2	293		384	410	44	41	44
napsin A aspartic peptidase	Napsa	NM_031670.2	39		37	52	27	31	33
aquaporin 8	Aqp8	NM_019158.2	86		88	140	26	30	35
aldolase B, fructose-bisphosphate	Aldob	NM_012496.2	108		222	255	22	46	39
synaptotagmin VI	Syt6	NM_022191.1	n.v.		n.v.	n.v.	19	37	40
oxytocin, prepropeptide	Oxt	NM_012996.2	104		116	104	18	19	18
carbonic anhydrase 4	Car4	NM_019174.1	33		43	51	17	23	22
defensin beta 1	Defb1	NM_031810.1	250		285	331	27	34	31
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	Opcml	NM_053848.1	18		19	23	14	14	10
plasminogen activator, urokinase	Plau	NM_013085.3	21		44	48	14	30	25
guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	Gucac2a	NM_013118.1	517		975	1079	17	31	22
fibrinogen alpha chain	Fga	NM_001008724.1	n.v.		n.v.	n.v.	65	15	11
calbindin 1	Calb1	NM_031984.2	91		109	140	21	24	21
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	Hsd11b1	NM_017080.2	21		32	36	12	15	14
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	Vtcl1	NM_001024244.1	17		26	34	15	22	22
fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	NM_145376.1	68		68	58	9	21	19
chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	NM_019233.1	35		106	108	6	20	16
solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	Slc10a1	NM_017047.1	33		53	75	7	13	14
low density lipoprotein-related protein 2	Lrp2	NM_030827.1	38		56	72	11	18	17
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	NM_012864.2	-29		-4202	-167	-20	-900	-134
Tk protein kinase	Tk	NM_001108172.1	-4		-13	-10	-4	-32	-23
ribonucleotide reductase M2	Rrm2	NM_001025740.1	-6		-15	-11	-4	-16	-13
piron protein 2 (dublet)	Pnd1	NM_001102431.1	-10		-17	-4	-16	-4	-7
cyclin A2	Ccna2	NM_053702.3	-3		-9	-5	-6	-12	-9
cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	XM_224970.4	-3		-5	-5	-7	-16	-6
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	NM_022183.2	-6		-16	-11	-5	-10	-10
antigen identified by monoclonal antibody K6-67	Mki67	XM_225460.4	-5		-16	-9	-7	-10	-12
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	NM_001105028.1	-5		-13	-10	-4	-11	-13
telomerase h	Tnn	NM_001107189.1	n.v.		n.v.	n.v.	-16	-32	-17
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	Bub1b	XM_342494.3	-4		-7	-6	-4	-6	-6
wingless-type MMTV integration site family, member 7A	Wnt7a	XM_342723.3, XM_001062984.1	n.v.		n.v.	n.v.	-4	-10	-5
ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	Ube2t	NM_001108344.2	-3		-11	-9	-4	-5	-5
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Rares1	NM_001014790.1	-8		-16	-9	-9	-14	-11
maternal embryonic leucine zipper kinase	Melk	NM_001108662.1	-4		-12	-9	-3	-6	-6
E2F transcription factor 8	E2f8	XM_218801.4	-7		-14	-5	-4	-5	-5
polo-like kinase 1 (Drosophila)	Plk1	NM_017100.1	-3		-5	-3	-3	-3	-3
solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	Slc16a3	NM_030834.1	-3		-12	-6	-7	-13	-17
DEP domain containing 1	Depdc1	XM_227798.4	-4		-7	-5	-5	-6	-5
transcription factor AP-2, gamma	Tcfap2c	NM_201420.2	-6		-4	-2	-8	-2	-4
stimulated by retinoic acid gene 6	Strag6	NM_001029924.1	-2		-2	-1	-2	-2	-2
tumor-associated calcium signal transducer 2	Tacstd2	NM_001040002.2	-8		-12	-6	-8	-9	-7
protein regulator of cytokinesis 1	Prcl1	NM_001107529.1	-3		-9	-6	-4	-9	-6
kinesin family member 2C	Kif2c	NM_134472.3, NM_001085369.1	-4		-14	-11	-7	-4	-9
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	NM_001013137.2	-3		-4	-3	-3	-3	-4
Genset 2									
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	NM_153622.2	552		443	596	132	134	132
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	Slc4a10	NM_178092.2	88		227	269	33	90	74
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	Abcb1b	NM_012623.2	188		337	381	36	62	64
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	Slco4a1	NM_133608.2	19		18	24	12	10	10
glutamate decarboxylase 1	Gad1	NM_017007.1	29		31	76	6	7	11
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	Ptgds2	NM_031644.2	15		23	31	7	11	12
phenazine biosynthesis-like protein domain containing	Pld1	NM_138530.2	5		10	13	6	17	16
homogenisate 1, 2-oxoxygenase	Hsd1	NM_001012145.1	56		62	70	7	11	10
deoxyribonuclease 1-like 3	Dnase1l3	NM_053907.1	7		17	26	4	10	11
D-amino-acid oxidase	Dao	NM_053626.1	3		6	8	3	15	14
aquaporin 5	Aqp5	NM_012779.1	11		21	26	7	11	11
lipase, gastric	Lipf	NM_017341.1	-34		-6379	-4700	-59	-61	-76
folacin B	Folb	NM_053634.1	-15		-23	-15	-7	-31	-30
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	Slc5a11	NM_001104982.1	n.v.		n.v.	n.v.	-21	-25	-13
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Cdc2	NM_019296.1	-10		-12	-10	-9	-12	-12
cytic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	Cfr	NM_031506.1, XM_001062374.1	-12		-132	-45	-10	-17	-28
SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	Spc25	NM_001009654.1	-3		-8	-6	-3	-5	-5
calcionin/calcitonin-related polypeptide, alpha	Calca	NM_017338.2	-13		-152	-14	-4	-12	-10
cyclin B2	Ccnb2	NM_001009470.1	-2		-4	-2	-3	-6	-5
GLI-Kruppel family member GLI1	Gli1	XM_345832.3	-1		-7	-3	-2	-14	-6
wingless-type MMTV integration site family, member 4	Wnt4	NM_053402.1	-3		-4	-3	-3	-5	-7
aurora kinase B	Aurkb	NM_053749.1	-5		-13	-7	-3	-8	-5
Genset 3									
tetraspanin 3	Tspan3	NM_001005547.1	2		2	3	1	1	1
annexin A2	Anxa2	NM_019895.1	-1		-2	-1	-1	-2	-2
potassium channel, subfamily K, member 1	Kank1	NM_021688.3	1		2	2	1	1	1
CDW92 antigen	Cdw92	NM_053492.2, NM_001033852.1	1		1	2	1	-1	-1
dynein light chain Tctex-type 3	Dynl3	NM_001013228.1	1		1	2	-1	1	1
interferon stimulated exonuclease 20	Isg20	NM_001008510.1	-3		-4	-4	-3	-6	-5
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	Phpp	NM_021657.1	1		1	2	-1	1	1
S100 calcium binding protein B	S100b	NM_013191.1	3		3	4	1	2	1
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	Slc2a13	NM_133811.1	1		1	2	-1	-1	-1
cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	Cyb5b	NM_030586.2	1		-1	1	-2	-2	-2
serum/glucocorticoid regulated kinase 1	Sgk1	NM_019232.2	5		3	3	2	2	2
beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	Bcmo1	NM_053648.2	3		1	2	2	1	1
Genset 4									
complement component 4 binding protein, alpha	C4bpa	NM_012516.2	3		9	3	2	6	1
solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	Slc1a1	NM_013032.3	1		1	2	-1	-1	1
Cd55 molecule	Cd55	NM_022269.2	-4		-3	-2	-6	-4	-3
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	NM_024391.1	3		3	8	1	-1	1
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	NM_031598.3	7		6	8	15	11	11
secreted frizzled-related protein 4	Sfrp4	NM_053544.1	3		2	4	2	2	2
claudin 4	Cldn4	NM_001012022.1	-2		-2	-2	-2	-2	-2

Aufgeführt sind die TLDA- und Affymetrix GeneChip®-Daten des gleichen Probenmaterials von jeweils drei Uterus-Proben der In-vivo-Experimente nach 28-tägiger Behandlung mit der pharmakologisch wirksamen Dosis von R5020, MPA bzw. P4. n.v.: nicht valide (Akzeptanzkriterien nicht erfüllt); grau unterlegt: nicht verifizierte Markergene

Tabelle 25 – Übersicht über die Relative Expression der 78 verifizierten Markergene zur Charakterisierung der gemeinsamen Wirkung der vier Progestine am Rattenuterus.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Reference Sequence	Relative Expression (TLDA)			
			LNG	R5020	MPA	P4
Genset 1						
cytochrome P450, family 2, subfamily 1, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	NM_019303.1	n.v.	846	847	1717
cytochrome P450, family 2G, subfamily A, polypeptide 1	<i>Cyp2a1</i>	NM_130408.2	451	2099	2366	3118
guanylate cyclase activator 2B	<i>Gucy2b</i>	NM_022284.2	n.v.	4963	10323	3719
insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	NM_013144.1	3744	52	69	105
Cd69 molecule	<i>Cd69</i>	NM_134327.1	28	9	42	52
secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	NM_012881.2	39	293	384	410
napsin A aspartic peptidase	<i>Napsa</i>	NM_031670.2	43	39	37	52
aquaporin 8	<i>Aqp8</i>	NM_019158.2	564	86	88	140
aldolase B, fructose-bisphosphate	<i>Aldob</i>	NM_012496.2	222	108	222	255
oxytocin, prepropeptide	<i>Oxt</i>	NM_012996.2	417	104	116	104
carbonic anhydrase 4	<i>Car4</i>	NM_019174.1	48	33	43	51
defensin beta 1	<i>Defb1</i>	NM_031810.1	n.v.	250	285	331
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	<i>Opcm1</i>	NM_053848.1	9	18	19	23
plasminogen activator, urokinase	<i>Plau</i>	NM_013085.3	12	21	44	48
guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	<i>Guca2a</i>	NM_013118.1	n.v.	517	975	1079
calbindin 1	<i>Calb1</i>	NM_031984.2	3	91	109	140
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	<i>Hsd11b1</i>	NM_017080.2	n.v.	21	32	36
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	<i>Vtcr1</i>	NM_001024244.1	37	17	26	34
fatty acid binding protein 5, epidermal	<i>Fabp5</i>	NM_145878.1	7	18	68	58
chemokine (C-C motif) ligand 20	<i>Ccl20</i>	NM_019233.1	11	35	106	108
solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	<i>Slc10a1</i>	NM_017047.1	83	33	53	75
low density lipoprotein-related protein 2	<i>Lrp2</i>	NM_030827.1	11	38	56	72
matrix metalloproteinase 7	<i>Mmp7</i>	NM_012864.2	-33	-29	-4202	-167
Ttk protein kinase	<i>Ttk</i>	NM_001108172.1	-26	-4	-13	-10
ribonucleotide reductase M2	<i>Rrm2</i>	NM_001025740.1	-15	-6	-15	-11
prion protein 2 (dublet)	<i>Prnd</i>	NM_001102431.1	-6	-10	-17	-4
cyclin A2	<i>Ccna2</i>	NM_053702.3	-22	-3	-9	-5
cytoskeleton associated protein 2	<i>Ckap2</i>	XM_224970.4	-10	-3	-5	-5
topoisomerase (DNA) II alpha	<i>Top2a</i>	NM_022183.2	-27	-6	-16	-11
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>Mki67</i>	XM_225460.4	-20	-5	-16	-9
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	<i>Cdkn3</i>	NM_001106028.1	-15	-5	-13	-10
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Bub1b</i>	XM_342494.3	-20	-4	-7	-6
ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	<i>Ube2t</i>	NM_001108344.2	-19	-3	-11	-9
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	<i>Rarres1</i>	NM_001014790.1	-4	-8	-16	-9
maternal embryonic leucine zipper kinase	<i>Melk</i>	NM_001108662.1	-19	-4	-12	-9
E2F transcription factor 8	<i>E2f8</i>	XM_218601.4	-34	-7	-18	-14
polo-like kinase 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>Plk1</i>	NM_017100.1	-11	-3	-5	-3
solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	<i>Slc16a3</i>	NM_030834.1	-2	-3	-12	-6
DEP domain containing 1	<i>Depdc1</i>	XM_227798.4	-14	-4	-7	-5
transcription factor AP-2, gamma	<i>Tcfap2c</i>	NM_201420.2	-5	-6	-4	-2
stimulated by retinoic acid gene 6	<i>Strap6</i>	NM_001029324.1	-12	-2	-2	-1
tumor-associated calcium signal transducer 2	<i>Tacstd2</i>	NM_001009540.2	-11	-8	-12	-6
protein regulator of cytokinesis 1	<i>Prc1</i>	NM_001107529.1	-9	-3	-9	-6
kinesin family member 2C	<i>Kif2c</i>	NM_134472.3,NM_001085369.1	-29	-4	-14	-11
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	<i>Cxcl14</i>	NM_001013137.2	-17	-3	-4	-3
Genset 2						
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	<i>Slc17a3</i>	NM_153622.2	n.v.	552	443	596
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	<i>Slc4a10</i>	NM_178092.2	90	88	227	269
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	<i>Abcb1b</i>	NM_012623.2	111	188	337	381
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	<i>Slco4a1</i>	NM_133608.2	60	19	18	24
glutamate decarboxylase 1	<i>Gad1</i>	NM_017007.1	181	29	31	76
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	<i>Ptgfs2</i>	NM_031644.2	12	15	23	31
phenazine biosynthesis-like protein domain containing	<i>Pbld</i>	NM_138530.2	15	5	10	13
homogentisate 1, 2-dioxygenase	<i>Hgd</i>	NM_001012145.1	13	56	62	70
deoxyribonuclease 1-like 3	<i>Dnase1l3</i>	NM_053907.1	12	7	17	26
D-amino-acid oxidase	<i>Dao</i>	NM_053626.1	4	3	6	8
aquaporin 5	<i>Aqp5</i>	NM_012779.1	13	11	21	26
lipase, gastric	<i>Lipf</i>	NM_017341.1	n.v.	-34	-6379	-4700
ficollin B	<i>Fcnb</i>	NM_053634.1	-5	-15	-23	-15
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	<i>Cdc2</i>	NM_019296.1	-14	-10	-12	-10
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	<i>Cfr</i>	NM_031506.1, XM_001062374.1	-1	-12	-132	-45
SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Spc25</i>	NM_001009654.1	-14	-3	-8	-6
calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	<i>Calca</i>	NM_017338.2	-31	-13	-152	-14
cyclin B2	<i>Ccnb2</i>	NM_001009470.1	-11	-2	-4	-2
GLI-Kruppel family member GLI1	<i>Gli1</i>	XM_345832.3	-7	-1	-7	-3
wingless-type MMTV integration site family, member 4	<i>Wnt4</i>	NM_053402.1	-4	-3	-4	-3
aurora kinase B	<i>Aurkb</i>	NM_053749.1	-18	-5	-13	-7
Genset 3						
tetraspanin 3	<i>Tspan3</i>	NM_001005547.1	-1	2	2	3
annexin A2	<i>Anxa2</i>	NM_019905.1	1	-1	-2	-1
potassium channel, subfamily K, member 1	<i>Kcnk1</i>	NM_021688.3	3	1	2	2
interferon stimulated exonuclease 20	<i>Isg20</i>	NM_001008510.1	-1	-3	-4	-4
S100 calcium binding protein B	<i>S100b</i>	NM_013191.1	2	3	3	4
serum/glucocorticoid regulated kinase 1	<i>Sgk1</i>	NM_019232.2	2	5	3	3
beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	<i>Bcmo1</i>	NM_053648.2	3	3	1	2
Genset 4						
complement component 4 binding protein, alpha	<i>C4bpa</i>	NM_012516.2	n.v.	3	9	3
Cd55 molecule	<i>Cd55</i>	NM_022269.2	-1	-4	-3	-2
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	<i>Pla2g2a</i>	NM_031598.3	3	7	6	8
secreted frizzled-related protein 4	<i>Sfrp4</i>	NM_053544.1	7	3	2	4
claudin 4	<i>Cldn4</i>	NM_001012022.1	-4	-2	-2	-2

Aufgeführt sind die TLDA-Daten der sechs Uterus-Proben des In-vivo-Experiments nach 28-tägiger Behandlung mit der pharmakologisch wirksamen Dosis von LNG gegenüber den TLDA-Daten zur Verifizierung der Markergene. n.v.: nicht valide (Akzeptanzkriterien nicht erfüllt); grau unterlegt: nicht bestätigte Markergene

Tabelle 26 B – Vergleich der Relativen Expression der 68 festgelegten Markergene im In-vitro-Probenmaterial mit deren FCs im In-vivo-Probenmaterial.

GeneSymbol	Reference Sequence	Relative Expression (TLDA)						Fold Change (GeneChip)				
		PRL 10 nM	100 nM	R5020 10 nM	100 nM	MFA 100 nM	P4 100 nM	1000 nM	P4 1000 nM	MPA R5020		
Genset1												
<i>Cyp26a1</i>	NM_130408.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	178	164	200	218
<i>Insulin-like growth factor binding protein 1</i>	NM_013144.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	60	56	61	65
<i>Cd69 molecule</i>	NM_134327.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	80	64	57	68
secreted phosphoprotein 1	NM_012881.2	1	1	1	1	1	1	1	36	16	56	54
<i>Napsa</i>	NM_031670.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	50	42	46	45
<i>Aquaporin 8</i>	NM_019158.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	21	28	41	49
<i>aldolase B, fructose-bisphosphate</i>	NM_012486.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	26	33	32	35
<i>oxytocin, prepropeptide</i>	NM_012986.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	18	33	29	21
<i>carbonic anhydrase 4</i>	NM_019174.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	25	21	28	28
<i>cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1</i>	NM_035846.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	19	22	22	9
<i>plasma renin activator, urokinase</i>	NM_031984.2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	18	16	18	22
<i>Urokinase-type 1 plasminogen activator</i>	NM_019244.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	17	14	19	16
<i>V-set domain containing T cell activation inhibitor 1</i>	NM_145878.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	11	12	21	17
<i>epidermal keratin, type I, member 1</i>	NM_019233.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11	9	15	19
<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	NM_017047.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	15	9	15	19
<i>low density lipoprotein-related protein 2</i>	NM_030927.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9	11	19	15
<i>matrix metalloproteinase 7</i>	NM_012864.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-20	-37	-257	-54
<i>Ttk protein kinase</i>	NM_00108172.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-16	-10	-33	-61
<i>ribonucleotide reductase M2</i>	NM_001025740.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-9	-12	-19	-25
<i>prion protein 2 (dubie)</i>	NM_00102431.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-13	-7	-32	-12
cyclin A2	NM_053702.3	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-13	-11	-18	-15
<i>cytoskeleton associated protein 2</i>	NM_224970.4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-22	-9	-18	-8
<i>topoisomerase (DNA) II alpha</i>	NM_022183.2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-10	-8	-15	-18
<i>antigen identified by monoclonal antibody K-67</i>	NM_225460.4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-11	-9	-14	-16
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	NM_00106028.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-7	-6	-20	-16
<i>bubbling uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)</i>	NM_342894.3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-12	-11	-11	-13
<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)</i>	NM_00103544.2	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-5	-5	-5	-12
<i>retinoic acid receptor responder (retazotene induced) 1</i>	NM_001079360.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-7	-8	-10	-8
<i>retinal embryonic leucine zipper kinase</i>	NM_019862.1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-10	-9	-8	-9
<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>	NM_211890.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-7	-7	-10	-8
<i>Pfk1</i>	NM_017001.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-6	-6	-9	-9
Scler16a3	NM_030834.1	-2	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-6	-9	-9	-8
<i>DEP domain containing 1</i>	NM_227984.4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-5	-7	-9	-9
<i>Tcfap2c</i>	NM_201420.2	1	1	1	1	1	1	1	-5	-13	-7	-5
<i>transcription factor AP-2, gamma</i>	NM_001028924.1	1	1	1	1	1	1	1	-10	-12	-3	-3
<i>stimulated by retinoic acid gene 6</i>	NM_001008540.2	2	2	2	2	2	2	2	-7	-8	-6	-6
<i>tumor-associated calcium signal transducer 2</i>	NM_001107529.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-6	-5	-7	-7
<i>protein regulator of cytokinesis 1</i>	NM_134472.3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-5	-7	-6	-7
<i>kinasin family member 2C</i>	NM_001085389.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-5	-7	-6	-7
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	NM_001013137.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-7	-5	-5	-6
Genset2												
<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10</i>	NM_176992.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	76	62	120	91
<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B</i>	NM_012623.2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	23	43	56	49
<i>solute carrier organic anion transporter family, member 4b1</i>	NM_133698.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11	22	18	15
<i>glutamate decarboxylase 1</i>	NM_017007.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	12	9	13	18
<i>prostaglandin G2 synthase 2, hematopoietic</i>	NM_031644.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	14	10	12	16
<i>phenazine biosynthesis-like protein domain containing</i>	NM_138530.2	1	-3	1	-1	1	-1	1	7	11	13	18
homoglutathione 1, 2-oxo-lysinase	NM_05007145.1	2	1	2	2	2	2	2	10	8	11	13
<i>deoxyribonuclease F-like 3</i>	NM_053825.1	2	2	2	2	2	2	2	11	10	14	13
<i>aquaporin 5</i>	NM_012779.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	8	9	20	12
<i>ficlin B</i>	NM_053634.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-16	n.d.	-25	-24
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	NM_019266.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-6	-9	-12	-12
<i>cyclic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog</i>	NM_031506.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.d.	n.d.	-12	-11
<i>SFPC25, NDC80 ninecholesterol complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>	NM_001009654.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-9	-5	-8	-8
<i>calcaionin/calcaionin-related polypeptide, alpha</i>	NM_017338.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cyclin B2	NM_001009470.1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-6	-5	-8	-7
<i>GLL-Kruppel family member GLL1</i>	NM_345832.3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	n.d.	n.d.	-12	-10
<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>	NM_063402.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-7	-9	-7	-9
<i>aurora kinase B</i>	NM_053749.1	1	1	1	1	1	1	1	-6	-4	-7	-6
Genset3												
<i>potassium channel, subfamily K, member 1</i>	NM_021688.3	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	1	1	2	1
<i>interferon stimulatory exonuclease 20</i>	NM_001008510.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-3	-3	-3	-3
<i>S100 calcium binding protein B</i>	NM_013191.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	2	1
serum glucocorticoid regulated kinase 1	NM_019232.2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2
<i>beta-caladine 151/151-methoxygenase 1</i>	NM_055946.2	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	2	1
Genset4												
<i>Cd65 molecule</i>	NM_022269.2	-1	1	1	1	1	1	1	-2	-4	-3	-2
<i>phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)</i>	NM_031598.3	-1	1	1	1	1	1	1	-1	4	6	9
<i>secreted frizzled-related protein 4</i>	NM_053544.1	-1	1	1	1	1	1	1	2	4	2	2
<i>glauclin 4</i>	NM_001012022.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-2	-2	-2	-2

Aufgeführt sind die TLDA-Daten des gepoolten ELT 3-Probenmaterials der In-vitro-Experimente nach 6-, 12-, 24- und 24-stündiger (C) Inkubation mit der niedrigen und hohen Konzentration von PRL, R5020, MPA und P4 gegenüber den Affymetrix GeneChip®-Daten der jeweils sechs Uterus-Proben der In-vivo-Experimente nach 28-tägiger Applikation der pharmakologisch wirksamen Dosis von PRL, R5020, MPA und P4, n.d.: nicht detektiert; n.v.: nicht valid (Akzeptanzkriterien nicht erfüllt); grau unterlegt: nicht anwendbare und vom Vergleich ausgeschlossene Markergene; fett: anwendbare Markergene

Tabelle 26 C – Vergleich der Relativen Expression der 68 festgelegten Markergene im In-vitro-Probenmaterial mit deren FCs im In-vivo-Probenmaterial.

GeneSymbol	Reference Sequence	Relative Expression (TLDA)				Fold Change (GeneChip)						
		PRL 10 nM	100 nM	R5020 10 nM	P4 100 nM	PRL 1000 nM	1000 nM	MPA 100 nM	MPA R5020			
Genset1												
<i>Cyp26a1</i>	NM_130408.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	178	164	200	218
<i>Insulin-like growth factor binding protein 1</i>	NM_013144.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	60	56	61	65
<i>Cd69 molecule</i>	NM_134327.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	80	16	57	68
<i>secreted phosphoprotein 1</i>	NM_012881.2	1	1	-1	2	2	1	1	36	64	56	54
<i>Napsa</i>	NM_031670.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	50	42	46	45
<i>aquaporin 8</i>	NM_019158.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	21	28	41	49
<i>aldolase B, fructose-bisphosphate</i>	NM_012486.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	26	33	35	32
<i>oxytocin, prepropeptide</i>	NM_012896.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	18	33	29	21
<i>carbonic anhydrase 4</i>	NM_019174.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	25	21	28	28
<i>opoid binding protein/cell adhesion molecule-like</i>	NM_035866.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	21	18	26	9
<i>plasmaogen activator, urokinase</i>	NM_031984.2	-1	-1	-1	2	2	1	1	18	16	23	22
<i>Cttnb1</i>	NM_019244.1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	11	14	17	16
<i>V-set domain containing T cell activation inhibitor 1</i>	NM_145878.1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	11	12	21	17
<i>formyl acid binding protein 5, epididymal</i>	NM_019233.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11	9	15	19
<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	NM_017047.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11	9	15	19
<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	NM_030927.1	1	2	2	2	2	2	2	9	11	19	15
<i>low density lipoprotein-related protein 2</i>	NM_019233.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	15	9	15	19
<i>solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1</i>	NM_017047.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11	9	15	19
<i>matrix metalloproteinase 7</i>	NM_012864.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-20	-37	-257	-54
<i>Ttk protein kinase</i>	NM_00108172.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-16	-10	-33	-61
<i>ribonucleotide reductase M2</i>	NM_001025740.1	1	-1	-1	1	1	1	1	-9	-12	-19	-25
<i>prion protein 2 (dubie)</i>	NM_00102431.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-13	-7	-32	-12
<i>cyclin A2</i>	NM_053702.3	-1	-1	-1	1	1	1	1	-13	-11	-18	-15
<i>cytoskeleton associated protein 2</i>	NM_224970.4	1	1	1	1	1	1	1	-22	-9	-18	-8
<i>topoisomerase (DNA) II alpha</i>	NM_022183.2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-10	-8	-15	-18
<i>antigen identified by monoclonal antibody K-67</i>	NM_225460.4	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-11	-9	-14	-16
<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 3</i>	NM_00106028.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-7	-6	-20	-16
<i>bubbling uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)</i>	NM_342843.3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-12	-11	-11	-13
<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)</i>	NM_00103344.2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-10	-5	-5	-12
<i>retinoic acid receptor responder (retazotene induced) 1</i>	NM_001079360.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-7	-8	-10	-8
<i>hematopoietic nuclear zipper kinase</i>	NM_019862.1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-10	-8	-9	-8
<i>CD4-like kinase 1 (Drosophila)</i>	NM_211809.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-7	-7	-10	-8
<i>Pik1</i>	NM_017001.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-6	-6	-9	-8
<i>Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)</i>	NM_030834.1	-2	-2	-1	1	1	1	1	-5	-7	-9	-8
<i>DEP domain containing 1</i>	NM_227984.4	-2	-2	-1	1	1	1	1	-5	-13	-7	-5
<i>Tcfap2c</i>	NM_201420.2	-1	-1	-1	1	1	1	1	-5	-10	-3	-3
<i>transcription factor AP-2, gamma</i>	NM_001028924.1	-1	-1	-1	2	2	2	2	-10	-12	-3	-3
<i>stimulated by retinoic acid gene 6</i>	NM_001098540.2	-1	-1	-1	1	1	1	1	-7	-8	-6	-6
<i>tumor-associated calcium signal transducer 2</i>	NM_001098540.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-7	-8	-6	-6
<i>protein regulator of cytokinesis 1</i>	NM_001107529.1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-6	-5	-9	-7
<i>kinesin family member 2C</i>	NM_134472.3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-5	-7	-6	-7
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	NM_001013137.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-4	-7	-5	-6
Genset2												
<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10</i>	NM_176992.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	76	62	120	91
<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B</i>	NM_012623.2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	23	43	56	49
<i>solute carrier organic anion transporter family, member 4b1</i>	NM_133698.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11	22	18	15
<i>glutamate decarboxylase 1</i>	NM_017007.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	12	9	13	18
<i>prostaglandin G2 synthase 2, hematopoietic</i>	NM_031644.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	14	10	12	16
<i>phenazine biosynthesis-like protein domain containing</i>	NM_138530.2	-1	-1	-2	3	3	3	3	11	7	13	18
<i>homogentisate 1, 2-dioxygenase</i>	NM_00121465.1	1	2	2	3	3	3	3	10	8	11	15
<i>acylphosphatase kinase 3</i>	NM_039826.1	-2	-1	-1	4	4	4	4	11	10	16	13
<i>aquaporin 5</i>	NM_012791.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	8	9	12	12
<i>ficollin B</i>	NM_053634.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-16	n.d.	-25	-24
<i>cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M</i>	NM_019296.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-6	-9	-12	-12
<i>glycyl fibrosis transmembrane conductance regulator homolog</i>	NM_031606.1	XM_001062374.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.d.	n.d.	-12	-11
<i>SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>	NM_001009654.1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-9	-5	-8	-8
<i>calcitriol/calcitriol-related polypeptide, alpha</i>	NM_017338.2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>calcitriol/calcitriol-related polypeptide, beta</i>	NM_001009470.1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-6	-5	-8	-7
<i>cyclin B2</i>	XM_345832.3	-1	-1	2	1	1	1	1	n.d.	n.d.	-12	-10
<i>Gli1</i>	XM_345832.3	-1	-1	-3	-1	-1	-1	-1	n.d.	n.d.	-7	-9
<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>	NM_063402.1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-6	-4	-7	-6
<i>aurora kinase B</i>	NM_053749.1	-1	-2	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1
Genset3												
<i>potassium channel, subfamily K, member 1</i>	NM_021688.3	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	1	1	2	1
<i>interferon stimulator exonuclease 20</i>	NM_001008510.1	1	1	1	1	1	1	1	-3	-3	-3	-3
<i>S100 calcium binding protein B</i>	NM_013191.1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	2	1
<i>serum glucocorticoid regulated kinase 1</i>	NM_019232.2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2
<i>Beta-caladene 13/15-monoxygenase 1</i>	NM_053646.2	2	2	3	4	4	4	4	-1	-1	2	1
Genset4												
<i>Cd65 molecule</i>	NM_022269.2	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-2	-4	-3	-2
<i>phosphoglucose A2, group IIA (platelets, synovial fluid)</i>	NM_031598.3	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4	6
<i>secreted frizzled-related protein 4</i>	NM_053544.1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2	4	2	2
<i>glutathin 4</i>	NM_001012022.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-2	-2	-2	-2

Aufgeführt sind die TLDA-Daten des gepoolten ELT 3-Probenmaterials der In-vitro-Experimente nach 6- (A), 12- (B) und 24-stündiger (C) Inkubation mit der niedrigen und hohen Konzentration von PRL, R5020, MPA und P4 gegenüber den Affymetrix GeneChip®-Daten der jeweils sechs Uterus-Proben der In-vivo-Experimente nach 28-tägiger Applikation der pharmakologisch wirksamen Dosis von PRL, R5020, MPA und P4, n.d.: nicht detektiert; n.v.: nicht detektiert; nicht anwendbar und vom Vergleich ausgeschlossene Markergene; fett: anwendbare Markergene

Tabelle 27 A – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene in der Mamma nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>) PRL 10 µg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
common salivary protein 1	LOC171161	1367968_at	NM_133622.1	54
myxovirus (influenza virus) resistance 2	Mx2	1369202_at	NM_134350.2	10
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	9
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	7
tektin 3	Tekt3	1380267_at	NM_001024739.1	5
crumbs homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	Crb3	1384531_at	NM_001025661.1	5
folliculin-like 4	Fslf4	1396896_at	NM_001107000.1	5
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	5
G0/G1 switch 2	G0s2	1388395_at	NM_001009632.1	4
claudin 6	Cldn6	1384442_at	NM_001102364.1	4
A-type potassium channel modulatory protein 2	Kchlp2	1368639_at	NM_001034005.1	-6
carbonic anhydrase 4	Car4	1368437_at	NM_019174.1	-6
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	1368128_at	NM_001598.3	-5
fibrogen alpha chain	Fga	1371258_at	NM_001008724.1	-4
phenylalanine hydroxylase	Pah	1387034_at	NM_012619.2	-4
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform	Ppp2r2a	1369221_at	NM_053999.2	-4
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Wisp2	1369484_at	NM_031590.1	-4
mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	Muc5ac	1371009_at	XM_001063331.3	-4
homeo box B8	Hoxb8	1380142_at	NM_001191649.1	-4
ectodermal-neural cortex 1	Erc1	1382710_at	NM_001003401.1	-4
PRL 10 µg/kg/d				
common salivary protein 1	LOC171161	1367968_at	NM_133622.1	196
alcohol dehydrogenase 1 (class I)	Adh1	1368021_at	NM_019286.3	64
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	37
WAP four-disulfide core domain 3	Wfdc3	1388605_at	NM_001106541.1	36
melan-A	Mlana	1390596_at	NM_001106348.1	33
casein beta	Csr2	1368913_at	NM_017120.2	32
lactoperoxidase	Lpo	1377429_at	NM_001105829.1	24
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	23
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	23
kallikrein, submaxillary gland S3	Klks3	1370289_x_at	NM_175759.2	21
regenerating islet-derived 3 alpha	Reg3a	1387930_at	NM_001145846.2	-23
matrix metalloproteinase 9	Mmp9	1398275_at	NM_031055.1	-14
troponin T type 2 (cardiac)	Tnnt2	1367592_at	NM_012676.1	-13
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	1368128_at	NM_031598.3	-12
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	Serpinc10	1385759_at	NM_153733.2	-11
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	Gp2	1386933_at	NM_134418.1	-9
chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	Cxcl6	1387648_at	NM_022214.1	-7
small AirGAP2	Smap2	1391204_at	NM_001100669.1	-7
activating transcription factor 3	Atf3	1369268_at	NM_012912.1	-6
fibroblast growth factor 18	Fgf18	1370106_at	NM_019199.1	-6

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikellkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0.01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d); B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 27 B – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene in der Mamma nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>) R5020 100 µg/kg/d	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
casein beta	Csn2	1368913_at	NM_017120.2	30
common salivary protein 1	LOC171161	1367968_at	NM_133622.1	28
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	12
speedy homolog A (<i>Xenopus laevis</i>)	Spdya	1381158_at	NM_138855.1	10
WAP four-disulfide core domain 3	Wfdc3	1388605_at	NM_001106541.1	10
lactoperoxidase	Lpo	1377429_at	NM_00105829.1	9
kininogen 1-like 1	Krng1l1	1387050_s_at	NM_001009628.1	6
follicle-stimulating-like 4	Fsl4	1396896_at	NM_001107000.1	6
taste receptor, type 2, member 13	Tas2r13	1369574_at	NM_023998.1	6
involutin	Ivl	1369846_at	NM_022195.1	6
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	Gp2	1386933_at	NM_134418.1	-11
ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	Rnase2	1378419_at	NM_001007015.1	-8
major urinary protein 5	Mup5	1370779_x_at	NM_203325.1	-7
natriuretic peptide precursor B	Nppb	1367616_at	NM_031545.1	-6
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Ntrk2	1370652_at	NM_001163168.1	-5
regenerating islet-derived 3 alpha	Reg3a	1387930_at	NM_001145846.2	-5
neuropeptide W	Npw	1391059_at	NM_153294.1	-5
tropoin T type 2 (cardiac)	Tnnt2	1367592_at	NM_012676.1	-5
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2	Ms4a2	1370783_a_at	NM_012845.1	-4
ectodermal-neural cortex 1	Enc1	1382710_at	NM_001003401.1	-4
R5020 1000 µg/kg/d				
casein beta	Csn2	1368913_at	NM_017120.2	28
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	17
WAP four-disulfide core domain 3	Wfdc3	1388605_at	NM_001106541.1	15
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	14
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	8
extracellular proteinase inhibitor	Expi	1387715_at	NM_133537.1	6
testis specific, T3	Tsge13	1393628_at	NM_001107851.1	6
cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Cyp1a1	1370269_at	NM_012540.2	6
lactoperoxidase	Lpo	1377429_at	NM_001105829.1	6
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kcnj1	1369451_a_at	NM_017023.1	5
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	1370355_at	NM_139192.2	-6
amphiregulin	Areg	1369871_at	NM_017123.1	-6
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	Gp2	1386933_at	NM_134418.1	-6
albumin	Alb	1367555_at	NM_134326.2	-4
heat shock protein 12B	Hspa12b	1389604_at	NM_001107778.1	-4
progesterone receptor	Pgr	1387563_at	NM_022847.1	-3
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Hif1a	1368149_at	NM_024359.1	-3
inhibitor of DNA binding 4	Id4	1375120_at	NM_175582.1	-3
SLIT and NTRK-like family, member 1	Slitrk1	1391019_at	NM_001107283.1	-3
solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2	Slc18a2	1369131_at	NM_013031.1	-3

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d), B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d), C: MPA (1 und 10 mg/kg/d), D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 27 C – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene in der Mamma nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
MPA 1 mg/kg/d				
WAP four-disulfide core domain 3	Wfdc3	1388605_at	NM_001106541.1	205
melan-A	Mlana	1390596_at	NM_001106348.1	65
alcohol dehydrogenase 1 (class I)	Adh1	1368021_at	NM_019286.3	35
common salivary protein 1	LOC171161	1367968_at	NM_133622.1	34
casein beta	Csn2	1368913_at	NM_017120.2	31
lactoperoxidase	Lpo	1377429_at	NM_001105829.1	31
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	29
whley acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	24
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	21
probasin	Pbsn	1387191_at	NM_019125.1	18
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	Gp2	1386933_at	NM_134418.1	-15
regenerating islet-derived 3 alpha	Reg3a	1387930_at	NM_001145846.2	-12
tropoin T type 2 (cardiac)	Tnnt2	1367592_at	NM_012676.1	-5
histamine receptor H 1	Hrh1	1369855_at	NM_017018.1	-5
cordon-bleu homolog (mouse)	Cobl	1381941_at	NM_001107236.1	-5
neuronal cell adhesion molecule	Nrcam	1371036_at	NM_013150.1	-4
fibroblast growth factor receptor 2, transcript variant b	Fgfr2	1371179_a_at	NM_001109892.1	-4
poly(rC) binding protein 3	Pcbp3	1383274_at	NM_001011945.1	-4
MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A (yeast)	Mobk1a	1397533_at	NM_001108357.1	-4
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	Abca4	1384603_at	NM_001107721.1	-4
MPA 10 mg/kg/d				
WAP four-disulfide core domain 3	Wfdc3	1388605_at	NM_001106541.1	656
proline rich, lacrimal 1	Pro11	1387014_at	NM_133513.1	556
stefin A3	Stfa3	1398063_x_at	NM_001105877.1	358
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	111
surfactant protein D	Sftpd	1387315_at	NM_012878.1	51
L-amino acid oxidase 1	Lao1	1385064_at	NM_001106682.1	38
fatty acid synthase	Fasn	1367707_at	NM_017332.1	36
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	33
casein beta	Csn2	1368913_at	NM_017120.2	31
whley acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	26
amphiregulin	Areg	1369871_at	NM_017123.1	-13
olfactory receptor 1641	Olr1641	1371268_at	NM_001000100.1	-7
regenerating islet-derived 3 alpha	Reg3a	1387930_at	NM_001145846.2	-6
brain derived neurotrophic factor	Bdnf	1368677_at	NM_012513.3	-5
wingless-type MMTV integration site family, member 5B	Wnt5b	1374970_at	NM_001100489.1	-5
kinesin family member 5C	Kif5c	1395997_at	NM_001107730.1	-5
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Hif1a	1368149_at	NM_024359.1	-5
progesterone receptor	Pgr	1387563_at	NM_022847.1	-5
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 19	Adamts19	1379586_at	NM_001108433.1	-5
RAS-like family, 11 member B	Rasi11b	1383322_at	NM_001002830.2	-5

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d); B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 27 D – Übersicht über die am stärksten deregulierten Gene in der Mamma nach Applikation der einzelnen Gestagene und Dosierungen.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change
P4 15 mg/kg/d				
melan-A	Mlna	1390596_at	NM_001106348.1	33
casein beta	Csn2	1368913_at	NM_017120.2	30
WAP four-disulfide core domain 3	Wfdc3	1388605_at	NM_001106541.1	24
common salivary protein 1	LOC171161	1367968_at	NM_133622.1	22
alcohol dehydrogenase 1 (class I)	Adh1	1368021_at	NM_019286.3	18
kallikrein, submaxillary gland S3	Klks3	1370289_x_at	NM_175759.2	18
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_031703.1	16
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	16
fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3	1367660_at	NM_024162.1	13
folliculin-like 4	Fsl4	1396896_at	NM_001107000.1	11
troponin T type 2 (cardiac)	Tnnt2	1367592_at	NM_012676.1	-9
neurofibromin 2 (merlin)	Nf2	1396346_at	NM_013193.1	-7
regenerating islet-derived 3 alpha	Reg3a	1387930_at	NM_001145846.2	-6
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	Gp2	1386933_at	NM_134418.1	-5
leucine rich repeat containing 4	Lrrc4	1385754_s_at	NM_001037336.1	-4
ectodermal-neural cortex 1	Enc1	1382710_at	NM_001003401.1	-4
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Hif1a	1368149_at	NM_024359.1	-4
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	Cxcl1	1387316_at	NM_030845.1	-3
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3, transcript variant 2	Nr4a3	1369067_at	NM_017352.1	-3
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	1387391_at	NM_080782.3	-3
P4 150 mg/kg/d				
casein beta	Csn2	1368913_at	NM_017120.2	17
aquaporin 3	Aqp3	1387100_at	NM_001703.1	12
kininogen 1-like 1	Kng1l1	1387050_s_at	NM_001009628.1	12
whey acidic protein	Wap	1387751_at	NM_053751.4	9
speedy homolog A (<i>Xenopus laevis</i>)	Spdya	1381158_at	NM_138855.1	8
taste receptor, type 2, member 13	Tas2r13	1369574_at	NM_023998.1	6
crumbs homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	Crb3	1384531_at	NM_001025661.1	5
roundabout homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	Robo3	1380370_at	NM_001108135.1	4
stimulator of chondrogenesis 1	Scrg1	1368978_at	NM_033499.1	4
transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	Trpv1	1370675_at	NM_031982.1	4
amphiregulin	Areg	1369871_at	NM_017123.1	-13
ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	Ube2v1	1385820_at	NM_001110345.2	-5
kallikrein related-peptidase 8	Klkb	1384503_at	NM_001107509.1	-5
adenylate cyclase 8 (brain)	Acyl8	1387179_at	NM_017142.1	-5
phospholipase D family, member 3	Plb3	1380661_at	NM_001012167.1	-4
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	Gp2	1386933_at	NM_134418.1	-4
chemokine (C-C motif) ligand 11	Ccl11	1387319_at	NM_019205.1	-4
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 19	Adamts19	1379586_at	NM_001108433.1	-3
mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	Muc5ac	1371009_at	NM_001063331.3	-3
progesterone receptor	Pgr	1387563_at	NM_022847.1	-3

Dargestellt sind je zehn der am stärksten induzierten und reprimierten Gene der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Vehikeikontrollen (Student's t-Test, $p \leq 0,01$; $FC \geq 2$).
A: PRL (10 und 100 µg/kg/d); B: R5020 (100 und 1000 µg/kg/d); C: MPA (1 und 10 mg/kg/d); D: P4 (15 und 150 mg/kg/d)

Tabelle 28 – Übersicht über die funktionelle Kategorisierung der identifizierten Markergene zur Charakterisierung des gemeinsamen Gestageneffekts am Rattenuterus bei pharmakologisch wirksamer Dosis der vier Testsubstanzen.

Genname (<i>Rattus norvegicus</i>)	Gensymbol	Affymetrix ID	Reference Sequence	Fold Change			
				PRL	R5020	MPA	P4
Reproduktion							
alkalase B, fructose-bisphosphate	Akbob	1370299_at	NM_012496.2	26	24	35	32
annexin A2	Anxa2	Rn01530533_g1	NM_019905.1	-2	1	-1	-2
aquaporin 5	Aqp5	1368469_at	NM_012779.1	8	9	12	12
aquaporin 8	Aqp8	1368316_at	NM_019155.2	21	28	41	49
calbindin 1	Calb1	1370201_at	NM_031984.2	18	18	16	19
calcionin/calcionin-related polypeptide, alpha	Calca	1369116_a_at	NM_017338.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ca99 molecule	Ca99	1384837_at	NM_134327.1	80	16	57	68
claudin 4	Cldn4	Rn01198224_s1	NM_001012022.1	-2	-2	-2	-2
complement component 4 binding protein, alpha	C4bpa	Rn00560896_m1	NM_021516.2	2	2	9	4
cyclic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	Cfr	1384960_at	NM_031506.1_XM_001062374.1	n.d.	-12	-11	-13
cytochrome P450, family 25, subfamily A, polypeptide 1	Cyp2a1	1387583_at	NM_130468.2	178	164	200	218
GLI-Kruppel family member GLI1	Gli1	1378720_at	XM_345832.3	n.d.	n.d.	-12	-10
guanylate cyclase activator 2B	Gucy2b	1387253_at	NM_022284.2	22	23	178	72
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	Rn00577779_m1	NM_024391.1	2	1	1	2
low density lipoprotein-related protein 2	Lrp2	1367952_at	NM_030827.1	9	11	9	15
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	-20	-37	-257	-54
oxytocin, prepropeptide	Oxt	1368312_at	NM_012996.2	18	33	29	21
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	Rn00582629_m1	NM_031598.3	-1	4	6	9
plasminogen activator, urokinase	Plau	1398287_at	NM_013085.3	16	16	25	22
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kcnj1	1368451_a_at	NM_017023.1	122	141	230	174
prior protein 2 (double)	Prip2	1384924_at	NM_001102431.1	-13	-7	-32	-12
secreted frizzled-related protein 4	Sfrp4	Rn0058449_m1	NM_031598.3	2	4	2	2
secreted phosphoprotein 1	Spp1	1367581_a_at	NM_012881.2	36	64	56	54
serumglucocorticoid regulated kinase 1	Sgk1	Rn00570285_m1	NM_019232.2	3	3	2	2
tenascin N	Tnn	1371933_at	NM_001107189.1	-14	-14	-14	-14
tumor-associated calcium signal transducer 2	Tacs2	1391509_at	NM_001009540.2	-7	-8	-6	-6
ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	Ube2t	1390481_a_at	NM_001108344.2	-10	-5	-5	-12
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	Vctn1	1380134_at	NM_001024244.1	17	14	17	16
wingless-type MMTV integrator site family, member 4	Wnt4	1368641_at	NM_053402.1	n.d.	-7	-9	-7
wingless-type MMTV integrator site family, member 7A	Wnt7a	1380958_at	XM_342723.3_XM_001062984.1	-6	-9	-11	-11
Proliferation/Differenzierung							
antigen identified by monoclonal antibody K6-7	Mki67	1374775_at	XM_225460.4	-11	-9	-14	-16
binding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	Bub1b	1383926_at	XM_342843.3	-12	-11	-11	-13
cyclin A2	Cona2	1379582_a_at	NM_053702.3	-13	-11	-13	-13
cyclin B2	Conb2	1389566_at	NM_001009470.1	-6	-5	-8	-7
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	1372685_at	NM_001106028.1	-7	-6	-20	-16
cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	1384068_at	NM_224970.4	-22	-9	-18	-8
DEP domain containing 1	Depc1	1370914_at	NM_027738.4	-5	-6	-9	-9
insulin-like growth factor binding protein 1	Igf1bp1	1368160_at	NM_013144.1	60	56	61	65
maternal embryonic leucine zipper kinase	Meik	1389795_at	NM_001108662.1	-10	-5	-27	-8
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	-20	-37	-257	-54
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	Rn00580999_m1	NM_031598.3	-1	4	6	9
polo-like kinase 1 (Drosophila)	Plk1	1370297_at	NM_017100.1	-7	-7	-10	-8
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Rares1	1382274_at	NM_00114790.1	-7	-8	-10	-8
stimulated by retinoic acid gene 6	Rarg6	1390194_at; 1376962_at	NM_001029294.1	-1	14	-12	-3
tenascin N	Tnn	1379331_at	NM_001107189.1	-14	-14	-13	-12
tetraspanin 3	Tspan3	Rn01421801_m1	NM_001005547.1	-1	1	1	1
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1372186_a_at; 1388650_at	NM_022183.2	-10	-8	-15	-18
transcription factor AP-2, gamma	Tcfap2c	1383937_at	NM_201420.2	-5	-13	-7	-5
wingless-type MMTV integrator site family, member 7A	Wnt7a	1380958_at	XM_342723.3_XM_001062984.1	-6	-9	-11	-11
Transport							
aquaporin 5	Aqp5	1368469_at	NM_012779.1	8	9	12	12
aquaporin 8	Aqp8	1368316_at	NM_019158.2	21	28	41	49
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	Abcb1b	1370293_at	NM_012823.2	43	43	46	49
carbonic anhydrase 4	Car4	1368437_at	NM_019174.1	25	21	28	28
claudin 4	Cldn4	Rn01198224_s1	NM_001012022.1	-2	-2	-2	-2
cyclic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	Cfr	1384960_at	NM_031506.1_XM_001062374.1	n.d.	-12	-11	-13
faty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	1370201_at	NM_145878.1	11	12	21	17
guanylate cyclase activator 2B	Gucy2b	1387253_at	NM_022284.2	22	23	178	72
low density lipoprotein-related protein 2	Lrp2	1367952_at	NM_030827.1	9	11	19	15
potassium channel, subfamily K, member 1	Kcnk1	Rn00572452_m1	NM_021688.3	-1	1	1	1
solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	Slc1a1	Rn0054705_m1	NM_013032.3	1	1	1	1
solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	Slc10a1	1368600_at	NM_017047.1	15	8	15	19
solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	Slc16a3	1370291_at	NM_030304.1	-6	-6	-8	-8
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	1390591_at	NM_153622.2	135	134	156	144
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	Slc2a13	Rn0052414_m1	NM_133611.1	-1	1	1	1
solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10	Slc4a10	1373326_at	NM_178092.2	76	62	120	91
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	Slc5a11	1391192_at	NM_001100482.1	-11	-10	-19	-10
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	Slco4a1	1368437_at; 1389067_at	NM_133608.2	11	22	18	15
Zellzyklus							
antigen identified by monoclonal antibody K6-7	Mki67	1374775_at	XM_225460.4	-11	-9	-14	-16
aurora kinase B	Aurkb	1368260_at	NM_053749.4	-6	-4	-7	-6
binding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	Bub1b	1383926_at	XM_342843.3	-12	-11	-11	-13
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Cdc2	1367776_at	NM_019286.1	-6	-6	-8	-7
cyclin A2	Cona2	1379582_a_at	NM_053702.3	-13	-11	-13	-13
cyclin B2	Conb2	1389566_at	NM_001009470.1	-6	-5	-8	-7
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	1372685_at	NM_001106028.1	-7	-6	-20	-16
dymin light chain Tctex-type 3	Dym3	Rn01756152_m1	NM_001013228.1	1	1	1	1
E2F transcription factor 8	E2f8	1377410_at	XM_218601.4	-10	-8	-8	-7
kinase family member 2C	Kif2c	1369380_at	NM_134472.NM_001085369.1	-5	-7	-6	-7
polo-like kinase 1 (Drosophila)	Plk1	1370297_at	NM_017100.1	-7	-7	-10	-8
protein regulator of cytokinesis 1	Prc1	1392899_at	NM_001107529.1	-6	-5	-9	-7
ribonucleotide reductase M2	Rrm2	1389406_at; 1393848_at	NM_001025740.1	-9	-12	-19	-25
SPC25, 10C02 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	Cks2b	1392968_at	NM_001066541.1	-7	-7	-8	-8
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1372186_a_at; 1388650_at	NM_022183.2	-10	-8	-15	-18
transcription factor AP-2, gamma	Tcfap2c	1383937_at	NM_201420.2	-5	-13	-7	-5
Ttk protein kinase	Ttk	1379448_at	NM_001108172.1	-16	-10	-33	-61
Metabolismus/Katabolismus							
alkalase B, fructose-bisphosphate	Akbob	1370299_at	NM_012496.2	26	24	35	32
beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	Bco1	Rn00580540_m1	NM_053648.2	-1	1	2	2
cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	Cyb5b	Rn0057982_m1	NM_030596.2	-2	-2	-2	-2
cytochrome P450, family 2, subfamily I, polypeptide 4	Cyp2d4	1368606_at	NM_019303.1	286	180	219	322
cytochrome P450, family 25, subfamily A, polypeptide 1	Cyp2a1	Rn01530533_g1	NM_019155.2	21	28	41	49
D-amino-acid oxidase	Dao	1369491_at	NM_053626.1	n.d.	6	n.d.	6
glutamate decarboxylase 1	Gad1	1370760_a_at	NM_017007.1	9	13	13	16
homogenisate 1, 2-oxoygenase	Hgl	1398514_at	NM_001012145.1	10	9	13	12
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	Rn00577779_m1	NM_024391.1	2	1	1	2
hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	Hsd11b1	1388653_at	NM_017080.2	14	16	16	16
lipase, gastric	Lipf	1387245_at	NM_017341.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
napain A essential peptidase	Nepa	1368251_at	NM_031670.2	50	42	46	46
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	Pgds2	1368402_at	NM_031644.2	14	10	12	16
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	1390591_at	NM_153622.2	135	134	156	144
Immunantwort							
Cd55 molecule	Cd55	Rn00709472_m1	NM_022269.2	-2	-4	-3	-2
Ca99 molecule	Ca99	1384837_at	NM_134327.1	80	16	57	68
CDW32 antigen	Cd32	Rn0058151_m1	NM_053432.2.NM_001033852.1	-1	-1	-1	-1
chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	1369814_at	NM_019233.1	11	9	18	21
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Ccl14	1388485_at	NM_001013137.2	-4	-7	-5	-6
complement component 4 binding protein, alpha	C4bpa	Rn00560896_m1	NM_021516.2	2	2	9	4
defensin beta 1	Dfb1	1368460_at	NM_031610.1	14	35	28	14
ficolin B	Fcnb	1387378_at	NM_053634.1	-16	n.d.	-25	-24
interferon stimulated exonuclease 20	Isg20	Rn01478001_m1	NM_001008510.1	-3	-3	-3	-3
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	Rn00580999_m1	NM_031598.3	-1	4	6	9
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	Pgds2	1368402_at	NM_031644.2	14	10	12	16
secreted phosphoprotein 1	Spp1	1367581_a_at	NM_012881.2	36	64	56	54
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	Slc5a11	1391192_at	NM_001100482.1	-11	-10	-19	-10
tenascin N	Tnn	1371933_at	NM_001107189.1	-14	-14	-14	-14
V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	Vctn1	1380134_at	NM_001024244.1	17	14	17	16
Apoptose							
deoxyribonuclease 1-like 3	Dnase1l3	1368294_at	NM_053907.1	11	6	11	15
E2F transcription factor 8	E2f8	1377410_at	XM_218601.4	-10	-8	-8	-7
maternal embryonic leucine zipper kinase	Meik	1389795_at	NM_001108662.1	-10	-5	-27	-8
matrix metalloproteinase 7	Mmp7	1368766_at	NM_012864.2	-20	-37	-257	-54
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	Phpp	Rn00572211_m1	NM_021657.1	1	-1	1	1
S100 calcium binding protein B	S100b	Rn0056139_m1	NM_013191.1	1	1	2	1
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	Slc5a11	1391192_at	NM_001100482.1	-11	-10	-19	-10
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	1372186_a_at; 1388650_at	NM_022183.2	-10	-8	-15	-18
transcription factor AP-2, gamma	Tcfap2c	1383937_at	NM_201420.2	-5	-13	-7	-5
Signaltransduktion							
phenazine biosynthesis-like protein domain containing	Ptd	1390993_at	NM_138530.2	11	7	13	18
potassium channel, subfamily K, member 1	Kcnk1	Rn00572452_m1	NM_021688.3	1	1	2	1
S100 calcium binding protein B	S100b	Rn0056139_m1	NM_013191.1				

9 Publikationsliste

Posterbeitrag auf Fachtagung

Nicole Torno, Anna-Lena Frisk, Johanna M. Beekman, Andrea Hartwig, Kirstin Meyer (2009), *Comparison of progestin transcriptional profiles in rat mammary gland using laser capture microdissection and whole tissue sampling**, Toxicology Letters / Abstracts of the 46th Congress of the European Societies of Toxicology, Volume 189S (2009), S59

* Selected for Oral Presentation

Vortrag auf Fachtagung

46th Congress of the European Societies of Toxicology, 13th-16th September 2009, Dresden, Germany, Nicole Torno, *Comparison of progestin transcriptional profiles in rat mammary gland using laser capture microdissection and whole tissue sampling*

Publikation in Fachzeitschrift

Nicole Torno, Anna-Lena Frisk, Johanna M. Beekman, Andrea Hartwig, Kirstin Meyer, *Comparison of Progestin Transcriptional Profiles in Rat Mammary Gland using Laser Capture Microdissection and Whole Tissue Sampling*, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods: in preparation

10 Danksagung

Für die Gelegenheit, meine Dissertation in der Toxikologie der Bayer Schering Pharma AG anfertigen zu können, möchte ich mich herzlichst bei Herrn Dr. Schweinfurth und Herrn Dr. Jekat bedanken. Ein großer Dank geht außerdem an Herrn Dr. Steger-Hartmann für seine stetige Förderung und Unterstützung. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Kirstin Meyer für die Vergabe meines Dissertationsthemas und die engagierte fachliche und persönliche Betreuung während meiner Arbeit bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Hartwig bedanke ich mich herzlich für die außerordentlich interessierte und angenehme Betreuung von universitärer Seite. Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern ihres Arbeitskreises für die freundliche Aufnahme in die Gruppe und die Hilfsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Johanna Beekman und ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Sandra Patkovic, sowie den Kollegen der Pathologie mit Dr. Anna-Lena Frisk, Dr. Jakob Walter, Dr. Rainer Ernst und besonders auch Sabina Baßow sowie Dr. Dr. Christiane Otto, bei all denen ich mich herzlich für die großartige theoretische und praktische Unterstützung bedanken möchte.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen meiner Dissertation und darüber hinaus danke ich auch Dr. Wiebke Afhüppe, Dr. Joachim Reischl, Dr. Susanne Schwenke, Dr. David Bauer, Dr. Andrea Wagenfeld und Ulrike Lenhard.

Daneben möchte ich meinen Dank meinen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen der Arbeitsgruppe der Mechanistischen und Molekularen Toxikologie für ihre Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre aussprechen, insbesondere Dr. Marian Raschke, Gabi Gehrman und Claudia Steinhoff.

Für die vielen netten Momente im Arbeitsalltag und Unterstützungen „der anderen Art“ möchte ich mich schließlich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Toxikologie bedanken und meinen großen Dank auch an Jana Z., Claudia, Dörthe, Birgit, Jana L., Nadine, Beatrice, Sabine, Mareen, Samia, Regina, Elzbieta, Antje, Thomas, Mirco, Marco und Kim richten.

Überdies gilt mein ganz besonderer Dank meinen wunderbaren Eltern - für ihre Aufmerksamkeit, den stetigen Rückhalt und ihr grenzenloses Vertrauen in mich.

Mein herzlichstes Dankeschön möchte ich schließlich meinem Verlobten Mario aussprechen, der in den letzten Jahren immer für mich da war, mich geduldig unterstützt und unerschöpflich motiviert hat.