

Immunhistologische Untersuchungen zur Expression der Wachstumsfaktoren Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 und - β 3 sowie der Matrixmetalloproteinase-2 im zyklischen Endometrium des Pferdes

Claudia Kiesow¹, Christin Ellenberger¹, Harald Sieme² und Heinz-Adolf Schoon¹

Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig¹ und Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover²

Zusammenfassung

Über die zyklusabhängigen Variationen der Expression der Wachstumsfaktoren der Transforming growth factor-Familie und des Enzyms Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) bei der Stute ist wenig bekannt. Ziel der Untersuchung ist daher, das Expressionsmuster von Transforming growth factor- α (TGF- α), - β 1, - β 2 und - β 3 (TGF- β 1, - β 2 und - β 3) sowie des Enzyms MMP-2 im Verlauf des Zyklus an Endometriumbiopsaten mittels immunhistologischer Methoden darzustellen. Es standen, an definierten Zyklustagen entnommene Endometriumbiopsate ($n=21$) von drei Stuten mit bekannten Serumöstrogen- und -progesteronkonzentrationen zur Verfügung. Die Wachstumsfaktoren TGF- α , TGF- β 1, - β 3 und das Enzym MMP-2 konnten mittels monoklonaler Antikörper, der Wachstumsfaktor TGF- β 2 mittels eines polyklonalen Antikörpers, dargestellt werden. Während TGF- α und TGF- β 3 keine offensichtlich erkennbaren zyklusabhängigen Variationen in der Expression der Stroma- und Drüsenzellen erkennen lassen, werden TGF- β 1, - β 2 und MMP-2 zyklusassoziiert exprimiert. So ist ein Maximum der TGF- β 1-Expression in den Stroma- und Drüsenzellen im Postöstrus bis mittleren Interöstrus zu beobachten. In den luminalen Epithelien ist TGF- β 1 überwiegend im Interöstrus nachzuweisen. TGF- β 2 wird in den Drüsenzellen generell nur geringgradig exprimiert, in der periöstrischen Zyklusphase tritt eine jedoch geringgradig stärkere Reaktivität auf. In den Stromazellen werden keine deutlichen Schwankungen der Expression von TGF- β 2 im Zyklus auffällig, es ist lediglich ein dezenter Anstieg der Expression im mittleren bis späten Interöstrus sowie periöstrisch nachweisbar. In den luminalen Epithelien zeigt sich eine übereinstimmende maximale Expression von TGF- β 2 und TGF- β 3 im mittleren bis späten Interöstrus sowie im periöstrischen Zeitraum. Das Expressionsmaximum von MMP-2 in den Stromazellen tritt im mittleren bis späten Interöstrus auf. Die Definition der physiologischen Expression der TGF-Wachstumsfaktoren und des Enzyms MMP-2 im equinen Endometrium stellt die Grundlage für weiterführende Untersuchungen an Endometriumbiopsaten von Stuten mit Endometrose dar. Denn erst durch einen Vergleich zu den hier im Zyklus gewonnenen Erkenntnissen wird es möglich Ansätze zur bisher ungeklärten Ätiopathogenese der Endometrose liefern zu können.

Schlüsselwörter: Stute, Endometrium, Transforming growth factor- α und - β , Matrixmetalloproteinase-2

Immunohistochemical identification of the growth factors Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 and - β 3 as well as the matrixmetalloproteinase-2 in the cyclic equine endometrium

Little is known about variations of the expression of growth factors of the Transforming growth factor-family and the enzyme matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) during the estrous cycle of the mare. Hence, the aim of this study was to define the expression patterns of Transforming growth factor- α (TGF- α), - β 1, - β 2, - β 3 (TGF- β 1, - β 2, - β 3) and MMP-2 throughout the reproductive cycle using immunohistochemical methods. For this purpose endometrial biopsies ($n=21$) taken at selected days of the cycle from three mares with known serum estradiol and progesterone levels. Growth factors TGF- α , TGF- β 1, - β 3 and the enzyme MMP-2 were examined using monoclonal antibodies, TGF- β 2 using polyclonal antibodies. Whereas TGF- α and TGF- β 3 do not show any obviously recognizable cycle-dependant variations in expression of stromal and glandular cells, TGF- β 1, - β 2 and MMP-2 demonstrate a cycle-dependent expression. In stroma and glandular cells a maximum of TGF- β 1 expression is observed in postestrus until intermediate diestrus. In luminal epithelia TGF- β 1 is predominantly detectable until intermediate diestrus. Glandular cells show in generally a lower expression of TGF- β 2 with a slightly higher reactivity during estrus. The stromal expression of TGF- β 2 shows no remarkable variations during the reproductive cycle, but a discreet increase of expression is observed in intermediate until late diestrus as well as during estrus. In luminal epithelia a homologous maximal expression of TGF- β 2 and - β 3 appears in intermediate until late diestrus as well as during estrus. The maximum of expression of MMP-2 in stromal cells is associated with intermediate to late diestrus. Defining the physiological expression of TGF-growth factors and the enzyme MMP-2 in the equine endometrium provides a base for further research on biopsies of mares with endometrosis. Only by this comparison it will be possible to provide new insights into the aetiopathogenesis of endometrosis which is until not clarified so far.

Keywords: mare, endometrium, Transforming growth factor- α and - β , matrixmetalloproteinase-2

Einleitung

Die zyklusbedingten Veränderungen im Endometrium gehen mit komplexen Auf-/Um- und Abbauvorgängen der endometrialen Strukturen einher, die neben den hormonellen Regula-

tionsmechanismen auch vielfältigen Wirkungen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen unterliegen. So stimuliert z.B. TGF- α in Verbindung mit Östrogen (Giudice 1994, Hammond et al. 1993, Nelson et al. 1992) bzw. Progesteron

(Chia et al. 1995, Irwin et al. 1991) die endometriale Zellproliferation, dagegen besitzt TGF- β eine eher hemmende Wirkung auf die endometrialen Proliferationsvorgänge (Nasu et al. 2005, Tang et al. 1994). TGF- β fördert die Apoptose und Differenzierung der endometrialen Zellen (Chatzaki et al. 2003, Shooner et al. 2005, Tang et al. 1994, Turksen et al. 1991).

Die Homöostase der Extrazellulärmatrrix (EZM) ist wichtig für die physiologische Entwicklung und Funktion verschiedener Gewebe des Körpers. Die Zusammensetzung der EZM wird durch die Zusammenarbeit der verschiedenen Matrixmetalloproteinasen-Subfamilien reguliert. Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen u.a. eine kritische Rolle bei der Menstruation (Zhang und Salamonsen 2002), der Involution des Uterus (Rudolph-Owen et al. 1997, Wilson et al. 1995) und der Embryoimplantation bei verschiedenen Spezies (Isaka et al. 2003, Riley et al. 2000, Uekita et al. 2004, Walter und Boos 2001, Wang et al. 2001, Zhao et al. 2002).

Die Expression der TGF-Wachstumsfaktoren im endometrialen Zyklus wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen bei verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Die Ergebnisse werden jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert. Einen Überblick über die Expression der TGFs und von MMP-2 im Endometrium verschiedener Spezies gibt die Tab. 1. Ziel der eigenen Studie war die detail-

lierte Charakterisierung der Expression von TGF- α , - β 1, - β 2, - β 3 und MMP-2 im zyklischen equinen Endometrium unter Berücksichtigung der vorliegenden Serumhormonkonzentrationen.

Material und Methoden

Tiere

Es standen an definierten Zyklustagen entnommene Endometriumbiotope (n=21) von drei zyklisch aktiven, klinisch und gynäkologisch gesunden Maidenstuten (Warmblutstuten) im Alter von 5, 7 und 8 Jahren zu Verfügung. Die Biotope wurden nach einer ausführlichen gynäkologischen Untersuchung mit einer Biopsiezange nach Ferris (Fa. Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen) dorsal im Korpusbereich nahe der Bifurkation in einer Größe von ca. 10 x 3 x 3 mm (Schoon et al. 1992) gewonnen. Den Stuten wurden an den Zyklustagen 0, 5, 10, 13, 16, 19 und 21 Endometriumbiotope entnommen. Tag 0 stellt den Zeitpunkt der Ovulation dar. Parallel dazu erfolgte eine Analyse (Radioimmunoassay) (Behrens et al. 1993, Günzel-Apel et al. 1990, Hoppen 1995) der Serumhormonkonzentrationen von Östradiol, Progesteron und Testosteron (Tab. 2). Die ermittelten Serumhormonwerte der Kontrollstuten entsprechen, mit geringgradigen individuellen Unterschieden, den für die Stute definierten, zyklusbedingten Variationen (Hoppen 1995).

Tab. 1 Expression der TGFs und von MMP-2 im Endometrium verschiedener Spezies während des Zyklus
Expression of TGFs and MMP-2 in the endometrium of different species during the estrous cycle

| Faktor: mRNA/ Protein | vermehrter Nachweis in der Proliferationsphase | vermehrter Nachweis im Übergang Proliferations- zur Sekretionsphase | vermehrter Nachweis in der Sekretionsphase | keine zyklusabhängigen Expressionsunterschiede |
|-------------------------------|--|---|--|--|
| TGF- α | Mensch ⁶ Hund ²⁰ | Mensch ¹² | Mensch ¹¹ | Mensch ^{15,19} Pferd ¹⁸ |
| TGF- β 1 TGF- β 2 | -- | Mensch ⁴ | Mensch ^{2, 3, 8, 13} | Mensch ^{10, 14, 21} |
| TGF- β 3 | Mensch ^{1,8} Schaf ⁵ | Mensch ^{4,10} Pferd ¹⁸ | Mensch ^{2, 15} | -- |
| MMP-2 | -- | -- | Mensch ^{7, 23} Pferd ²² | Mensch ^{9, 16, 17} |

1. Arici et al. (1996), 2. Brunner et al. (1995), 3. Casslen et al. (1998), 4. Chegini et al. (1994b), 5. Dore Jr. et al. (1996), 6. Ejskjaer et al. (2005), 7. Freitas et al. (1999), 8. Gaide Chevonnay et al. (2008), 9. Goffin et al. (2003), 10. Gold et al. (1994), 11. Hansard et al. (1997), 12. Imai et al. (1995), 13. Marshburn et al. (1994), 14. Reis et al. (2002), 15. Reis et al. (2005), 16. Rodgers et al. (1994), 17. Rudolph-Owen et al. (1998), 18. Stief (2006), 19. Tabibzadeh und Sun (1992), 20. Tamada et al. (2005), 21. von Wolff et al. (2000), 22. Walter et al. (2005), 23. Zhang et al. (2000)

Tab. 2 Serumöstrogen-, -progesteron- und -testosteronkonzentrationen im Verlauf des Zyklus bei Stuten (n=3)
Serumestrogene-, -progesterone- and testosterone concentrations throughout the estrous cycle of mares (n=3)

| Zyklustag | Stute 1 | | | Stute 2 | | | Stute 3 | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | E (pg/ml) | P (ng/ml) | T (ng/ml) | E (pg/ml) | P (ng/ml) | T (ng/ml) | E (pg/ml) | P (ng/ml) | T (ng/ml) |
| Ovulation | 6 | 0,19 | 0,01 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 3 | 9 | 5,70 | 0,01 | 6 | 5,60 | 0,01 | 6 | 1,00 | 0,02 |
| 5 | -- | -- | -- | 4 | 10,8 | 0,01 | 4 | 4,50 | 0,01 |
| 10 | 5 | 18,50 | 0,01 | 3 | 1,10 | 0,01 | 4 | 6,10 | 0,01 |
| 13 | 3 | 0,66 | 0,01 | 5 | <0,1 | 0,01 | 7 | <0,1 | 0,01 |
| 16 | 5 | <0,1 | 0,01 | 6 | <0,1 | 0,01 | 7 | <0,1 | 0,01 |
| 19 | 13 | <0,1 | 0,02 | 4 | 1,30 | 0,01 | 3 | 0,19 | 0,01 |
| 21 | 5 | <0,1 | 0,01 | 4 | 6,60 | 0,01 | -- | 2,10 | 0,01 |

E = Serumöstrogen-Konzentration, T = Serumtestosteron-Konzentration, P = Serumprogesteron-Konzentration, -- = keine Daten vorhanden

Tab. 3 Verwendete Primärantikörper, ihre Bezugsquellen, Vorbehandlungen und Verdünnungen
Primary antibodies used in immunohistochemistry, sources, pretreatments and dilutions

| Antikörper | Antikörper-Typ | Vorbehandlung | Verdünnung | Bezugsquelle |
|---|----------------|--|------------|--|
| Maus anti-MMP-2 (Clone A-Gel VC2) | m AK | ohne Vorbehandlung | 1 : 400 | MS-806-P1 Neomarkers/Lavision Cop., USA |
| Maus anti-TGF- α (Clone MF9+TG86) | m AK | 96°C mit 10 mmol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 min | 1 : 100 | MS-1000-P0 Dianova GmbH Hamburg |
| Maus anti-TGF- β 1 (Clone TB21) | m AK | 96°C mit 10 mmol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 min | 1 : 1500 | DM 1047 Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen |
| Kaninchen anti-TGF- β 2 | p AK | ohne Vorbehandlung | 1 : 50 | sc-90 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA |
| Maus anti-TGF- β 3 (Clone 236-5.2) | m AK | 96°C mit 10 mmol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 min | 1 : 150 | GF 16 Calbiochem/Merck Chemicals, Darmstadt |

m AK = monoklonaler Antikörper, p AK = polyklonaler Antikörper

Histologie

Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in 4%igem, neutralem, gepuffertem Formalin fixiert, in Paraplast eingebettet, 3-4 μ m Schnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) angefertigt und anhand von Hämalau-Eosin-gefärbten Präparaten (Romeis und Böck 1989) lichtmikroskopisch untersucht. Alle Biopate wurden einer histomorphologischen Charakterisierung hinsichtlich ihrer endometrialen Differenzierung unterzogen und potentiell erfassbare Veränderungen (z.B. Endometritis, Endometrose, Angiosklerose, Perivaskulitis, Lymphlakunen) dokumentiert (Brunckhorst et al. 1991, Schoon et al. 1997).

Immunhistologie

Alle in dieser Studie durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen erfolgten mittels der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) (Hoffmann et al. 2009). Zunächst erfolgten zur Etablierung der Methodik Vorversuche für den Nachweis der verwendeten Primärantikörper (TGF- α , - β 1, - β 2, - β 3 und MMP-2), die mit Gewebe vom Pferd kreuzreagieren. Die Antikörper wurden an equinen Endometriumbiopaten getestet und die optimale Antikörperverdünnung (Tab. 3) ausitiert. Für den Nachweis von MMP-2, TGF- α , TGF- β 1 und TGF- β 3 wurden monoklonale Primärantikörper verwendet. Der Wachstumsfaktor TGF- β 2 wurde mittels eines polyklonalen Primärantikörpers nachgewiesen. Die Verdünnungen, Vorbehandlungen und Bezugsquellen der verwendeten Primärantikörper werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollschnitt nicht sichtbar waren. MMP-2, TGF- α , TGF- β 1, - β 2 und - β 3 waren intrazytoplasmatisch lokalisiert. MMP-2 konnte geringgradig auch extrazellulär nachgewiesen werden. Die TGF- β 1, - β 2 und - β 3 waren in allen endometrialen Zellkomponenten (luminale und glanduläre Epithelzellen, Stromazellen) sowie in den Gefäßstrukturen nachweisbar. TGF- α und MMP-2 waren nur in den Stromazellen und den Blutgefäßen feststell-

Tab. 4 Zuordnung von Färbreaktion und SI-Wert
Assignment of staining reaction and staining intensity (SI)

| Laufindex n | Färbereaktion | Wert |
|-------------|---------------|------|
| 1 | keine | 0 |
| 2 | angedeutet | 0,5 |
| 3 | schwach | 1 |
| 4 | mäßig | 5 |
| 5 | stark | 10 |

bar. Homogen hell-beige Färbungen, v.a. im Bereich von Entnahme- und Bearbeitungsartefakten, sowie Hämosiderin als eisenhaltiges Pigment, das sich auch in der Negativkontrolle als braunes, grobscholliges Material nachweisen ließ, wurden als negativ gewertet.

Die Erfassung der Expression von MMP-2, TGF- α , TGF- β 1, - β 2 und - β 3 erfolgte semiquantitativ anhand eines modifizierten „Immunreaktiven Scores“ (IRS) (Ellenberger et al. 2008, Özgen et al. 1997). Es wurde allerdings zusätzlich die Färbintensität „angedeutet“ (Tab. 4) berücksichtigt. Der „Immunreaktive Score“ ergibt sich aus der nachfolgend aufgeführten Formel und kann einen Wert zwischen 0 und 10 einnehmen.

$$IRS = 1/100 \sum_{n=1}^5 (PP_n \times SI_n)$$

(n=Laufindex, PP = Prozentsatz der positiven Zellen, SI = Färbintensität)

Für die Schätzung des Anteils der, die immunhistologischen Marker exprimierenden, Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Gewebsstruktur wurde die in Tab. 5 dargestellte graduelle Einteilung verwendet. Auf eine statistische Untersuchung wurde aufgrund der zu geringen Tierzahl verzichtet. Die gewonnenen Erkenntnisse sprechen somit für das vorliegende Tiergut und sollten an einer größeren Tierzahl bestätigt werden.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchung der Endometrien im Zyklusverlauf hinsichtlich der endometrialen Funktionsmorphologie mittels konventioneller Histologie stimmen mit denen von Özgen (1999), Häfner (1999) und Aupperle et al. (2000) überein. Pathologische Befunde (Endometritis, Endometrose,

Angiosklerose, Perivaskulitis, Lymphlakunen) konnten bei keiner der Stuten erhoben werden.

Die untersuchten Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und - β 2 sowie das Enzym MMP-2 zeigen ein typisches zyklusabhängiges Expressionsmuster mit geringfügigen individuellen Unterschieden zwischen den untersuchten Stuten. Offensichtlich erkennbare

zyklusabhängige Variationen der Expression von TGF- α und TGF- β 3 waren nicht zu beobachten. Übereinstimmende Charakteristika der Expression werden im Folgenden dargestellt. Der Immunreaktive-Score (IRS) der uterinen Drüsenzellen ergibt sich aus dem Mittelwert des IRS oberflächlicher, mittlerer und tiefer Uterindrüsen. Auffälligkeiten werden in verschiedenen Graustufen abhängig von den endometrialen Strukturen in den entsprechenden Tabellen (Tab. 6 bis 10) kenntlich gemacht.

Tab. 5 Graduelle Einteilung des Anteils immunhistologischer Marker exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Gewebestruktur

Gradual division of the part of cells showing an expression of the immunohistochemical marker of the complete cell number of the respective tissue structure

| | |
|-------|--|
| (+) | vereinzelt positive Zellen, maximal 5-10% der Gesamtzellzahl |
| + | einzelne positive Zellen, maximal 20% der Gesamtzellzahl |
| +(+) | mehrere positive Zellen, maximal 40% der Gesamtzellzahl |
| ++ | viele positive Zellen, maximal 60% der Gesamtzellzahl |
| ++(+) | sehr viele positive Zellen, maximal 80% der Gesamtzellzahl |
| +++ | (fast) alle Zellen positiv, 80-100% der Gesamtzellzahl |

(+) = angedeutet, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, +(+) = gering- bis mittelgradig, ++(+) = mittel- bis hochgradig, +++ = hochgradig

TGF- α ist sehr deutlich in den endometrialen Stromazellen (Abb. 1) nachzuweisen. Es zeigen sich hinsichtlich des Expressionsmusters keine zyklusbedingten Variationen (Tab. 6). Die stärkste Expression von TGF- β 1 (Abb. 2) in den endometrialen Stromazellen und Drüsenzellen kann im Postöstrus bis mittleren Interöstrus, in enger Assoziation mit dem gleichzeitigen Anstieg der Progesteronkonzentration im Serum, beobachtet werden (Tab. 7). Die luminalen Epithelzellen zeichnen sich allgemein durch eine schwache Expressionsintensität aus, zeigen im Interöstrus jedoch geringfügig stärker ausgeprägte Reaktionen (Tab. 7).

TGF- β 2 (Abb. 3) ist in den luminalen Epithelzellen und Stromazellen insbesondere im mittleren und späten Interöstrus bis in den östrischen Zeitraum mit gleichzeitigem Abfall der Serum-Progesteronkonzentrationen nachzuweisen (Tab. 8). Die glandulären Epithelzellen zeigen dagegen in der periöstrischen Phase die stärkste Reaktion (Tab. 8).

TGF- β 3 (Abb. 4) wird am deutlichsten in den luminalen Epithelzellen exprimiert (Tab. 9) und zeichnet sich insbesondere

Tab. 6 TGF- α -Expression in den endometrialen Stromazellen (IRS-Werte) und Serumprogesteronwerte bei drei Stuten
TGF- α -expression (IRS-value) of endometrial stroma cells and values of progesterone in serum of three mares

| Zyklustag | Zyklusphase | Stute 1 | | Stute 2 | | Stute 3 | |
|-----------|-----------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | | P (ng/ml) | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS SZ |
| 0 | Östrus | 0,19 | 10 | -- | -- | -- | -- |
| 3 | Postöstrus | 5,70 | 9,5 | 5,60 | 9,75 | 1,00 | 10 |
| 5 | früher Interöstrus | -- | -- | 10,8 | 10 | 4,50 | 10 |
| 10 | mittlerer Interöstrus | 18,50 | 10 | 1,10 | 10 | 6,10 | 9,75 |
| 13 | später Interöstrus | 0,66 | 9,5 | <0,1 | 10 | <0,1 | 10 |
| 16 | | <0,1 | 10 | <0,1 | 10 | <0,1 | 9,5 |
| 19 | Präöstrus | <0,1 | 10 | 1,30 | 10 | 0,19 | 10 |
| 21 | Östrus | <0,1 | 10 | 6,60 | 10 | 2,10 | 10 |

IRS = Immunreaktiver-Score, SZ = Stromazellen, P = Serumprogesteron-Konzentration, -- = keine Daten vorhanden

Tab. 7 Zyklusabhängige TGF- β 1-Expression (IRS-Werte) in den endometrialen Strukturen und Serumprogesteronwerte bei drei Stuten
Cycle dependent TGF- β 1-expression (IRS-value) of endometrial structures and values of progesterone in serum of three mares

| Zyklustag | Zyklusphase | P (ng/ml) | Stute 1 | | | P (ng/ml) | Stute 2 | | | P (ng/ml) | Stute 3 | | |
|-----------|-----------------------|-----------|---------|--------|--------|-----------|---------|--------|--------|-----------|---------|--------|--------|
| | | | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ | | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ | | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ |
| 0 | Östrus | 0,19 | 0,10 | 0,63 | 0,70 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | |
| 3 | Postöstrus | 5,70 | 0,10 | 0,95 | 1,15 | 5,60 | 0,15 | 1,80 | 1,15 | 1,00 | 0,10 | 1,30 | 1,15 |
| 5 | früher Interöstrus | -- | -- | -- | -- | 10,80 | 0,30 | 1,30 | 1,70 | 4,50 | 0,60 | 1,55 | 1,75 |
| 10 | mittlerer Interöstrus | 18,50 | 1,90 | 1,56 | 1,60 | 1,10 | 0,60 | 1,55 | 1,75 | 6,10 | 0,30 | 1,60 | 1,15 |
| 13 | später Interöstrus | 0,66 | 0,60 | 0,08 | 0,15 | <0,1 | 0,60 | 0,48 | 0,75 | <0,1 | 0,30 | 0,38 | 0,75 |
| 16 | Interöstrus | <0,1 | 0,60 | 0,48 | 0,48 | <0,1 | 0,30 | 0,25 | 0,65 | <0,1 | 0,05 | 0,01 | 0,15 |
| 19 | Präöstrus | <0,1 | 0,05 | 0,05 | 0,08 | 1,30 | 0,05 | 0 | 0 | 0,19 | 0,10 | 0,01 | 0,15 |
| 21 | Östrus | <0,1 | 0,10 | 0,06 | 0,10 | 6,60 | 0,60 | 0,60 | 0,65 | 2,10 | 0,10 | 0,08 | 0,20 |

IRS = Immunreaktiver-Score, DZ = Drüsenzellen (mittelgrau), SZ = Stromazellen (dunkelgrau), LE = Luminales Epithel (hellgrau), P = Serumprogesteron-Konzentration, -- = keine Daten vorhanden

durch eine ansteigende Expressionsintensität im mittleren und späten Interöstrus bei gleichzeitigem Abfall der Serumprogesteronkonzentrationen aus. Bei Stute 3 wird zusätzlich zum Zeitpunkt des Präöstrus/Östrus eine intensivere Expression im luminalen Epithel beobachtet. In den endometrialen Drüsen- und Stromazellen wird TGF- β 3 mit schwacher Intensität exprimiert. Offensichtlich erkennbare zyklusbedingte Variationen liegen in den glandulären Epithelien nicht vor, während die Stromazellen einen leichten Anstieg hinsichtlich der Expressionsintensität über den Zyklusverlauf hinweg zeigen.

Das Enzym MMP-2 (Abb. 5) wird im equinen Endometrium nur von den Stromazellen exprimiert und ist dort mit einem Expressionsmaximum im mittleren bis späten Interöstrus bei gleichzeitigem Abfall der Serumprogesteronkonzentrationen zu beobachten (Tab. 10). In den luminalen und glandulären

Epithelzellen kann MMP-2 nicht nachgewiesen werden. Eine zusammenfassende Darstellung der maximalen Konzentration der untersuchten Marker mit zellulärem Reaktionsmuster im Zyklus erfolgt in Tabelle 11.

Diskussion

Transforming Growth Factor- α

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Stief (2006) wird TGF- α im zyklischen unveränderten Endometrium der Stute mit einer starken, diffusen intrazytoplasmatischen Expression in den Stromazellen und den endometrialen Gefäßstrukturen nachgewiesen. Zyklusabhängige Schwankungen in der Expression, wie sie für den Menschen (Ejskjaer

Tab. 8 Zyklusabhängige TGF- β 2-Expression (IRS-Werte) in den endometrialen Strukturen und Serumprogesteronwerte bei drei Stuten
Cycle dependent TGF- β 2-expression (IRS-value) of endometrial structures and values of progesterone in serum of three mares

| Zyklustag | Zyklusphase | Stute 1 | | | | Stute 2 | | | | Stute 3 | | | |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | P (ng/ml) | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ |
| 0 | Östrus | 0,19 | 1,90 | 1,90 | 2,40 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 3 | Postöstrus | 5,70 | 1,30 | 1,93 | 1,80 | 5,60 | 1,40 | 1,12 | 1,50 | 1,00 | 0,75 | 0,72 | 1,20 |
| 5 | früher Interöstrus | -- | -- | -- | -- | 10,80 | 2,20 | 0,58 | 1,80 | 4,50 | 1,35 | 1,23 | 1,90 |
| 10 | mittlerer Interöstrus | 18,50 | 3,30 | 0,53 | 2,80 | 1,10 | 3,15 | 0,55 | 2,80 | 6,10 | 1,90 | 0,23 | 0,90 |
| 13 | später Interöstrus | 0,66 | 2,40 | 0,48 | 2,90 | <0,1 | 1,60 | 0,57 | 3,20 | <0,1 | 3,45 | 0,30 | 2,00 |
| 16 | später Interöstrus | <0,1 | 1,60 | 0,32 | 2,40 | <0,1 | 2,80 | 0,55 | 2,90 | <0,1 | 2,20 | 0,10 | 1,80 |
| 19 | Präöstrus | <0,1 | 1,40 | 0,52 | 2,90 | 1,30 | 1,70 | 0,52 | 2,40 | 0,19 | 2,35 | 0,55 | 2,20 |
| 21 | Östrus | <0,1 | 1,40 | 0,45 | 2,90 | 6,60 | 2,00 | 0,70 | 2,90 | 2,10 | 2,40 | 0,70 | 2,30 |

IRS = Immunreaktiver-Score, DZ = Drüsenzellen (mittelgrau), SZ = Stromazellen (dunkelgrau), LE = Luminales Epithel (hellgrau), P = Serumprogesteron-Konzentration, -- = keine Daten vorhanden

Tab. 9 Zyklusabhängige TGF- β 3-Expression (IRS-Werte) in den endometrialen Strukturen und Serumprogesteronwerte bei drei Stuten
Cycle dependent TGF- β 3-expression (IRS-value) of endometrial structures and values of progesterone in serum of three mares

| Zyklustag | Zyklusphase | Stute 1 | | | | Stute 2 | | | | Stute 3 | | | |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | P (ng/ml) | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS LE | IRS DZ | IRS SZ |
| 0 | Östrus | 0,19 | 2,65 | 0,05 | 0,15 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 3 | Postöstrus | 5,70 | 0,53 | 0,60 | 0,60 | 5,60 | 1,60 | 0,53 | 0,30 | 1,00 | 1,60 | 0,60 | 0,30 |
| 5 | früher Interöstrus | -- | -- | -- | -- | 10,80 | 1,20 | 0,51 | 0,30 | 4,50 | 2,20 | 0,53 | 0,30 |
| 10 | mittlerer Interöstrus | 18,50 | 3,60 | 0,53 | 0,30 | 1,10 | 4,10 | 0,56 | 0,70 | 6,10 | 2,30 | 0,60 | 0,70 |
| 13 | später Interöstrus | 0,66 | 2,70 | 0,53 | 0,60 | <0,1 | 3,70 | 0,51 | 0,60 | <0,1 | 3,60 | 0,53 | 1,10 |
| 16 | später Interöstrus | <0,1 | 3,20 | 0,53 | 0,60 | <0,1 | 2,70 | 0,16 | 0,30 | <0,1 | 4,60 | 0,18 | 1,20 |
| 19 | Präöstrus | <0,1 | 4,20 | 0,38 | 0,70 | 1,30 | 3,20 | 0,26 | 0,60 | 0,19 | 5,10 | 0,95 | 1,90 |
| 21 | Östrus | <0,1 | 2,70 | 0,40 | 0,70 | 6,60 | 1,60 | 0,51 | 0,60 | 2,10 | 5,10 | 0,53 | 1,40 |

IRS = Immunreaktiver-Score, DZ = Drüsenzellen, SZ = Stromazellen, LE = Luminales Epithel (hellgrau), P = Serumprogesteron-Konzentration, -- = keine Daten vorhanden

Tab. 10 Zyklusabhängige MMP-2-Expression (IRS) in den endometrialen Stromazellen und Serumprogesteronwerte bei drei Stuten
Cycle dependent MMP-2-expression (IRS-value) of the endometrial stroma cells and values of progesterone in serum of three mares

| Zyklustag | Zyklusphase | Stute 1 | | Stute 2 | | Stute 3 | |
|-----------|-----------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | | P (ng/ml) | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS SZ | P (ng/ml) | IRS SZ |
| 0 | Östrus | 0,19 | 1,50 | -- | -- | -- | -- |
| 3 | Postöstrus | 5,70 | 1,50 | 5,60 | 0,75 | 1,00 | 1,50 |
| 5 | früher Interöstrus | -- | -- | 10,80 | 2,50 | 4,50 | 2,50 |
| 10 | mittlerer Interöstrus | 18,50 | 3,50 | 1,10 | 3,50 | 6,10 | 2,75 |
| 13 | später Interöstrus | 0,66 | 3,50 | <0,1 | 5,00 | <0,1 | 3,50 |
| 16 | später Interöstrus | <0,1 | 3,00 | <0,1 | 1,50 | <0,1 | 3,50 |
| 19 | Präöstrus | <0,1 | 1,50 | 1,30 | 0,75 | 0,19 | 1,50 |
| 21 | Östrus | <0,1 | 2,50 | 6,60 | 0,75 | 2,10 | 1,50 |

IRS = Immunreaktiver-Score, SZ = Stromazellen (dunkelgrau), P = Serumprogesteron-Konzentration, -- = keine Daten vorhanden

Tab. 11 Zyklusabhängige endometriale Expression von TGF- α , - β 1, - β 2, - β 3 und MMP-2 bei drei Stuten
Cycle dependent endometrial expression of TGF- α , - β 1, - β 2, - β 3 and MMP-2 of three mares

| | Zeitpunkt der maximalen Konzentration | | |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| | Luminales Epithel | Glanduläres Epithel | Stromazellen |
| TGF-α | ∅ | ∅ | keine zyklusbedingten Variationen |
| TGF-β1 | Interöstrus | Postöstrus bis mittlerer Interöstrus | Postöstrus bis mittlerer Interöstrus |
| TGF-β2 | mittlerer bis später Interöstrus, periöstrisch | periöstrisch | mittlerer bis später Interöstrus, periöstrisch |
| TGF-β3 | mittlerer Interöstrus später Interöstrus bis Präöstrus/Östrus | kaum zyklusbedingte Variationen | kaum zyklusbedingte Variationen |
| MMP-2 | ∅ | ∅ | mittlerer bis später Interöstrus |

∅= ohne Reaktion

et al. 2005, Imai et al. 1995) und den Hund (Tamada et al. 2005) beschrieben werden, sind beim Pferd im eigenen Untersuchungsgut nicht festzustellen. Eine Expression in den luminalen und glandulären Epithelzellen ist im Gegensatz zu zahlreichen anderen Spezies (Boomsa et al. 1997, Reis et al. 2005, Tamada et al. 2002, Tamada et al. 2005, Yue et al. 2000) beim Pferd nicht zu beobachten. Eine direkte Beeinflussung der TGF- α -Expression durch ovarielle Steroide wie bei der Maus (Nelson et al. 1992) und der Ratte (Borgundvaag et al. 1992) scheint bei der Stute nicht vorzuliegen.

Transforming Growth Factor- β 1

TGF- β 1 wird beim Pferd von allen endometrialen Zellen exprimiert. Die glandulären Epithel- und Stromazellen weisen

Stromazellen ist bei der Stute im Postöstrus bis mittleren Interöstrus mit Anstieg der Serum-Progesteronkonzentrationen festzustellen. Lediglich die Untersuchungen von Chegini et al. (1994) am humanen Endometrium zeigen eine ähnliche Zyklusdynamik der TGF- β 1-Expression.

Transforming Growth Factor- β 2

TGF- β 2 kann beim Pferd in allen endometrialen Zellen nachgewiesen werden. Die luminalen Epithel- und die Stromazellen zeichnen sich durch eine geringfügig stärkere Reaktivität gegenüber den glandulären Epithelzellen aus. Eine dominierend in den Stromazellen lokalisierte Expression von TGF- β 2 wie sie von Gold et al. (1994), Bruner et al. (1995) und Gaide Chevronnay et al. (2008) beim Menschen nachgewiesen

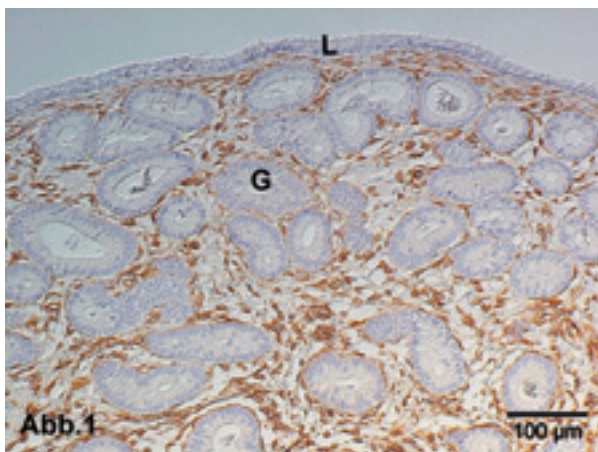


Abb. 1 Expression von TGF- α im zyklischen equinen Endometrium Stute 1, Tag 10 post ovulationem: hochgradige Expression in allen endometrialen Stromazellen. Das luminales (L) und glanduläres (G) Epithel reagieren negativ. (Immunhistologie, Nomarski-Interferenzkontrast)

Expression of TGF- α in the equine cyclic endometrium. Mare 1, day 10 post ovulation: strong staining intensity in all endometrial stroma cells. The luminal (L) and glandular (G) epithelium show negative reaction. (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

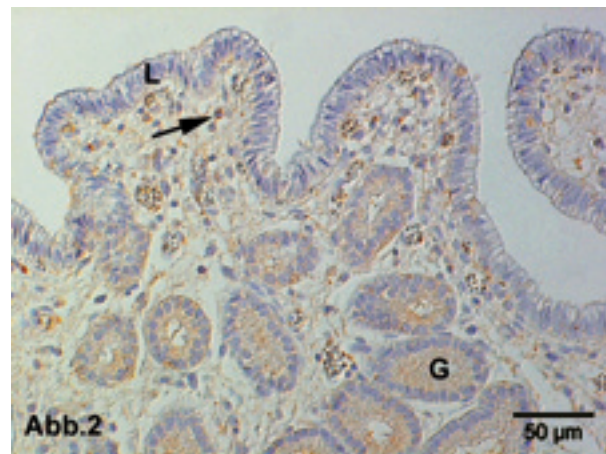


Abb. 2 Expression von TGF- β 1 im zyklischen equinen Endometrium Stute 3, Tag 10 post ovulationem: gering- bis mittelgradige intrazytoplasmatische Expression in den endometrialen Stromazellen (Pfeil) und glandulären Epithelzellen (G), Luminales Epithel (L). (Immunhistologie, Nomarski-Interferenzkontrast)

Expression of TGF- β 1 in the equine cyclic endometrium. Mare 3, day 10 post ovulation: mild to moderate staining intensity in the endometrial stroma cells (arrow), glandular epithelial cells (G) and luminal epithelium (L). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

eine ähnliche maximal gering- bis mittelgradige Expressionsintensität auf, die luminalen Epithelien zeigen eine nur schwach ausgeprägte positive Reaktion. Eine deutliche epitheliale (Bruner et al. 1995, Chegini et al. 1994) oder stromale (Reis et al. 2002) betonte Expression wie sie beim Menschen im Zyklus nachgewiesen wurde, ist beim Pferd im eigenen Untersuchungsgut nicht zu beobachten. Der Zeitpunkt der maximalen Expression in den glandulären Epithelzellen und

wurde, ist für die Stute anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht zu belegen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von Bruner et al. (1995) und Gaide Chevronnay et al. (2008) beim Menschen, kann beim Pferd eine vermehrte TGF- β 2-Expression im Interöstrus bis in den periöstrischen Zeitraum in den Stromazellen und in den luminalen Epithelien bei gleichzeitigem Abfall der Serum-Progesteronkonzentrationen nachgewiesen werden.

Transforming Growth Factor- β 3

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Stief (2006) kann auch im eigenen Untersuchungsgut TGF- β 3 bei der Stute in allen endometrialen Zellen mit einer dominierenden Expression in den luminalen Epithelzellen nachgewiesen werden. Offensichtlich erfassbare zyklusbedingte Variationen in der TGF- β 3-Expression in den glandulären Epithelzellen wie von Stief (2006) beschrieben, können jedoch im eigenen Untersuchungsgut nicht festgestellt werden. Der Zeitpunkt der maximalen Expression von TGF- β 3 im luminalen Epithel tritt insbesondere im Interöstrus auf. Auch Bruner et al. (1995) erheben im humanen Endometrium ähnliche Befunde. Im Gegensatz dazu beobachten Stief (2006) im equinen Endometrium sowie Gold et al. (1994) und Chegini et al. (1994) im humanen Endometrium bereits einen Anstieg der Expression im Übergang von der Proliferations- zur Sekretionsphase.

Zusammenfassende Betrachtung der zyklusbedingten TGF- β -Expression im equinen Endometrium

Eine progesteronabhängige Regulation der Expression der drei TGF- β -Isoformen, wie sie beim Menschen mittels in vitro Untersuchungen belegt werden konnte (Bruner et al. 1995, Casslen et al. 1998, Kim et al. 2005, Reis et al. 2002, Rodriguez et al. 2008), ist auch beim Pferd anhand der vorliegenden Ergebnisse anzunehmen. Eine direkte Regulation der

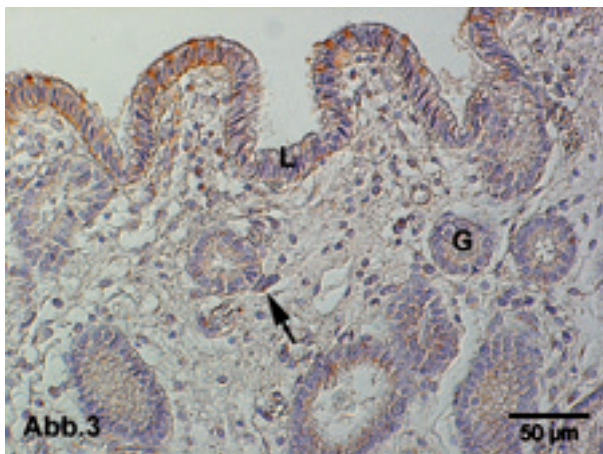


Abb. 3 Expression von TGF- β 2 im zyklischen equinen Endometrium Stute 2, Tag 10 post ovulationem: kräftige intrazytoplasmatische Expression in den luminalen Epithelzellen (L), gering- bis mittelgradige Expression in den Stromazellen (Pfeil) und glandulären Epithelien (G). (Immunhistologie, Nomarski-Interferenzkontrast)
Expression of TGF- β 2 in the equine cyclic endometrium. Mare 2, day 10 post ovulation: strong staining intensity in the luminal epithelial cells (L) mild to moderate staining intensity in the endometrial stroma cells (arrow) and glandular epithelia (G). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

Expression durch Progesteron ist allerdings unwahrscheinlich, da den Promotoren der TGF- β -Gene vollständige Hormon-Response-Elemente fehlen (Kim et al. 1989b, Kingsley-Kallesen et al. 1999, Lafyatis et al. 1990, Nixon et al. 2000, Takahashi et al. 1994). Eine indirekte Regulation z.B. über Transkriptionsfaktoren der Activating Protein-1-Familie (Kim et al. 1989a) bzw. über cAMP (Lafyatis et al. 1990) ist wahrschein-

licher. Eine Beurteilung der hormonellen Beeinflussung der TGF- β -Expression allein anhand immunhistologischer Ergebnisse ist jedoch schwierig, da z.B. TGF- β 1 autoinduktiv ist (Kim et al. 1990) und eine Modulation der TGF- β -Level auch

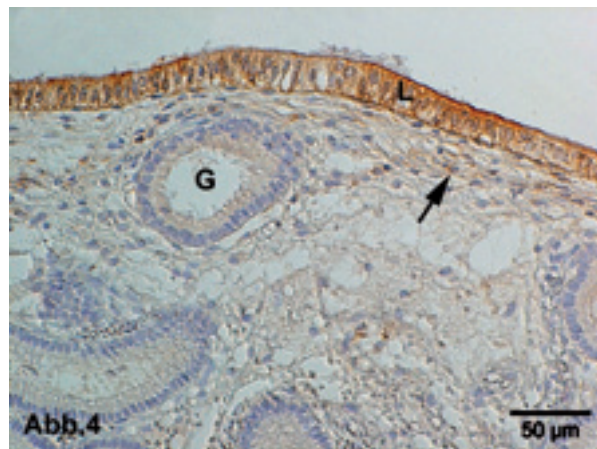


Abb. 4 Expression von TGF- β 3 im zyklischen equinen Endometrium Stute 1, Tag 10 post ovulationem: kräftige intrazytoplasmatische Expression von TGF- β 3 in den luminalen Epithelzellen (L) und schwache Reaktion in den glandulären Epithelien (G) und Stromazellen (Pfeil). (Immunhistologie, Nomarski-Interferenzkontrast)
Expression of TGF- β 3 in the equine cyclic endometrium. Mare 1, day 10 post ovulation: strong intracytoplasmatic staining intensity in the luminal epithelial cells (L) and weak reaction in the glandular epithelia (G) and stroma cells (arrow). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

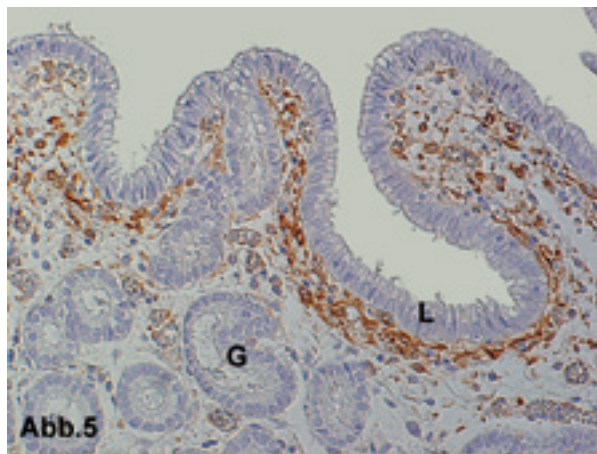


Abb. 5 Expression von MMP-2 im zyklischen equinen Endometrium Stute 3, Tag 10 post ovulationem: hochgradige Expression in zahlreichen endometrialen Stromazellen des Stratum compactum. Die luminalen (L) und glandulären (G) Epithelien reagieren negativ. (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)
Expression of MMP-2 in the equine cyclic endometrium. Mare 3, day 10 post ovulation: strong staining intensity in many endometrial stromal cells of the stratum compactum. The luminal (L) and glandular (G) epithelia show negative reaction. (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

posttranskriptional ohne De-novo-Proteinsynthese stattfindet (Assoian et al. 1987, Kim et al. 1992). Untersuchungen der TGF- β -mRNA-Expression im Zyklus des Pferdes sowie Versuche mittels Zellkultur zur Beeinflussbarkeit der TGF- β -Expression von Stroma- und Epithelzellen durch ovarielle Steroide wären zur definitiven Klärung einer steroidabhängigen TGF- β -Regulation bei der Stute erforderlich.

Matrixmetalloproteinase-2

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Walter et al.* (2005) wird auch im eigenen Untersuchungsgut im equinen Endometrium eine kräftige, intrazytoplasmatische Expression von MMP-2 in den Stromazellen mit einem Expressionsmaximum im Interöstrus beobachtet. Im Stratum compactum wird in allen Zyklusphasen in den direkt unterhalb des luminalen Epithels lokalisierten Stromazellen und sehr dezent auch extrazellulär eine deutliche Expression von MMP-2 nachgewiesen. Im Gegensatz zu *Walter et al.* (2005) sind im eigenen Untersuchungsgut im Stratum spongiosum ebenfalls einzelne Stromazellen mit positiver intrazytoplasmatischer Reaktion nachweisbar. Der beobachtete Anstieg der stromalen MMP-2-Expression im Interöstrus mit dem Abfall der Serumprogesteronkonzentrationen lässt eine Steroidhormon-vermittelte Regulation vermuten. Ähnliche Ergebnisse wurden beim Menschen mittels *in vitro* Untersuchungen gewonnen. So weisen *Salamonsen et al.* (1997) und *Irwin et al.* (1996) eine erhöhte stromale Sekretion von MMP-2 nach Verminderung der Progesteronzugabe nach. *Hashizume et al.* (2003) kann anhand von bovinen Stromazellkulturen zeigen, dass Progesteron in niedrigen Dosen die MMP-2-Produktion hemmt und in hohen Dosen fördert. Die direkte Regulation der Expression durch Progesteron ist jedoch unwahrscheinlich, da dem MMP-2-Gen spezifische Hormon-Response-Elemente fehlen (*Huhtala et al.* 1990). Eine indirekte Regulation über parakrin wirkende Zytokine wie z.B. TGF- β (*Overall et al.* 1989), TNF- α und - β sowie IGF-1 (*Hashizume et al.* 2003) wird in der Literatur diskutiert. Studien zur hormonellen Beeinflussung der MMP-2-Expression im equinen Endometrium existieren bislang nicht. Eine Unterscheidung der Enzymaktivität (aktiv/inaktiv) von MMP-2 (*Walter et al.* 2005) wurde in der vorliegenden Studie nicht vorgenommen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei der Stute eine zyklusabhängige Expression der TGF- β -Isoformen sowie des Enzyms MMP-2 vorliegt. Zur abschließenden Klärung, ob es sich um eine hormonabhängige Regulation der TGF- β -Wachstumsfaktoren und des Enzyms MMP-2 bei der Stute handelt, sind jedoch noch weiterführende Untersuchungen nötig. TGF- α weist im equinen Endometrium anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Zyklusdynamik auf. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse stellen für die Klärung der equinen Endometrose, einer irreversiblen degenerativen, fertilitätsrelevanten Erkrankung der Stute (*Hoffmann et al.* 2009, *Schoon et al.* 1997), wichtige Daten dar. Da insbesondere die Wachstumsfaktoren der TGF-Familie profibrotische Wirkungen besitzen (*Bassols und Massague* 1988, *Coker et al.* 1997, *Hardie et al.* 2004, *Liu et al.* 2001, *Sime et al.* 1997) und die Störungen der EZM (inkl. MMP-2) in der Endometrose eine wichtige Rolle übernehmen, würden weiterführende Untersuchungen an Endometriumbiopsaten von Stuten mit Endometrose im Vergleich zu den hier gewonnenen Erkenntnissen mögliche Ansätze der bisher ungeklärten Ätiopathogenese der Endometrose liefern.

Danksagungen

Vielen Dank an Prof. Dr. H.-O. Hoppen (Endokrinologisches Labor, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover) für die Bestimmung der

Serumhormonwerte. Ein großer Dank gilt auch Frau Herzog, Frau Schleinitz und Frau Pleitz für die Anfertigung sehr guter histologischer Schnitte sowie Frau Wipplinger für die sorgfältige Arbeit bei der Durchführung der Immunhistologie.

Literatur

- Assoian R. K., Fleurdelys B. E., Stevenson H. C., Miller P. J., Madtes D. K., Raines E. W., Ross R. and Sporn M. B.* (1987) Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84, 6020-6024
- Aupperle H., Özgen S., Schoon H.A., Schoon D., Hoppen H.O., Sieme H. and Tannapfel A.* (2000) Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Vet. J.* 32, 228-232
- Bassols A. and Massague J.* (1988) Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 263, 3039-3045
- Behrens C., Aurich J. E., Klug E., Naumann H. and Hoppen H. O.* (1993) Inhibition of gonadotrophin release in mares during the luteal phase of the oestrous cycle by endogenous opioids. *J. Reprod. Fertil.* 98, 509-514
- Boomsma R. A., Mavrogianis P. A. and Verhage H. G.* (1997) Immunocytochemical localization of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the cat endometrium and placenta. *Histochem. J.* 29, 495-504
- Borgundvaag B., Kudlow J. E., Mueller S. G. and George S. R.* (1992) Dopamine receptor activation inhibits estrogen-stimulated transforming growth factor-alpha gene expression and growth in anterior pituitary, but not in uterus. *Endocrinology* 130, 3453-3458
- Brunckhorst D., Schoon H. A., Bader H. and Sieme H.* (1991) Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertil.* 7, 44-51
- Bruner K. L., Rodgers W. H., Gold L. I., Korc M., Hargrove J. T., Matriasian L. M. and Osteen K. G.* (1995) 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* 92, 7362-7366
- Casslen B., Sandberg T., Gustavsson B., Willen R. and Nilbert M.* (1998) Transforming growth factor beta1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biol. Reprod.* 58, 1343-1350
- Chatzaki E., Kouimtoglou E., Margioris A. N. and Gravanis A.* (2003) Transforming growth factor beta1 exerts an autocrine regulatory effect on human endometrial stromal cell apoptosis, involving the FasL and Bcl-2 apoptotic pathways. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 91-95
- Chegini N., Zhao Y., Williams R. S. and Flanders K. C.* (1994) Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1), TGF beta 2, TGF beta 3, and TGF beta type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I]TGF beta 1-binding sites. *Endocrinol.* 135, 439-449
- Chia C. M., Winston R. M. and Handyside A. H.* (1995) EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development* 121, 299-307
- Coker R. K., Laurent G. J., Shahzeidi S., Lympany P. A. du Bois R. M., Jeffery P. K. and McAnulty R. J.* (1997) Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production *in vitro* but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 150, 981-991
- Ejskjaer K., Sorensen B. S., Poulsen S. S., Mogensen O., Forman A. and Nexø E.* (2005) Expression of the epidermal growth factor system in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 543-551

- Ellenberger C., Wilsher S., Allen W. R., Hoffmann C., Kalling M., Bazer F. W., Klug J., Schoon D. and Schoon H. A. (2008) Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology* 70, 746-757
- Gaide Chevronnay H. P., Cornet P. B., Delvaux D., Lemoine P., Courtoy P. J., Henriot P. and Marbaix E. (2008) Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium. *Endocrinology* 149, 1015-1025
- Giudice L. C. (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 61, 1-17
- Gold L. I., Saxena B., Mittal K. R., Marmor M., Goswami S., Nactigal L., Korc M. and Demopoulos R. I. (1994) Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res.* 54, 2347-2358
- Günzel-Apel A.R., Brinkmann H.G. and Hoppen H. O. (1990) Dynamik der LH- und Testosteronsekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen. *Reprod. Dom. Anim.* 25, 78-86
- Häfner I. (1999) Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute. *Diss. Med. Vet. Leipzig*
- Hammond M. G., Oh S. T., Anners J., Surrey E. S. and Halme J. (1993) The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168, 1131-1136
- Hardie W. D., Le Cras T. D., Jiang K., Tichelaar J. W., Azhar M. and Korfhagen T. R. (2004) Conditional expression of transforming growth factor-alpha in adult mouse lung causes pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 286, L741-L749
- Hashizume K., Takahashi T., Shimizu M., Todoroki J., Shimada A., Hirata M., Sato T. and Ito A. (2003) Matrix-metalloproteinases-2 and -9 production in bovine endometrial cell culture. *J. Reprod. Dev.* 49, 45-53
- Hoffmann C., Ellenberger C., Mattos R. C., Aupperle H., Dhein S., Stief B. and Schoon H. A. (2009) The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod.Sci* 111, 261-278
- Hoppen H. O. (1995) Endocrine diagnostic techniques in equine reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 30, 149-152
- Huhtala P., Chow L. T. and Tryggvason K. (1990) Structure of the human type IV collagenase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 11077-11082
- Imai T., Kurachi H., Adachi K., Adachi H., Yoshimoto Y., Homma H., Tadokoro C., Takeda S., Yamaguchi M. and Sakata M. (1995) Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. *Biol. Reprod.* 52, 928-938
- Irwin J. C., Kirk D., Gwatkin R. B., Navre M., Cannon P. and Giudice L. C. (1996) Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. *J. Clin. Invest* 97, 438-447
- Irwin J. C., Utian W. H. and Eckert R. L. (1991) Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129, 2385-2392
- Isaka K., Usuda S., Ito H., Sagawa Y., Nakamura H., Nishi H., Suzuki Y., Li Y. F. and Takayama M. (2003) Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 24, 53-64
- Kim M. R., Park D. W., Lee J. H., Choi D. S., Hwang K. J., Ryu H. S. and Min C. K. (2005) Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 801-808
- Kim S. J., Angel P., Lafyatis R., Hattori K., Kim K. Y., Sporn M. B., Karin M. and Roberts A. B. (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell Biol.* 10, 1492-1497
- Kim S. J., Denhez F., Kim K. Y., Holt J.T., Sporn M. B. and Roberts A. B. (1989a) Activation of the second promoter of the transforming growth factor-beta 1 gene by transforming growth factor-beta 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. *J. Biol. Chem.* 264, 19373-19378
- Kim S. J., Glick A., Sporn M. B. and Roberts A. B. (1989b) Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J. Biol. Chem.* 264, 402-408
- Kim S. J., Park K., Koeller D., Kim K. Y., Wakefield L. M., Sporn M. B. and Roberts A. B. (1992) Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J. Biol. Chem.* 267, 13702-13707
- Kingsley-Kallesen M. L., Kelly D. and Rizzino A. (1999) Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta2 promoter by cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and activating transcription factor-1 (ATF-1) is modulated by protein kinases and the coactivators p300 and CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 34020-34028
- Lafyatis R., Lechleider R., Kim S. J., Jakowlew S., Roberts A. B. and Sporn M. B. (1990) Structural and functional characterization of the transforming growth factor beta 3 promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced transcription. *J. Biol. Chem.* 265, 19128-19136
- Liu J. Y., Sime P. J., Wu T., Warshamana G. S., Pociask D., Tsai S. Y. and Brody A. R. (2001) Transforming growth factor-beta(1) overexpression in tumor necrosis factor-alpha receptor knockout mice induces fibroproliferative lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 3-7
- Nasu K., Nishida M., Matsumoto H., Bing S., Inoue C., Kawano Y. and Miyakawa I. (2005) Regulation of proliferation, motility, and contractivity of cultured human endometrial stromal cells by transforming growth factor-beta isoforms. *Fertil. Steril.* 84 Suppl 2, 1114-1123
- Nelson K. G., Takahashi T., Lee D. C., Luetke N. L., Ross, K., Eitzman B. E. and McLachlan J. A. (1992) Transforming growth factor-alpha is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 131, 1657-1664
- Nixon A. J., Brower-Toland B. D. and Sandell L. J. (2000) Molecular cloning of equine transforming growth factor-beta1 reveals equine-specific amino acid substitutions in the mature peptide sequence. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 261-272
- Overall C. M., Wrana J. L. and Sodek J. (1989) Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 264, 1860-1869
- Özgen S. (1999) Die Hydromukometra bei der Stute. Untersuchungen zur Ätiopathogenese, diagnostischen Differenzierung und therapeutischen Beeinflussbarkeit. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Özgen S., Rasch K., Kropp G., Schoon H. A., Aupperle H. and Sieme H. (1997) Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromukometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde* 13, 533-534
- Reis F. M., Lhullier C., Edelweiss M. I. and Spritzer P. M. (2005) In vivo assessment of the regulation of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human endometrium by medroxyprogesterone acetate. *J. Assist. Reprod. Genet.* 22, 19-24
- Reis F. M., Ribeiro M. F., Maia A. L. and Spritzer P. M. (2002) Regulation of human endometrial transforming growth factor beta1 and beta3 isoforms through menstrual cycle and medroxyprogesterone acetate treatment. *Histol. Histopathol.* 17, 739-745
- Riley S. C., Webb C. J., Leask R., McCaig F. M. and Howe D. C. (2000) Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodelling in the sheep placenta. *J. Reprod. Fertil.* 118, 19-27
- Rodriguez G. C., Rimel B. J., Watkin W., Turbov J. M., Barry C., Du H., Maxwell G. L. and Cline J. M. (2008) Progestin treatment induces apoptosis and modulates transforming growth factor-beta in the uterine endometrium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 578-584
- Romeis B. und Böck P. (1989) *Mikroskopische Technik.* Urban und Schwarzenberg Verlag, München 17th.

- Rudolph-Owen L. A., Hulboy D. L., Wilson C. L., Mudgett J. and Matrisian L. M. (1997) Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology* 138, 4902-4911
- Salamonsen L. A., Butt A. R., Hammond F. R., Garcia S. and Zhang J. (1997) Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82, 1409-1415
- Schoon H. A., Schoon D. and Klug E. (1997) Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde* 13, 453-464
- Schoon H.A., Schoon D. and Klug E. (1992) Uterusbiospien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* 8, 355-362
- Shooner C., Caron P. L., Frechette-Frigon G., Leblanc V., Dery M. C. and Asselin E. (2005) TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 20-
- Sime P. J., Xing Z., Graham F. L., Csaky K. G. and Gaudie J. (1997) Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest* 100, 768-776
- Stief B. (2006) Heilungsvorgänge am Uterus der Stute nach minimalinvasiven chirurgischen Eingriffen. Diss. Med. Vet. Leipzig
- Takahashi T., Eitzman B., Bossert N. L., Walmer D., Sparrow K., Flanders K. C., McLachlan J. and Nelson K. G. (1994) Transforming growth factors beta 1, beta 2, and beta 3 messenger RNA and protein expression in mouse uterus and vagina during estrogen-induced growth: a comparison to other estrogen-regulated genes. *Cell Growth Differ.* 5, 919-935
- Tamada H., Tominaga M., Kida K., Kawate N., Inaba T., Matsuyama S. and Sawada T. (2005) Detection of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of the corresponding proteins in the canine uterus during the estrous cycle. *Histol. Histopathol.* 20, 817-824
- Tamada H., Tsubutani D., Kawate N., Inaba T., Matsuyama S., Imakawa K., Sakai S., Christenson R. K. and Sawada T. (2002) Detection of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of their proteins in the ovine uterus during the early implantation period. *Histochem. J.* 34, 383-390
- Tang X. M., Zhao Y., Rossi M. J., bu-Rustum R. S., Ksander G. A. and Chegini N. (1994) Expression of transforming growth factor-beta (TGF beta) isoforms and TGF beta type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF beta s on endometrial stromal cell growth and protein degradation in vitro. *Endocrinology* 135, 450-459
- Turksen K., Choi Y. and Fuchs E. (1991) Transforming growth factor alpha induces collagen degradation and cell migration in differentiating human epidermal raft cultures. *Cell Regul.* 2, 613-625
- Uekita T., Yamanouchi K., Sato H., Tojo H., Seiki M. and Tachi C. (2004) Expression and localization of matrix metalloproteinases (MT1-MMP, MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) during synepitheliochorial placentation of goats (*Capra hircus*). *Placenta* 25, 810-819
- Walter I. and Boos A. (2001) Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta* 22, 473-483
- Walter I., Handler J., Miller I. and Aurich C. (2005) Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometriosis. *Histol. Histopathol.* 20, 1105-1113
- Wang H., Li Q., Shao L. and Zhu C. (2001) Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 65, 31-40
- Wilson C. L., Heppner K. J., Rudolph L. A. and Matrisian L. M. (1995) The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. *Mol. Biol. Cell* 6, 851-869
- Yue Z. P., Yang Z. M., Li S. J., Wang H. B. and Harper M. J. (2000) Epidermal growth factor family in rhesus monkey uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 164-174
- Zhang J. and Salamonsen L. A. (2002) In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 2346-2351
- Zhao Y. G., Xiao A. Z., Cao X. M. and Zhu C. (2002) Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 149-158

Claudia Kiesow
Landesamt für Verbraucherschutz
Haferbreiter Weg 132-135
39576 Stendal
claudia.kiesow@lav.ms.sachsen-anhalt.de