

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer

**erbB-Rezeptoren und ihre Liganden im Kaninchen**  
**und ihre Expression während der Periimplantationsphase**

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Patricia Wolf

geb. am: 15. September 1973 in: Lublin

Gutachter:

1. Prof.Dr.Dr. Bernd Fischer
2. Prof.Dr. Henning Dralle
3. Prof.Dr. Elke Winterhager

Halle, den 12. April 2001

## KURZREFERAT

Wachstumsfaktoren der EGF-Familie und ihre Rezeptoren erbB1-4 haben eine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung und werden zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten differentiell exprimiert. Bisher waren noch keine Daten zum Kaninchen verfügbar. Mit der vorliegenden Arbeit wird diese Lücke geschlossen und die Grundlage für funktionelle Folgestudien geschaffen. Mittels nested RT-PCR wurden zunächst Teilsequenzen für die Transkripte von erbB1-4 und ihren Liganden EGF, HB-EGF und TGF $\alpha$  ermittelt und hinsichtlich ihrer Homologie zu bereits bekannten Sequenzen anderer Spezies beurteilt. Diese Sequenzen wurden dann genutzt, um für das Kaninchen spezifische Primer zu synthetisieren, mit denen dann Uterusgewebe der Prä- bis Postimplantationsphase (Tag 3 bis 14) sowie 6 Tage alte Blastozysten und 14 Tage alte Feten untersucht wurden. Alle für das Kaninchen ermittelten cDNA-Rezeptor- und Ligandenteilsequenzen weisen hohe Homologien zu anderen Spezies auf, was auf eine evolutionär konservierte Funktion der klonierten Proteinbereiche hindeutet. Die Rezeptoren erbB1-3 und die Liganden EGF und TGF $\alpha$  konnten beim Kaninchen mittels RT-PCR in allen untersuchten Stadien und Geweben nachgewiesen werden. Sie scheinen somit für Wachstum und Entwicklung von Embryo und Uterus während der Gravidität des Kaninchens von Bedeutung zu sein. ErbB4 wird im Kaninchenuterus während der Prä- und Implantationsperiode schwächer exprimiert als in der Postimplantationsperiode. Es findet sich auch nur eine schwache Expression in 6 Tage alten Blastozysten, wohingegen es in 14 Tage alten Feten deutlich amplifiziert werden kann. Möglicherweise ist erbB4 während der Periimplantationsperiode nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und gewinnt erst in der Postimplantationsperiode zunehmend an Bedeutung. Auch HB-EGF scheint für die Entwicklungsprozesse während der Gravidität des Kaninchens weniger essentiell zu sein und nur in geringen Maße exprimiert zu werden. Sein Transkript konnte mittels RT-PCR nur nach Reamplifikation primärer PCR-Produkte in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die Expression von erbB-Rezeptoren und ihren Liganden im graviden Uterus ist unabhängig von der Anwesenheit des Konzeptus, da die genannten Transkripte auch in verschiedenen Pseudograviditätsstadien gefunden wurden. Das Vorhandensein von erbB-Rezeptoren und ihren Liganden im uterinen Gewebe während der Implantation und Plazentation weist auf eine funktionelle Bedeutung für die in dieser Entwicklungsperiode ablaufenden feto-maternalen Interaktionen hin.

Wolf, Patricia: erbB-Rezeptoren und ihre Liganden im Kaninchen und ihre Expression während der Periimplantationsphase. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	1
1.1. Tyrosinkinasen und Entwicklung	1
1.2. Die frühe Embryonalentwicklung des Kaninchens	2
1.3. Die Familie der erbB-Rezeptoren	3
1.3.1. Allgemeine Einteilung und Funktionsweise	3
1.3.2. erbB 1	5
1.3.3. erbB 2	7
1.3.4. erbB 3	7
1.3.5. erbB 4	7
1.4. Die Familie der erbB-Liganden	9
1.4.1. Allgemeine Struktur und Wirkungsweise	9
1.4.2. EGF	10
1.4.3. TGF $\alpha$	11
1.4.4. HB-EGF	12
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	13
2.1. Chemikalien und Enzyme	13
2.2. Versuchstiere, Gewebe- und Embryonengewinnung	14
2.3. RNA-Präparation	15
2.4. DNase-Verdau und cDNA-Synthese	15
2.5. nested und spezifische RT-PCR	15
2.6. Primer-Synthese	17
2.7. Klonierung	18
2.8. Sequenzierung und Homologievergleiche	19
2.9. Restriktionsanalyse	19
<b>3. ERGEBNISSE</b>	20
3.1. Sequenzierung und Homologievergleiche	20
3.1.1. erbB-Rezeptoren	20
3.1.1.1. <i>erbB1</i>	20
3.1.1.2. <i>erbB2</i>	21
3.1.1.3. <i>erbB3</i>	23
3.1.1.4. <i>erbB4</i>	24
3.1.1.5. <i>Zusammenfassung</i>	26
3.1.2. erbB-Liganden	28
3.1.2.1. <i>EGF</i>	28
3.1.2.2. <i>TGF<math>\alpha</math></i>	29
3.1.2.3. <i>HB-EGF</i>	30

3.1.2.4.	<i>Zusammenfassung</i>	32
3.2.	Expressionsmuster während verschiedener Graviditätsstadien	33
3.2.1.	erbB-Rezeptoren	33
3.2.1.1.	<i>erbB1</i>	33
3.2.1.2.	<i>erbB2</i>	34
3.2.1.3.	<i>erbB3</i>	35
3.2.1.4.	<i>erbB4</i>	36
3.2.1.5.	<i>Zusammenfassung</i>	37
3.2.2.	erbB-Liganden	38
3.2.2.1.	<i>EGF</i>	38
3.2.2.2.	<i>TGF<math>\alpha</math></i>	39
3.2.2.3.	<i>HB-EGF</i>	40
3.2.2.4.	<i>Zusammenfassung</i>	40
3.3.	Pseudogravide und nichtgravide Uteri	41
3.4.	Restriktionsanalyse und Sequenzierung der PCR-Produkte	42
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	43
4.1.	Sequenzanalyse	43
4.2.	Expression der erbB-Rezeptoren	44
4.3.	Expression der erbB-Liganden	51
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	60
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	62
<b>7.</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN</b>	78
<b>8.</b>	<b>THESEN</b>	79

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AR	Amphiregulin
bp	base pairs (Basenpaare)
BTC	Betacellulin
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Estrogen
EGF	Epidermal Growth Factor
EPR	Epiregulin
ER	Estrogenrezeptor
fl-erbB	full-length-erbB
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GF	Growth factor (Wachstumsfaktor)
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hCG	humanes Choriongonadotropin
HER	humaner EGF-Rezeptor
HRG	Heregulin
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
ICM	Inner cell mass
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
min	Minuten
NRG	Neuregulin
OD	optische Dichte
P <sub>4</sub>	Progesteron
PA	Plasminogenaktivator
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PG	Prostaglandin
PP	Pseudopregnancy
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse transcription
SH-2	src homology 2 protein
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor alpha
tr-erbB	trunkierter erbB
Vol	Volumenteil
X-Gal	5-Chlor-4-bromo-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Tyrosinkinasen und Entwicklung

Viele für die Embryonalentwicklung typische Zellfunktionen wie Proliferation, Migration und Differenzierung werden von Signaltransduktionssystemen kontrolliert, die durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an Zelloberflächenrezeptoren aktiviert werden. Die Mehrzahl dieser Rezeptoren besteht aus einem extrazellulär lokalisierten Ligandenbindenden Bereich, der mit einer zytoplasmatischen Domäne verbunden ist, welche eine tyrosinspezifische Proteinkinase besitzt (Ullrich & Schlessinger 1990; Carpenter & Wahl 1990). Die Expression und Funktionalität der membranständigen Tyrosinkinasen und ihrer Liganden wurde in Präimplantationsembryonen und im weiblichen Reproduktionstrakt verschiedener Spezies demonstriert (Kliem et al. 1998, Paria et al. 1991, 1993a, 1994a; Vaughan et al. 1992a; Zhang et al. 1992a,b; Das et al. 1994a,b; Chia et al. 1995).

Zwei für eine erfolgreiche embryonale Entwicklung kritische Vorgänge, die Zellteilung und Zelldifferenzierung, werden von Wachstumsfaktoren stimuliert. Die In-vitro-Entwicklung des Embryos läuft im Vergleich zu der in vivo verzögert ab, weshalb man davon ausgehen kann, daß Faktoren des uterinen Milieus für Zellteilung und -differenzierung von Bedeutung sind (Giudice 1994, Paria et al. 1990). Während der intrauterinen Präimplantationsphase kommt es nur dann zu einer normalen Blastozystenentwicklung und nachfolgenden Implantation, wenn das mütterliche Milieu den Bedürfnissen der Blastozyste angepaßt ist, und beide Systeme, Uterus und Embryo, synchronisiert sind (Fischer 1989; Denker 1995). Dies wird nur für einen relativ kurzen Zeitraum gewährleistet, dem sogenannten „Implantationsfenster“ (Psychoyos 1986; Sarantis et al. 1988). Hierbei spielen Signaltransduktionssysteme der Wachstumsfaktoren eine Rolle, indem sie den Uterus in einen empfängnisbereiten und die Blastozyste in einen invasionsbereiten Zustand versetzen (Fantl et al. 1993, Fischer 1989). Typische Reaktionen des Embryos auf Wachstumsfaktoren der EGF-Familie sind u.a. eine erhöhte RNA/DNA-Synthese, eine verstärkte Proteinsynthese sowie eine Zunahme der Zellzahl (Wood et al. 1989; Paria 1990 et al.)

Eine detaillierte Analyse der zeitlichen und räumlichen Expression der erbB-Rezeptoren und ihrer Liganden im Uterus und Embryo ist für ein besseres Verständnis der Rolle von Ligand-Rezeptor-Interaktionen während der Implantation notwendig. Die wohl detailliertesten Kenntnisse über das Vorhandensein und die Wirkung von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren während der Embryonalentwicklung liegt für die Maus vor (Harvey & Leco 1995; Wiley et al. 1992).

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Erweiterung des Wissens um das Vorhandensein von erbB-Rezeptoren und ihrer Liganden während der Embryonalentwicklung im Kaninchen geleistet und somit die Grundlage für funktionelle Untersuchungen geschaffen werden.

## **1.2. Die frühe Embryonalentwicklung des Kaninchens**

Das Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) wird, je nach Rasse, mit 3 – 7 Monaten geschlechtsreif (Zuchtreife nach 7 – 9 Monaten; Schnorr 1989). Die Ovulation findet ca. 10 Stunden nach dem Deckakt statt. Nach der Befruchtung der Eizelle im Eileiter beginnt die erste Furchungsteilung der Zygote 22 – 24 h post coitum (p.c.). Das Morulastadium wird dann 2 – 3 Tage p.c. erreicht. Aus der Morula entsteht innerhalb des folgenden Tages die Blastozyste, welche am 3. – 4. Tag p.c. in das Uteruslumen eintritt. Hier beginnt dann am späten 6. Tag p.c. die Implantation (Schnorr 1989, Fischer et al. 1988).

Die Implantation erstreckt sich über einen Zeitraum von etwa 2 Tagen und beginnt mit der Anlagerung und Anheftung der Blastozyste an der antimesometrialen Uterusoberfläche, d.h. gegenüber dem späteren, mesometrial gelegenen Implantationsort. Der Implantationsprozess beinhaltet Zellfusionen, Zytoplasmaumwandlungen und die invasive Penetration der Basallamina (Larsen 1961; Enders & Schlafke 1971; Schlafke & Enders 1975; Segalen & Chambon 1983;). Am Tag 7 p.c. haben sich an der Blastozyste Trophoblastaggregate (Knoten) gebildet, die sich am Endometrium anlagern, und zwar nur dort wo unmittelbar unterhalb des Epithels auch ein Blutgefäß vorhanden ist (Segalen & Chambon 1983). Ein großer Teil dieser Trophoblastknoten fusioniert mit den apikalen Abschnitten einzelner Epithelzellen des Endometriums, während sich in anderen Kontaktbereichen Trophoblastprotrusionen zwischen den Epithelzellen zur Basallamina vorschieben (Larsen 1961; Enders & Schlafke 1969, 1971). Bereits am Ende dieses 7. Tages p.c. ist eine Penetration von oberflächlichen Blutgefäßen an mesometrialen Stellen im Implantationsbereich sichtbar (Hoffman et al. 1990). Die Entwicklung der discoidalen, hämodichorialen Labyrinthplazenta des Kaninchens beginnt am 8. Tag p.c mit der perivaskulären Dezidualisierung der Stromazellen (Denker 1995). Ende des 10. Tages, wenn Trophoblasten in die mütterlichen Gefäße eingedrungen sind, stellen sich dann die mit mütterlichen Blut gefüllten Lakunen der Plazenta dar (Larsen 1961; Fischer et al. 1991).

Auch im Uterusgewebe selbst vollziehen sich in den Tagen nach der Ovulation tiefgreifende Veränderungen. Zunächst nimmt die Dominanz des Östrogens zugunsten eines steigenden Progesteroneinflusses 3,5 – 4 Tage p.c. ab (Browning et al. 1980). Durch

zunehmende Proliferation bilden sich verstärkt endometriale Faltungen aus (Davies 1973). Mit den steigenden Progesteronwerten kommt es am Tag 4 – 7 p.c. auch zu einer zunehmenden epithelialen Zelldifferenzierung mit Zelloberflächenveränderungen und stadiumspezifischer Sekretproduktion im Uterus (Beier 1974; Davies et al. 1973; Anderson et al. 1986). Zu diesem Zeitpunkt kann an verschiedenen Stellen des Uterus auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität festgestellt werden (Hoffman et al. 1978; Hoos et al. 1980). Bei dem Prozeß der Implantation und Dezidualisierung haben Prostaglandine eine wichtige Mediatorrolle, indem sie die Angiogenese, die Gefäßpermeabilität und die Uteruskontraktion zur Verteilung der Blastozysten fördern (Dey et al. 1986; Kohn et al. 1995; Chakraborty et al. 1996; Legrand et al. 1989; Crane et al. 1991).

### **1.3. Die Familie der erbB-Rezeptoren**

#### **1.3.1. Allgemeine Einteilung und Funktionsweise**

Membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) beeinflussen durch die Bindung entsprechender Liganden an die extrazelluläre Bindungsdomäne die Differenzierung und Proliferation von Zellen (Ullrich & Schlessinger 1990; van der Geer et al. 1994). Die erbB-Gruppe, auch HER (humane EGF-Rezeptoren) genannt, bildet eine Subfamilie der RTKs (Fantl et al. 1993; Alroy & Yarden 1997). Zu dieser gehören erbB1, erbB2, erbB3 sowie erbB4 (Bargmann et al. 1986, Yamamoto et al. 1986, Lax et al. 1988, Plowman et al. 1993). Da bei dem Invertebraten *Caenorhabditis elegans* oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nur ein erbB-Mitglied exprimiert wird, nimmt man an, daß bei den Säugern Genduplikationsereignisse zur Erweiterung des erbB-Netzwerk führten, wodurch eine größere Signalvielfalt möglich wird (Pinkas-Kramarski et al. 1998, Stein & Staros 2000). Diese Vielfalt wird zum einen durch die Rezeptorenzahl und die verschiedenen Kombinationen als Homo- und Heterodimere gewährleistet. Zum anderen trägt hierzu auch die unterschiedliche Ligandenspezifität und die unterschiedliche Gewebelokalisation der entsprechenden erbB-Kombinationen bei (Carraway & Cantley 1994, Karunagaran et al. 1996, Pinkas-Kramarski et al. 1998a, Jones et al. 1999).

Die Aktivierung der Rezeptoren führt durch Liganden-induzierte Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors zur Bildung von Dimeren (Ullrich & Schlessinger 1990, Wada et al. 1990, Carraway & Cantley 1994, Lemmon et al. 1997), was in den meisten Fällen zur Erhöhung der Bindungsaffinität für die Liganden und somit zur Aktivitätssteigerung des Signalkomplexes führt (Wada 1990, Zhou et al. 1993, Beerli et al. 1995). Durch die Dimerisierung der erbB-Rezeptoren wird deren Tyrosinkinase aktiviert und ihre intrazelluläre Domäne an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Dies

wiederum erzeugt Bindungsstellen für Signalmoleküle mit SH2- oder Phosphotyrosinbindungsdomänen (Pawson 1995, Koch et al. 1991, Kavanaugh & Williams 1994). Diese weit verbreitete SH2-Domäne besteht aus etwa 100 Aminosäuren, die das phosphorylierte Tyrosin und die unmittelbar benachbarten Aminosäuren taschenartig umschließen (Fantl et al. 1992, 1993). Zu den wichtigsten Trägern dieser Adapterdomäne zählen die Phospholipase C (PLC)- $\gamma$ , p21<sup>ras</sup> GTPase aktivierendes Protein (GAP), Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) und die Gruppe der Src-ähnlichen Tyrosinkinase (Koch et al. 1991, Solthoff et al. 1994). Diese Proteine werden nach Bindung an einen aktivierten Rezeptor von dessen Kinase phosphoryliert und dadurch in ihrer Aktivität verändert. Auf diese Weise werden weiterführende Signaltransduktionswege in Gang gesetzt, die die Expression verschiedener Gene, den Zellstoffwechsel und die Zellteilung regulieren (Segatto et al. 1993, Prigent & Gullick 1994, D'Souza et Taylor-Papadimitriou 1994, Fedi et al. 1994).

Insgesamt existieren 10 verschiedene dimere erbB-Kombinationen, die sich jedoch in ihrer Stabilität und ihrer Potenz, Signale auszulösen, unterscheiden (Abb. 1). Ihre Bildung erfolgt nicht zufällig, sondern unterliegt einer gewissen

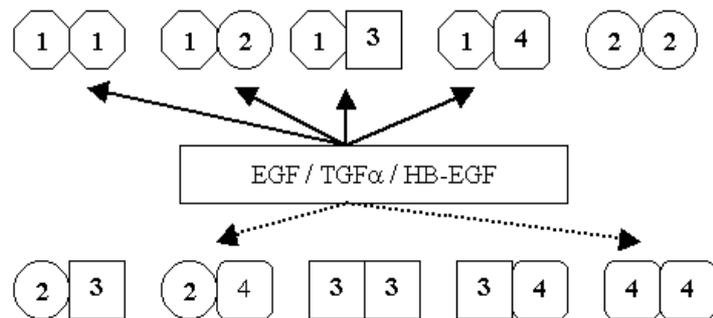


Abb.1: Zusammenfassung möglicher erbB-Dimerisierung und ihrer bevorzugten Stabilisierung von in dieser Arbeit untersuchten Liganden (nach Shelly et al. 1998, Alroy et Yarden 1997) durchbrochene Pfeile = schwächere Bindung der Liganden

Hierarchie, d.h. es entstehen bevorzugt bestimmte Rezeptor-kombinationen, die oft Liganden-spezifisch sind (Abb. 1, Tzahar et al. 1996, Beerli & Hynes 1996, Huang et al. 1998, Jones et al. 1999). So haben Homodimere eine relativ geringe biologische Aktivität, während Heterodimere diesbezüglich aktiver sind (Zhang et al. 1996, Riese et al. 1995, Muthuswamy et al. 1999). Yarden und Schlessinger (1987) konnten zeigen, daß eine Dimerformation für eine Aktivierung ausreichend ist. Neuere Daten lassen jedoch auch vermuten, dass es zur Bildung von Oligomeren kommt (Murali et al. 1996, Luo et al. 1996, Worthylake et Wiley 1997, Huang et al. 1998). Hierbei geht man davon aus, dass die Dimerisierung von zunächst gebildeten Liganden (L)<sub>1</sub>-Rezeptor(R)<sub>1</sub>-Komplexen zur Ausbildung des aktiven L-R-Komplexes, der aus einem L<sub>2</sub>-R<sub>2</sub>-Tetramer besteht, führt (Burke et al. 1998, Lemmon et al. 1997). Die Vereinigung dieser Komplexe wird durch die Bindungsbivalenz der Liganden gefördert (Tzahar et al. 1997, Lemmon et al. 1997). Durch die Rezeptor-Interaktionen bildet die erbB-Familie ein Signalnetzwerk mit großem

Potential für die Diversifikation biologischer Signale. Die Erzeugung dieser Vielfalt geschieht auf 3 Ebenen: 1) durch die unterschiedlichen Liganden, 2) durch die Stabilisierung unterschiedlicher Rezeptordimere und 3) durch die Bindung unterschiedlicher Signalmoleküle und somit Nutzung verschiedener Signalwege (Alroy et Yarden 1997, Levkowitz et al. 1996, Zrihan-Licht et al. 1997, Graus-Porta et al. 1997).

Neben den beschriebenen membrangebundenen RTKs existieren auch lösliche Rezeptor-Analoga, denen ebenfalls eine physiologische Bedeutung für interzelluläre Kommunikation, Gewebemorphogenese, Regeneration sowie Embryogenese zugeschrieben wird (Baron et al. 1997, Petch et al. 1990a, Das et al. 1994, Tong et al. 1996). Diese löslichen Formen (s-erbBs) entstehen durch proteolytische Spaltung oder alternatives mRNA-Splicing (Pupa et al. 1993, Zabrecky et al. 1991) und sind bisher für erbB1, erbB2 und erbB3 beschrieben (Ullrich et al. 1984, Merlino et al. 1985, Baron et al. 1997, Scott et al. 1993, Katoh et al. 1993, Petch et al. 1990, Das et al. 1994, Tong et al. 1996, Reiter & Maihile 1996, Ilekis et al. 1997, 1995). Ihre Funktion könnte in einer Modulierung der Zellantworten liegen, indem der lösliche Rezeptor den entsprechenden Liganden bindet, der somit für die Signaltransduktion über den transmembranösen Rezeptor nicht mehr zur Verfügung steht, oder indem er nichtfunktionale Heterodimere bildet (Katoh et al. 1993).

Im folgenden soll kurz auf die einzelnen erbB-Rezeptoren und ihre allgemeine Struktur eingegangen werden.

### **1.3.2. *erbB1***

ErbB1, der Prototyp der erbB-Rezeptoren (EGF-R), wurde erstmals aus einer humanen Epidermoidkarzinomzelllinie (A-431) und später auch aus normalem Gewebe isoliert (Cohen et al. 1982). Es handelt sich um ein multifunktionelles allosterisches Protein, das mittels definierter Moleküldomänen verschiedene Rezeptorfunktionen wie Ligandenaffinität, Rezeptoranhäufung und -endozytose sowie den Zustand der Rezeptorphosphorylierung reguliert (Schlessinger et al. 1988). Stellvertretend für die anderen erbB-Rezeptoren soll hier die molekulare Struktur des erbB1 dargestellt werden (Abb.2).

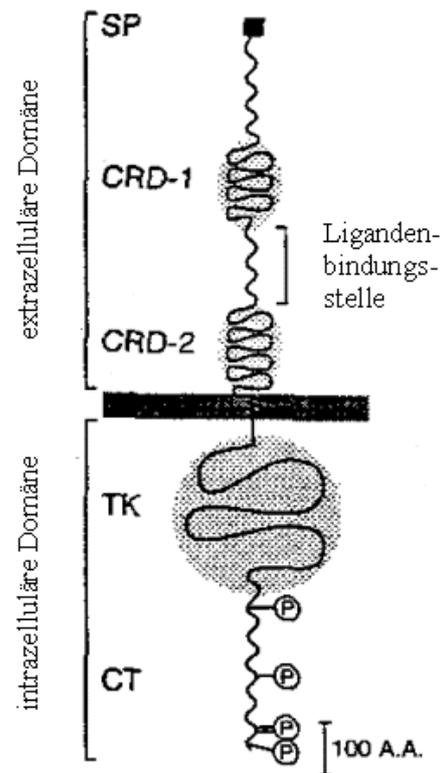
Das 170 kDa Glykoprotein besitzt einen extrazellulären Liganden-bindenden Anteil mit hohem Cysteingehalt und einen intrazellulären, überwiegend aus basischen Aminosäuren bestehenden Molekülbereich mit Tyrosinkinase-Aktivität (Schlessinger et al. 1988, Prigent et al. 1992, Carpenter & Wahl 1990, Carpenter & Cohen 1990). Beide sind durch eine

hydrophobe **transmembranöse Domäne** in Form einer einfachen  $\alpha$ -Helix miteinander verbunden (Staros et al. 1989).

Die **extrazelluläre Domäne** kann in 4 Untereinheiten unterteilt werden (Lax et al. 1988). Einheit I und III bilden die beiden Bindungsstellen für den Liganden (Summerfield et al. 1996), während Einheit II und IV durch ihren hohen Gehalt an Cysteinresten die Sekundär- und Tertiärstruktur stabilisieren (Wu et al. 1990). Die 10-11 N-gebundenen Oligosaccharidketten, die einen wesentlichen Teil des Molekulargewichts ausmachen, sind hauptsächlich für die Affinität des Rezeptors zu seinen Liganden, die Tyrosinkinaseaktivität und die Rezeptorhalbwertszeit verantwortlich (Defize & de Laat 1986; Carpenter & Cohen 1990).

In der **intrazellulären Domäne** befindet sich eine hoch konservierte Tyrosinkinase, deren Aktivität durch die Bindung von Liganden reguliert wird (Carpenter et Wahl 1990). Die zytoplasmatische Region kann an mehreren Stellen phosphoryliert werden (Heisermann & Gill 1988, Hunter et al. 1984). Außerdem enthält sie eine ATP-Bindungsstelle, die in allen Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen konserviert ist und deren Mutation die Kinaseaktivität beeinträchtigt (Honegger et al. 1987, Moolenaar et al. 1988, Walker & Burgess in Nicola 1994).

Die Heterooligomerisierung der einzelnen Rezeptoren erfolgt vor allem durch Interaktionen zwischen den zytoplasmatischen Bereichen und weniger durch Verbindungen zwischen den extrazellulären Domänen (Kwatra et al. 1992, Chantry 1995, Sorokin et al. 1994, Smith et al. 1996, Schaefer et al. 1999). Nach der Ligandenbindung werden die Rezeptor-Liganden-Komplexe durch Clathrin-besetzte Einstülpungen internalisiert, in azidifizierten Endosomen entsprechend der gebundenen Liganden sortiert und anschließend entweder wiederverwertet oder in Lysosomen degradiert (Beguinet et al. 1984, Stoscheck & Carpenter 1984, Sorkin et al. 1993). Die Endozytose erscheint notwendig, da das einfache Entfernen des Liganden den Rezeptor nicht abschaltet und eine konstitutive Aktivierung die Folge wäre (Tanner et al. 1997).



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines erbB-Rezeptors**

SP = Signalpeptid, CRD = Cysteinreiche Domäne, TK = Tyrosinkinase, CT = C-Terminus (aus Nicola 1994)

### **1.3.3. *erbB2***

Dieser Rezeptor wurde ursprünglich als Mutante des neu-Onkogens aus Tumoren von Mäusen kloniert (Schechter et al. 1984). ErbB2 wurde auch aus anderen Spezies wie der Ratte, dem Menschen, dem Hamster und dem Hund kloniert (Nakamura et al. 1994, Bargmann et al. 1986, Coussens et al. 1985, Yamamoto et al. 1986). Während die Homologie des Liganden-bindenden Bereiches zu erbB1 geringer ist, ist auch bei erbB2 die Kinase-Domäne stark konserviert (Bargmann et al. 1986, Yamamoto et al. 1986, Nakamura et al. 1994).

Bis jetzt ist noch kein Ligand für erbB2 gefunden worden (Carraway & Cantley 1994). ErbB2 wird dagegen von den anderen Liganden-aktivierten erbB-Rezeptoren als Dimerpartner bevorzugt und besitzt daher eine wichtige Koordinationsrolle im erbB-System (Tzahar et al. 1994, 1996, Jones et al. 1999). Heterodimere mit erbB2 sind potenter als andere Dimere, da die Signaltransduktion durch einige, wenn nicht sogar alle, Liganden verlängert und verstärkt wird, indem ihre Dissoziation vom Rezeptordimer verlangsamt wird (Klapper et al. 1997, Karunagaran et al. 1996, Graus-Porta et al. 1995).

### **1.3.4. *erbB3***

ErbB3 wurde erstmalig von Kraus et al. (1989) bzw. Plowman et al. (1990) kloniert und unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der erbB-Familie durch eine stark verminderte Tyrosinkinaseaktivität. Ursache hierfür sind Veränderungen in 3 Aminosäureresten (Cys-721, His-740, Asn-815) in der Proteintyrosinkinase-Domäne (Kraus et al. 1989, Plowman et al. 1990, Hanks & Quinn 1991). Deshalb ist erbB3 für seine Aktivierung auf die Transphosphorylierung durch andere erbB-Rezeptoren mit intakter Tyrosinkinase-Aktivität angewiesen (Soltoff et al. 1994, Beerli et Hynes 1996). Bevorzugterweise bildet erbB3 Heterodimere mit erbB2 (Wallasch et al. 1995, Tzahar et al. 1996, Jones et al. 1999). Ansonsten ähnelt der Rezeptor in seiner Struktur den anderen Mitgliedern seiner Familie

### **1.3.5. *erbB4***

ErbB4 ist das jüngste Mitglied der erbB-Familie. Zu den anderen erbB-Rezeptoren bestehen die größten Homologien im Bereich der Tyrosinkinase-Domäne und die geringsten Übereinstimmungen im extrazellulären Bereich (Plowman et al. 1993). Er wird hauptsächlich durch Hereguline, aber auch durch den Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (HB-EGF) und Betacellulin (BC) aktiviert (siehe Kap. 1.4. ; Riese et al. 1996, Elenius et al. 1997, Beerli et Hynes 1996). Es existieren zwei natürlich vorkommende erbB4-Isoformen, erbB4cyt-1 und erbB4cyt-2, wobei erbB4cyt-2 eine

Phosphoinosit-3-Kinase-Bindungsstelle fehlt und es daher zwar die Proliferation von Zellen, aber nicht Chemotaxis vermitteln kann (Kainulainen et al. 2000)

Die erbB-Rezeptoren weisen untereinander eine gewisse Homologie auf, wobei der zytoplasmatische Tyrosinkinase-enthaltende Bereich am konserviertesten ist (Plowman et al. 1993, Stein & Staros 2000). Hier finden sich Homologien von 60–83% mit den größten Übereinstimmungen zwischen erbB1 und erbB2 und den geringsten mit erbB3, der sich gerade in diesem Bereich durch eine Mutation der Kinasedomäne (Cys-721, His-740, Asn-815) von den anderen Rezeptoren unterscheidet (Kraus et al. 1989, Plowman et al. 1990). Möglicherweise hat diese Domäne noch andere Funktionen außer der Kinaseaktivität, wie die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen, die an der Rezeptor-dimerisierung beteiligt sind, oder die Aktivierung der Kinasedomäne des Heteromerpartners.

Die größten Unterschiede auf Aminosäureebene finden sich im C-terminalen Ende, das auch eine unterschiedliche Länge aufweist (Plowman et al. 1990, 93). Aber auch im Ligandenbindenden Bereich der extrazellulären Domäne sind die Homologien weniger hoch. Die Übereinstimmungen zwischen den extrazellulären Subdomänen betragen nur zwischen 40 und 45 % im Gegensatz zu 60-80% im Kinase-Bereich (Abb. 3; Plowman et al. 1990, 93, Walker & Burgess in Nicola 1994, Prigent et al. 1992), wobei sich jeweils erbB1 und erbB2 sowie erbB3 und erbB4 am ähnlichsten sind. Der Vergleich der erbB-Rezeptoren innerhalb der Vertebraten deutet darauf hin, daß durch ein Genduplikationsereignis zwei Urrezeptoren, der erbB1/erbB2- und der erbB3/erbB4-Vorläufer, entstanden sind. Durch nachfolgende Genduplikationen dieser Vorläufer wurden dann die vier bekannten erbB-Rezeptoren der Säuger gebildet (Stein & Staros 2000). Die größere Homologie zwischen erbB1 und erbB2 im Gegensatz zu erbB3 und erbB4 könnte ein Hinweis darauf

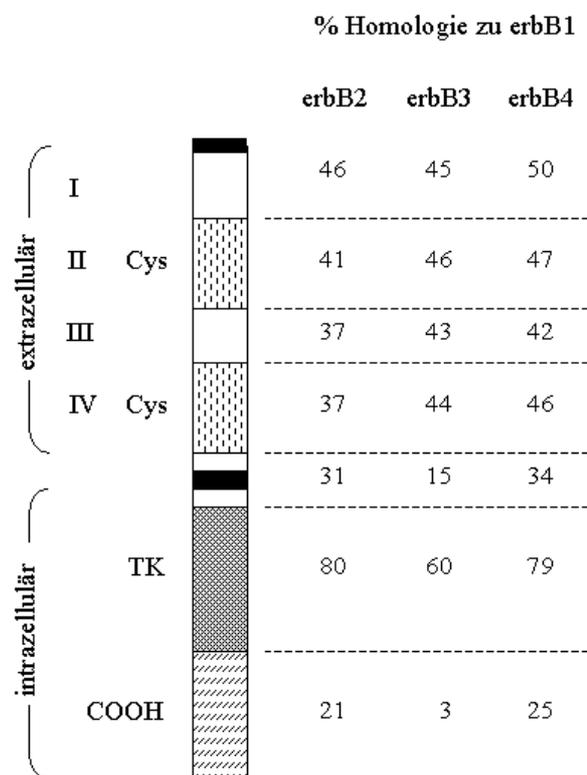


Abb 3: Homologien zwischen den einzelnen Domänen der humanen erbB-Rezeptoren (nach Walker & Burgess 1994)

sein, daß erbB1 und erbB2 eine ähnlichere Funktion haben, während erbB3 und erbB4 andere biologische Antworten auslösen.

## 1.4. Die Familie der erbB-Liganden

### 1.4.1. Allgemeine Struktur und Funktionsweise

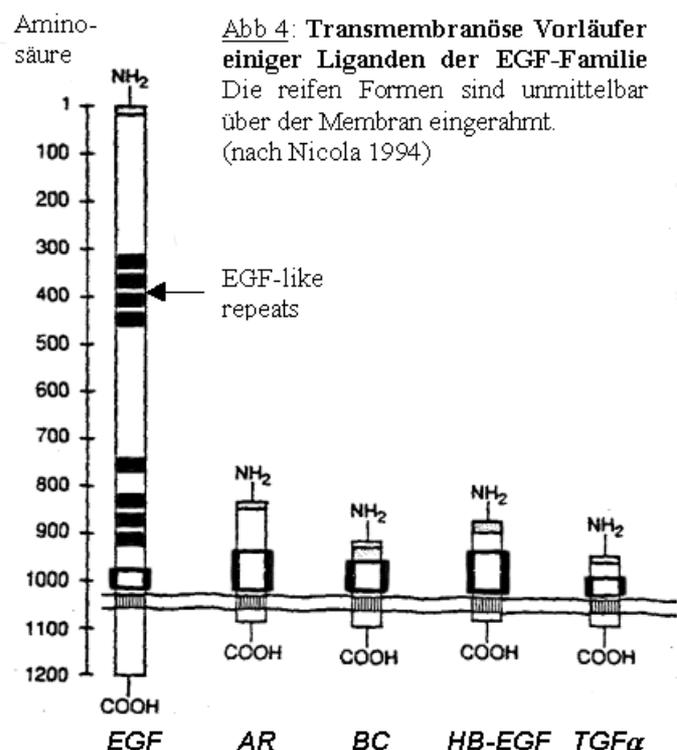
Eine große Familie EGF-verwandter Peptide dient als Liganden für die erbB-Rezeptoren. Die Liganden sind bivalent und besitzen eine Bindungsstelle hoher Affinität, die einen primären Rezeptor erkennt, sowie eine Bindungsstelle mit niedriger Affinität und breiterem

Tab.1: Differentielle Aktivierung von erbB-Rezeptoren durch EGF-verwandte Liganden unter Berücksichtigung der sekundären Aktivierung nach Heterodimerisierung (nach Beerli & Hynes 1996, Komurasaki et al. 1997, Shelly et al. 1998)

Faktor	erbB1	erbB2	erbB3	erbB4
<b>EGF</b>	+++	++	+	-
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	+++	++	+	-
<b>HB-EGF</b>	+++	++	++	+
<b>AR</b>	+	-	+	-
<b>BTC</b>	+++	++	+++	+++
<b>EPR</b>	++	+	+	++
<b>NRG</b>	-	+++	++++	+++

Spektrum für einen sekundären Rezeptor (Tzahar et al. 1997; Tab. 1). Entsprechend ihrer Präferenz für bestimmte Rezeptoren können die Liganden in vier Gruppen eingeteilt werden (Olayioye et al. 2000): I) epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), transformierender Wachstumsfaktor alpha (TGF $\alpha$ ) und Amphiregulin (AR) binden erbB1; II) Heparin bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (HB-EGF), Betacellulin (BTC) und Epiregulin (EPR) binden erbB1 und erbB4; III) Neuregulin 1 und 2 (NRG-1 und NRG-2) binden erbB3 und erbB4; IV) Neuregulin 3 und 4 (NRG-3 und NRG-4) binden erbB4. In der vorliegenden Arbeit wurden die Liganden EGF, TGF $\alpha$  und HB-EGF untersucht (in Tab 1 grau unterlegt).

Die Wachstumsfaktoren werden als membranständige Vorläufermoleküle gebildet. Diese akkumulieren an der Zelloberfläche oder es entstehen aus ihnen durch proteolytische Spaltung die löslichen



Formen (Carpenter & Wahl 1990, Carpenter & Cohen 1990). Die membrangebundenen Vorläuferformen können mit Rezeptoren von Nachbarzellen (juxtakrin) interagieren und auf diese Weise Zell-Zell-Adhäsionen oder Rezeptorautophosphorylierung initiieren (Brachmann et al. 1989, Wong et al. 1989, Anklesaria et al. 1990, Massagué 1990). Somit sind sowohl der membranständige Precursor als auch die lösliche Form dieser Wachstumsfaktoren an der Signaltransduktion auf juxta- oder parakrine Weise beteiligt (Massagué & Pandiella 1993).

ErbB-Liganden verfügen über eine oder mehrere EGF-ähnliche Strukturen (Carpenter & Wahl 1990, Davis 1990, Massagué & Pandiella 1993). Diese EGF-artigen Domänen besitzen 6 Cysteinreste, die über eine Sequenz von 35 - 40 Aminosäuren in charakteristischer Weise verteilt sind:  $CX_7CX_{3-5}CX_{10-12}CXCX_5GXRC$  (C=Cystein; G=Glycin; R=Arginin; X=andere Aminosäuren). Die Cysteinreste sind durch 3 Disulfidbrücken (C1-C3, C2-C4, C5-C6) miteinander verbunden und bilden dadurch eine kompakte, 3-schleifigen Struktur, die für die Erhaltung einer hohen Bindungsaffinität unbedingt notwendig ist (Carpenter & Wahl 1990). Diese Struktur wird in allen erbB1-Liganden immer von 2 getrennten Exonen kodiert (Bell et al. 1986, Plowman et al. 1990). Neben den Cysteinresten gibt es noch 3 weitere konservierte Aminosäuren (Glycin<sup>19</sup>, Glycin<sup>40</sup>, Arginin<sup>42</sup>), die für die Aktivität der Wachstumsfaktoren essentiell sind (Lazar et al. 1989).

#### 1.4.2. EGF

EGF wurde bereits vor mehr als 30 Jahren in der Glandula submandibularis männlicher Mäuse entdeckt und als Faktor für das Öffnen der Augenlider der neugeborenen Tiere identifiziert (Cohen 1962).

Das Vorläufermolekül, pro-EGF, wird als großes Membranglykoprotein von mehr als 1200 Aminosäuren synthetisiert, das in seinem extrazellulären Bereich 9 EGF-Domänen

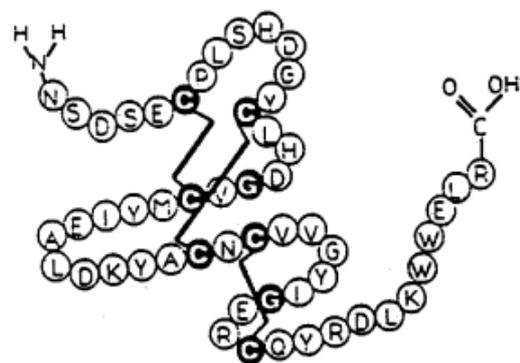


Abb. 5:

EGF-Molekül (aus Prigent et al. 1992)

enthält. Die dem transmembranösen Molekülbereich am nächsten liegende EGF-Domäne entspricht dem sezernierten EGF (Gray et al. 1983, Scott et al. 1983, Bell et al. 1986). Die Funktion der anderen EGF-Domänen ist unbekannt. Das Molekulargewicht von 140 – 170 kDa ist in großem Maße vom Glykosylierungsgrad abhängig (Breyer & Cohen 1990). Humanes pro-EGF wird von 24 Exonen kodiert, wobei die einzelnen EGF-ähnlichen

Bereiche von jeweils einem Exon kodiert werden. Das sezernierte EGF, welches aus 53 Aminosäuren besteht, wird jedoch von 2 Exonen kodiert (Bell et al. 1986).

### **1.4.3. TGF $\alpha$**

TGF $\alpha$  wurde zuerst aus den Kulturüberständen transformierter Zellen als 50 Aminosäuren großes Peptid isoliert (DeLarco & Todaro 1978). Auch dieser Wachstumsfaktor wird zunächst als ein 160 Aminosäuren zählendes Vorläufermolekül synthetisiert, der sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen von 6 Exonen kodiert wird (Derynck et al. 1984, Lee et al. 1985). Durch proteolytische Spaltung können verschiedene lösliche TGF $\alpha$ -Spezies von 6 – 34 kDa gebildet werden (Ozanne et al. 1980, Bringman et al. 1987), wobei das 6 kDa-Produkt als die vollständig prozessierte Form identifiziert wurde (Marquardt et al. 1983). Verantwortlich für diese Heterogenität im Molekulargewicht ist die unterschiedliche N- und O-Glykosylierung im N-terminalen Bereich von TGF $\alpha$  (Luetteke et al. 1988, Teixidó et al. 1990).

Viele Zellen exprimieren vornehmlich membranständiges TGF $\alpha$ , das durch unterschiedliche proteolytische Spaltung in mindestens 2 Formen existiert (Brachmann et al. 1989, Massagué 1990). Membranständiges TGF $\alpha$  ist um ein Vielfaches weniger aktiv als das 50-Aminosäuren lange sezernierte TGF $\alpha$  (Brachmann et al. 1989). Die proteolytische Spaltung von proTGF $\alpha$  stellt nicht die aktive Form des Faktors her, sondern ist vielmehr der Wechsel zwischen zwei aktiven Formen, einer membrangebundenen und einer löslichen (Pandiella & Massague 1991). Wahrscheinlich ist die Umwandlung von transmembranösem in lösliches TGF $\alpha$  ein regulatorischer Schritt, der an der Änderung physiologischer Funktionen des Wachstumsfaktors vom juxtakrinen zum parakrinen Simulationsmodus beteiligt ist (Hansard et al. 1997).

Wie EGF besteht das vollständig prozessierte TGF $\alpha$  aus zwei unabhängig voneinander gefalteten Domänen, deren eine das N-terminale Peptid mit den ersten beiden Schleifen beinhaltet, während die andere Domäne von der dritten Schleife und dem kurzen C-terminalen Ende des Peptids gebildet wird (Kohda et al. 1989, Montelione et al. 1989, Kline et al. 1990). Diese beiden Domänen formen ähnlich wie beim EGF eine fäustlingsähnliche Struktur (Lee et al. 1995).

#### **1.4.4. HB-EGF**

HB-EGF wurde erstmals 1991 im konditionierten Medium humaner Makrophagen-ähnlicher U-937 Zellen als 22 kDa Peptid mit einer hohen Affinität für Heparin identifiziert (Higashiyama et al. 1991). Pro-HB-EGF setzt sich aus etwa 204 Aminosäuren zusammen, die durch 6 Exone kodiert werden (Fen et al. 1993, Harding et al. 1996). Die Heterogenität der O-Glykosylierung führt neben der proteolytischen Prozessierung des membranständigen Vorläufermoleküls zur Bildung verschiedener löslicher HB-EGF-Formen (Higashiyama et al. 1991, 1992), die ebenso wie die längste identifizierte Form von 86 Aminosäuren biologisch aktiv sind (Higashiyama et al. 1992). Für die Heterogenität der Molekülgröße scheint neben der proteolytischen Spaltung auch alternatives Splicing der HB-EGF-RNA eine Rolle zu spielen (Loukianov et al. 1997).

HB-EGF enthält N-terminal einen an basischen Aminosäuren reichen Molekülbereich, der für die Heparinbindung verantwortlich ist, und einen wichtigen Regulationsfaktor darstellt, da die Interaktion von HB-EGF mit erbB1 von membranständigen Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) moduliert wird (Besner et al. 1992, Higashiyama et al. 1993, Aviezer & Yayon 1994, Cook et al. 1995). Diese Heparin-bindende Region innerhalb des reifen HB-EGF ist z.B. zwischen Primaten, Nagern und Schwein hoch konserviert (Abraham et al. 1993, Kim et al. 1995, Besner et al. 1992), was im Einklang mit der wahrscheinlichen Rolle in der Heparin-vermittelten Regulation der Rezeptorbindung und Bioaktivität von HB-EGF steht (Besner et al. 1992). Aber auch die trans- und juxtamembranen Domänen sind Bereiche hoher Sequenzkonservierung (Abraham 1993a). Die allgemeine strukturelle Organisation des HB-EGF-Gens von Maus und Mensch ist ebenfalls ziemlich ähnlich einschließlich der Konservierung der relativen Größe jedes Introns und Exons zwischen den beiden Spezies (Harding et al. 1996).

Eine Besonderheit von HB-EGF ist, daß er in seiner membranständigen Pro-Form als Rezeptor für das Diphtherie-Toxin fungiert (Naglich et al. 1992). Es ist weiterhin ein wirksameres Mitogen für glatte Muskelzellen als EGF oder TGF $\alpha$  (Higashiyama et al. 1992).

Die Sequenzen der hier untersuchten erbB-Liganden sind innerhalb der Säuger relativ konserviert. Eine eher geringe Homologie von 30-45% besteht dagegen zwischen den einzelnen Liganden untereinander (Marquardt et al. 1983, 1984, Higashiyama et al. 1992), obwohl alle an erbB1 binden können (siehe Abschnitt 1.4.1.). Andererseits könnte hierin die Ursache für unterschiedliche Funktionen bzw. Signalstärke oder unterschiedliche Bindungsaffinitäten liegen (Komuraski et al. 1997, Shelly et al. 1998).

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1. Chemikalien und Enzyme

Für die Versuche wurden Chemikalien, Enzyme, Vektoren und Kits folgender Firmen verwendet.

10x PCR-Puffer	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
DEPC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNase I (10U/µl, RNase-frei)	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
dNTP-Mix	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
E.coli JM109	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
E.coli XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Serva, Heidelberg, Deutschland
FSH	Schering AG, Berlin, Deutschland
hCG	Schering AG, Berlin, Deutschland
Hefe Extrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Oligo(dT)-Primer	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Primer	Biosource, Fleurus, Belgien
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
RT-Puffer	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
RT-Superscript™ II	Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol™	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
pGEM™-T-Vektor-System	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
QIAprep™ -Plasmid- Miniprep-Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Sequenzierungskit	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Wizard™ PCR Preps DNA Purification System	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland

## 2.2. Versuchstiere, Gewebe- bzw. Embryonengewinnung

Als Versuchstiere standen geschlechtsreife, nullipare, weibliche Hybridkaninchen (Zika-Hybriden, Basiszucht: E. Zimmermann, Untergröningen, Züchter: Krieg, Niederwünsch) mit einem Körpergewicht von durchschnittlich 3 kg zur Verfügung. Die Tiere wurden in einem vollklimatisierten Raum mit künstlichem Hell-Dunkel-Rhythmus (12:12 Stunden) in Einzelkunststoffkäfigen gehalten und mit einem handelsüblichen Kaninchen-Alleinfutter sowie Wasser ad libitum versorgt. Zwischen dem Eintreffen der Kaninchen im Institut und ihrer Versuchszuführung vergingen etwa 3 Wochen, um eine Adaptationsphase und den Ausschluß einer möglichen Pseudogravidität zu gewährleisten (Fischer 1988).

Um die Blastozystenausbeute (Tag 6 p.c.) pro Versuchstier zu erhöhen erfolgte eine präovulatorische Follikelstimulationsbehandlung. Hierzu wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen morgens und abends 0,3 mg FSH subcutan verabreicht. Am Morgen nach der letzten Injektion wurden die Tiere von fertilen Böcken je 2x gedeckt. Unmittelbar nach der Paarung wurde ihnen zur Sicherung der Ovulationsauslösung 75 I.E. menschliches Choriongonadotropin (hCG) in die Vena auricularis lateralis injiziert (Fischer et al. 1988). Die gleiche Menge hCG wurde auch nicht gedeckten Kaninchen zur Erzeugung einer Pseudogravidität verabreicht (Fischer 1988).

Die Tötung der Tiere erfolgte durch intravenöse Gabe von 300 mg Pentobarbital oder durch Genickschlag und anschließendem Ausbluten. Unmittelbar danach wurden die Bauchhöhle unter sterilen Bedingungen durch einen medianen Längsschnitt eröffnet und die Genitalorgane entnommen. Blastozysten am Tag 6 post coitum (d 6 p.c.) wurden durch Ausspülen mittels Knopfkanüle gewonnen, in 1,5 ml - Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 1 ml TRIzol™ (10 Blastozysten pro Tube) aufgenommen und sofort in Flüssigstickstoff auf –80°C gekühlt. Zur Gewinnung des Uterusmaterials wurden die Implantationskammern (ab d 7 p.c.) von den interplazentaren Abschnitten getrennt. Die Gewebe wurden ebenfalls in Flüssigstickstoff überführt und bis zur Aufarbeitung bei –80°C gelagert. Eine Präparation von ausschließlich plazentarem Material erfolgte nicht, so daß sich in dieser Arbeit die Bezeichnung "plazentarer Uterusteil" auf Gewebe bezieht, das neben der eigentlichen Plazenta auch unmittelbar umgebendes Gewebe der Implantationskammer und des implantierten Embryos enthält.

### 2.3. RNA-Präparation

Das Gewebe wurde in TRIzol™ (1 ml pro 100 mg Gewebe) aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurden pro ml TRIzol™ 200 µl Chlorform zugegeben. Nach kräftigem Schütteln und einer 5 min Inkubation auf Eis wurden die Phasen durch Zentrifugation (10 000 rpm, 15 min, 4°C) getrennt. Die wäßrige, RNA-haltige Oberphase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA mit gleichen Volumeneinheiten Isopropanol bei –20°C, die dann erneut bei 10 000 rpm abzentrifugiert wurde. Nach dem Waschen in 70 % Ethanol wurde das Pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% Diethyl-Pyrocbonat in Reinstwasser) resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C aufbewahrt.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt, wobei eine OD<sub>260</sub> von eins 40µg RNA entsprach.

### 2.4. DNase-Verdau und cDNA-Synthese (Erststrang für RT-PCR)

Isolierte Gesamt-RNA wurde für 1 h bei 37°C mit DNase I behandelt (1U/1µg RNA), um mögliche genomische DNA-Kontaminationen zu entfernen. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit Ethanol-Fällung und Resuspendierung in DEPC-H<sub>2</sub>O. Die Konzentration wurde erneut photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden auf ein Gesamtvolumen von 20 µl folgende Mengen eingesetzt:

3 µg RNA	
1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5µg)	2 µl DTT (0,1 mM)
4 µl RT-Puffer	1 µl RT Superscript II
1 µl dNTP-Mix (10 mM)	8 µl DEPC- H <sub>2</sub> O

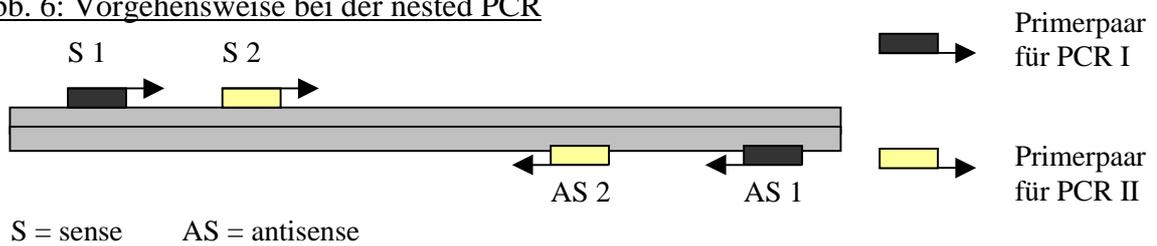
Die Reaktion erfolgte für 1h bei 42°C mit abschließender Inkubation bei 72°C für 10 min.

### 2.5. Nested und spezifische RT-PCR

Da die Sequenzen für die erbB-Rezeptoren und –Liganden (außer einer Teilsequenz für TGFα) für das Kaninchen nicht bekannt waren, wurde zu deren Ermittlung die Methode der **nested RT-PCR** eingesetzt. Hierzu wurde zunächst eine erste PCR mit degenerierten äußeren Primern durchgeführt, deren Basenfolge von bereits bekannten Sequenzen anderer Säugerspezies abgeleitet wurde. Hierbei war davon auszugehen, daß die Primersequenz nicht vollständig komplementär zur gesuchten Kaninchensequenz ist und somit auch Nebenprodukte entstehen. Durch den Anschluß einer zweiten PCR mit den Produkten der ersten PCR als Matrizen-DNA und mit einem zweiten, inneren (nested) Primerpaar kann

die Produktspezifität erheblich gesteigert werden, da unspezifische Nebenprodukte der ersten PCR in der Regel nicht mehr amplifiziert werden (siehe Abb. 6)

Abb. 6: Vorgehensweise bei der nested PCR



Für die **spezifische RT-PCR** wurden dann die mit Hilfe der Produkte der nested PCR ermittelten Kaninchen-spezifischen Primer eingesetzt und so die Untersuchungen zu den Expressionsmustern der erbB-Rezeptoren und –Liganden in verschiedenen Uteri und uteroplazentaren Geweben des Kaninchens durchgeführt.

Pro Reaktion wurden sowohl für die nested als auch die spezifische RT-PCR für ein Gesamtvolumen von 50,0 µl eingesetzt:

38,7 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O	1 µl	Primer F (10 pmol/µl)
5 µl	10x PCR-Puffer	1 µl	Primer R (10 pmol/µl)
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 µl	cDNA bzw PCR-Produkt
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)	0,3 µl	Taq Polymerase

Zur Vermeidung von Evaporationen wurde der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet und in einem TRIO Thermoblock Cycler (Biometra) nach folgendem Programm bei den in Tabelle 2 angegebenen Annealing-Temperaturen amplifiziert: 94°C 3 min (94°C 1min / annealing 1min / 72°C 2min) x 40 / 72°C 10min. Für die spezifischen Primer lagen die Annealing-Temperaturen bei 68°C mit Ausnahme von erbB2, wo sie bei 64°C lag.

Um Pipettierfehler so klein wie möglich zu halten und damit eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Reaktion zu gewährleisten, wurde jeweils ein PCR-Master-Mix angesetzt und entsprechend aliquotiert. Weiterhin wurde immer eine Negativkontrolle ohne Erststrang zum Ausschluß einer Kontamination der Lösungen sowie eine Positivkontrolle zur Überprüfung des Funktionierens der PCR mitgeführt. Desweiteren wurde RNA ohne reverse Transkription als Negativkontrolle für genomische Kontamination in die PCR eingesetzt. Die Amplikons wurden auf einem 1,8 % Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

## 2.6. Primer-Synthese

Für die nested RT-PCR wurden zunächst jeweils degenerierte äußere und innere Primer synthetisiert. Diese wurden durch Vergleiche (alignments) bekannter Sequenzen verschiedener Spezies (Mensch, Maus), die untereinander eine gewisse Homologie aufwiesen, ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Primer Intron-überspannend waren. Die Erstellung der Kaninchen-spezifischen Primer für die Untersuchung der unterschiedlichen Graviditätsstadien erfolgte dann anhand der mittels nested RT-PCR gefundenen Sequenzen.

Tab. 2: Primer für die initiale PCR einschließlich der Annealing-Temperaturen

<b>erbB1</b>	sense	(s)	5'-CCACTCATGCTSTACAACCCAC -3'	68°C
	antisense	(as)	5'-CAAAAASCCTGKATTTTCCTTTTACGG -3'	
<b>erbB2</b>	<i>äußere Primer</i>	s	5'-CCTYCTGGGCATCTGCCTGAC -3'	60°C
		as	5'-CCAGCARNTCAGGGATCTCCCG -3'	
	<i>innere Primer</i>	s	5'-AGCTGGTGACACARCTTATGCCC -3'	63°C
		as	5'-CGTAAGGTTTGGCCCCAARGTCA -3'	
<b>erbB3</b>	s	5'-GTCCTCGTGGCCATGAATGAATT -3'	60°C	
	as	5'-ACACAGGCYCCACTGTCATTGAA -3'		
<b>erbB4</b>	s	5'-TGGTGGAGTCTATGTAGACCAGA -3'	60°C	
	as	5'-CCCATTTTCTTCTACTTCCATCTTG -3'		
<b>EGF</b>	<i>äußere Primer</i>	s	5'-TGTCTYGYRTTGATGAGTGCCA -3'	55°C
		as	5'-GCCGTAGYCAGCRTGRCGCA -3'	
	<i>innere Primer</i>	s	5'-GCCRCCTGCACCAAYACRGAGGG -3'	64°C
		as	5'-CCAYCATKGAGGCAGTAYCCATC -3'	
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	<i>äußere Primer</i>	s	5'-CCGCSCGCYCGKAARATGGTC -3'	53°C
		as	5'-GCAGTGKATCAGCACACAKGTGA -3'	
	<i>innere Primer</i>	s	5'-AARATGGTCCCCKCGGCYGG -3'	63°C
		as	5'-GCCAGGAGGTCCGCATGCTCAC -3'	
<b>HB-EGF</b>	<i>äußere Primer</i>	s	5'-CTGGAGCGGCTTCGGAGAGG -3'	55°C
		as	5'-AYGCCCAACTTCTCTCYTCA -3'	
	<i>innere Primer</i>	s	5'-AGCAACCCKGACCCTCCCACT -3'	64°C
		as	5'-TACCTGAACATGAGAAGYCCCAC -3'	

R = (A/G)

S = (G/C)

Y = (C/T)

K = (G/T)

N = (A/G/C/T)

Tab. 3: Spezifische Primer

<b>erbB1</b>	sense	5'-ATGTCAACCCCGAGGGCAAATACA -3'
	antisense	5'-GGACCCCGAGGAAGCTGGACATC -3'
<b>erbB2</b>	sense	5'-AGGAATTTTCCACAAGAACAACCAG -3'
	antisense	5'-CGCCAGCTGTGTGACCACCTG -3'
<b>erbB3</b>	sense	5'-CTACCCTTGCCCAACCTCCGAG -3'
	antisense	5'-CACCGACTGCTTCGCCTGCCG -3'
<b>erbB4</b>	sense	5'-GCAGACACAATTCATTGGCAAGACA -3'
	antisense	5'-GATTCCAGTTCTTGTGTACGTGCC -3'
<b>EGF</b>	sense	5'-GAGGGAGGCTACACTTGCATGTG -3'
	antisense	5'-GGGATGCCCCCGTCACACGA -3'
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	sense	5'-CAGCTCGCCCTGTTCGCGCTC -3'
	antisense	5'-CAGCATGTGTCTGCCACTCTGG -3'
<b>HB-EGF</b>	sense	5'-TACGGACCAGGACCAGCTGCTAA -3'
	antisense	5'-TCATCCGTCTGTCTGCTTGTCATC -3'

## 2.7. Klonierung

Zunächst wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des PCR-Preps-Kits von Promega (Mannheim, Dtl.) gereinigt und anschließend über Nacht bei 4°C mittels T<sub>4</sub>-Ligase in den pGEM-T-Vektor ligiert (1 µl 10xPuffer; 1 µl T-Vektor; 16 µl Insert = PCR-Produkt; 2 µl T<sub>4</sub>-Ligase). Danach erfolgte die Transformation des Vektors in kompetente E.coli (XL-blue MRF), indem der Ligationsansatz zuerst mit 100 µl kompetenter Zellen für 30 min auf Eis inkubiert wurde und dann für 2 min in ein 42°C Wasserbad gestellt wurde (Sambrook et al. 1989). Die Vermehrung der Zellen erfolgte bei 37°C für 20 min in 300 µl LB-Medium. Anschließend wurden die Zellen auf mit X-Gal und Ampicillin behandelten LB-Agar-Platten ausgestrichen und für mindestens 8 h bei 37°C inkubiert. Nach der Selektion positiver Klone und deren erneuter Vermehrung auf LB-Agar-Platten wurden Kolonien ausgewählt, deren rekombinante Plasmid-DNA mit Hilfe des Miniprep-Kits von Qiagen extrahiert wurde. Diese wurde nach einem Restriktionsdoppelverdau mit NcoI und NotI bzw. SacI auf einem 1,5%igen Agarosegel hinsichtlich der Insertgröße analysiert (Restriktionsansatz: 5,5 µl H<sub>2</sub>O; 1 µl NEB<sub>3</sub>-10xPuffer; 2,5 µl Plasmid; 0,5 µl NcoI; 0,5 µl NotI bzw SacI).

## 2.8. Sequenzierung und Homologievergleich

Die klonierte DNA wurde mit dem Sequenzierungskit von Applied Biosystems laut Herstellerprotokoll vorbereitet und die Sequenz mit dem automatischen Sequenziergerät ABI 373 (Applied Biosystems) ermittelt. Anschließend wurden die Sequenzen einem Homologievergleich (Blast-Search; Altschul et al. 1990) mit Einträgen in Nukleotidsequenzdatenbanken (GenBank, EMBL, DDBJ und PDB) unterzogen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit entsprechenden Einträgen in Proteindatenbanken (SwissProt, Genbank CDS translations, PDB, SPupdate, PIR) verglichen (Altschul et al. 1997).

## 2.9. Restriktionsanalyse

Die Überprüfung der Identität der Amplikons des Gewebe-Screenings erfolgte außer durch Sequenzierung auch mittels Restriktionsanalyse, die im Vergleich zur Sequenzierung weniger aufwendig ist und ebenfalls zuverlässige Ergebnisse liefert. Hierzu wurden die PCR-Produkte wie in Tabelle 4 aufgeführt geschnitten. Für EGF, daß nur 142 bp groß war, ergaben sich keine geeigneten Schnittstellen für eine Analyse. Pro Ansatz wurden jeweils 1 µl H<sub>2</sub>O bzw BSA, 2 µl 10xPuffer, 15 µl PCR-Produkt und 2 µl Enzym für 1 Stunde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (37°C bzw. 25°C) inkubiert und die Fragmente anschließend auf einem 2,3% Agarosegel mit EtBr unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Tab. 4: Restriktionsanalyse

Amplikon	Größe (bp)	Restriktions-enzym	Fragmentgröße (bp)
<b>erbB1</b>	350	Hpa II	91 und 284
<b>erbB2</b>	388	Apa I	158 und 230
<b>erbB3</b>	452	Apa I	374 und 78
<b>erbB4</b>	451	Apa I	200 und 251
<b>TGFα</b>	206	Pst I	46 und 160

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Sequenzanalyse und Homologievergleich

##### 3.1.1. *erbB*-Rezeptoren

###### 3.1.1.1 erbB1

Das Amplikon für *erbB1* mit einer Länge von 351 bp wurde aus Uterusgewebe Tag 19 p.c. gewonnen (Abb. 7a). Es zeigt eine Homologie von 84% zum humanen *erbB1* (Xu 1984, Merlino et al. 1985, Ullrich et al. 1984, Ilekis et al. 1995, Reiter & Maihle 1996; Abb. 7a). Der homologe Bereich beinhaltet Glykosylierungsstellen der extrazellulären Domäne (Ullrich et al. 1984, Reiter & Maihle 1996), die von den Exonen 8 und 9 kodiert werden, zwischen denen ein 585 bp großes Intron liegt (Reiter & Maihle 1996).

Eine Homologie in der Nukleinsäuresequenz von 86% finden sich mit Maus-*erbB1* aus der Leber (Luetteke et al. 1994) und dem Gehirn (Avivi et al. 1991) sowie von 85% mit dem *erbB1* der Rattenleber (Petch et al. 1990) und von 79% mit dem *erbB1* aus Embryofibroblasten des Huhns (Lax et al. 1988, Flickinger et al. 1992). Die Ergebnisse der Homologievergleiche sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Die ermittelte Nukleotidsequenz für das *erbB1* des Kaninchens besitzt ein offenes Leseraster, welches eine hohe Aminosäurehomologie mit dem *erbB1*-Protein verschiedener anderer Spezies aufweist (Abb. 7b). Die meisten der nicht übereinstimmenden Aminosäuren sind konservativ substituiert, d.h. durch Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt.

---

**Abb. 7a:** Alignment der Nukleinsäuresequenzen für *erbB1* von Kaninchen und Mensch (X00663) (Nummerierung der Kaninchensequenz entspricht der Länge des klonierten cDNA-Fragments)

```
Kaninchen: 1 atgtcaacccccgagggcaaatacagctttggtgccacctgtgtcaagaaatgtccccgta 60
Mensch : 1077 atgtgaacccccgagggcaaatacagctttggtgccacctgcgtgaagaagtgtccccgta 1136

Kaninchen: 61 actacgtggtgacagatcatggctcctgtgaccgggacctgtggtcctgacagctacgagg 120
Mensch : 1137 attatgtggtgacagatcacggctcgtgcgtccgagacctgtggggccgacagctatgaga 1196

Kaninchen: 121 tggaggaagatggcgtccgcaagtgtagaantgcgaggggacctgtcgcaaagtttcta 180
Mensch : 1197 tggaggaagacggcgtccgcaagtgtagaantgcgaagggacctgcccgaagtgctgta 1256

Kaninchen: 181 atgggataggaattggtgaatttaagacacgcttgcataaatgccacaaacatcaaac 240
Mensch : 1257 acggaataggtattggtgaatttaagactcactctccataaatgtctacgaatattaac 1316

Kaninchen: 241 acttcaagaactgcacgtccaccagtggatctgcacatcctgcccgtggcattcaggg 300
Mensch : 1317 acttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgcccgtggcatttaggg 1376

Kaninchen: 301 gggattccttcacCCGCACCCACCCCTGGACCCCGAGGAAGCTGGACATC 351
Mensch : 1377 gtgactccttcacACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAAGCTGGATATTC 1469
```











### 3.1.1.5 Zusammenfassung

- Mit Hilfe der nested RT-PCR ist es gelungen, Teile der Nukleotidsequenzen der Rezeptor-Tyrosinkinasen erbB1 – 4 im Kaninchen zu bestimmen.
- Alle verwendeten Primer waren Intron-überspannend und lagen in Bereichen hoher Nukleinsäurehomologien zu den entsprechenden Sequenzen anderer Spezies.
- Die für das Kaninchen ermittelten Teilsequenzen weisen hohe Homologien zu anderen Spezies auf und deuten auf eine hohe Konservierung der ermittelten Proteinbereiche hin.
- Die Sequenzen der erbB-Rezeptoren besitzen ein offenes Leseraster und liegen in den ersten 3 Subdomänen des extrazellulären Bereiches (Abb. 11, S. 27):
  - Das Segment für **erbB1** zeigt eine 85-87%ige Homologie mit anderen Säugerspezies, und zwar mit der II. bis III. Subdomäne des extrazellulären Bereichs (Avivi et al. 1991, Flickinger et al. 1992, Xu et al. 1984). Die entsprechende Region wird von 2 Exonen, die durch ein 586 bp langes Intron getrennt sind, kodiert und enthält mindestens 2 Glykosylierungsstellen (Reiter et al. 1996, Xu et al. 1984).
  - Auch das Fragment für **erbB2** zeigt hohe Homologien von 85-92% mit anderen Mammaliern, und zwar innerhalb der I. und II. extrazellulären Subdomäne mit mehreren Glykosylierungsstellen (Yamamoto et al. 1986, Nakamura et al. 1994, Bargmann et al. 1986, Coussens et al. 1985, Yokota et al. 1997). Der klonierte Bereich wird ebenfalls von mindestens 2 Exonen kodiert (Tal et al. 1987).
  - Ähnliche Homologien von 86-92% finden sich für die Fragmente von **erbB3** (Plowman et al. 1990, Kraus et al. 1989, Hellyer et al. 1995, Lim et al. 1998) und **erbB4** (Lim et al. 1998, Plowman et al. 1993). Auch hier liegt der klonierte Bereich innerhalb der beiden ersten Subdomänen der extrazellulären Domäne.

erbB4	1	MKPA----TGLWVWVSLVAAGTVQPSDSQSVCA <b>G</b> TENKLS <b>S</b> SLSDLEQQYRALRKY <b>Y</b> ENCEFV <b>M</b> GNLEITSIEHN <b>R</b> DL <b>S</b> FL <b>R</b> SVRE <b>V</b> TGYVL <b>V</b> AL <b>N</b> Q <b>F</b> RY
erbB3	-19	MRAND--ALQVLG <b>L</b> L <b>F</b> S .ARGSE.--GN. .A. .P. .L.G. .VTG.A.N. .QT.Y.L. .R. . . . . . VLTG. .A. . . . . QWI. . . . . M.E. <b>ST</b>
erbB2	1	M---ELAALCR.G <b>L</b> LLA.LPP.AA----.TQ. .T. .DM. .RLPASP.T <b>H</b> LD <b>M</b> . .HL.QG.Q. .Q. . . . . L.YLPT.A <b>S</b> . . . . . QDIQ. .Q. . . . . I.H. .V.Q
erbB1	-24	MR.SGTAGAA.LALLAA.CP.S--RALEEK <b>K</b> . .Q. .S. . . . . TQ.G <b>T</b> F.D <b>H</b> FL <b>S</b> .Q <b>R</b> MF <b>N</b> . . . . . L. . . . . YVQR.Y. . . . . KTIQ. .A. . . . . I. . . . . TVER
<b>I</b>		
erbB4	97	LPLENLRIIRG <b>T</b> KLYEDRYALAI <b>F</b> LN-----YRKDGN <b>F</b> GLQELGLK <b>N</b> LTEILNGGVYVDQ <b>N</b> K <b>F</b> LCY <b>ADTIHWQDIVRNPWPSNLT<b>V</b>STNGSS<b>G</b>CG</b>
erbB3	78	<b>...P...VV...QV.DGKF.IFVM.-----NTNSSHA.RQ.R.TQ.....S.....IEK.DK.HM...D.R...DR---DAEI.VKDNGR<b>S</b>.P</b>
erbB2	94	V..QR...V...Q.F..N...VLD.GDPLN <b>N</b> TPVTGASPG..R..Q.RS.....K...LIQR <b>PQ...Q...L.K..FHKNNQLA...ID..R.RA.H</b>
erbB1	75	I.....Q.....N <b>M</b> Y..NS....VLS.-----DANK <b>T</b> -. .K. .PMR. .Q. . . . . H.A.RFSN.PA. .NVES.Q.R. .SSDFL. .MSMDFQ.HLGS. <b>Q</b>
<b>II</b>		
erbB4	188	<b>RCHK<b>S</b>CT-GRCWGPTENHCQTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKD<b>T</b>DCFACM<b>N</b>F<b>N</b>DSGAC<b>V</b>TQCPQ<b>T</b>FV<b>N</b>PT<b>T</b>FQLE<b>H</b>N<b>F</b>NAKY<b>T</b>Y<b>G</b></b>
erbB3	166	<b>P..EV.K-.....GSED.....K.I..P..N.H.F..NPNQ...D.....Q.....RH.....PR...PL...KL.....P.PHT..Q..</b>
erbB2	194	<b>P.SPM.KGS...ESSED..S.....GG.A-. .K..LPT...EQ..A..T...HS..L..LH..H..I.ELH..ALVT..TD..ESMP.PEGR..F.</b>
erbB1	165	<b>K.DP..PN.S...AG.EN..K..KII..Q..S...R.KSP.....NQ..A..T..RES..LV.RK.R.EAT.KDT..PLML.....Y.MDV.PEG..SF.</b>
<b>III</b>		
erbB4	287	<b>AFCV<b>K</b>KCP<b>H</b>N<b>F</b>VV-DSS<b>S</b>CV<b>R</b>A</b> CPSSK <b>M</b> EVE-ENG <b>I</b> K <b>M</b> CK <b>P</b> CT <b>D</b> IC <b>P</b> K <b>A</b> CD <b>G</b> IG <b>T</b> GS <b>L</b> MS <b>A</b> Q <b>T</b> VD <b>S</b> SN <b>I</b> DK <b>F</b> IN <b>C</b> T <b>K</b> IN <b>G</b> N <b>L</b> I <b>F</b> LV <b>T</b> GI <b>H</b> GD <b>P</b> Y <b>N</b> A <b>I</b> E <b>A</b> I
erbB3	265	<b>GV..AS.....-QT.....PD...D-K..L..E..GGL.....E.T.S.--RF.....G.V.....L...D..I..LN...WHK.P.L</b>
erbB2	293	<b>.S..TA..Y.YL<b>S</b>T</b> .VG..TLV..LHNQ.VTA.D.TQR.EK.SKP.ARV.Y.L.MEH.REVRA.T.A.QE.AG.KK.F.S.A.PESFD...ASNTAPL
erbB1	265	<b>.T.....R.Y..T.HG.....GADSY.M.-.D.VRK..K.EGP.R.V.N...I.EFKD<b>S</b>L<b>S</b>IN<b>A</b>T..KH.K...S.S.D.HILP<b>V</b>A<b>F</b>R..SV<b>T</b>H<b>T</b>P<b>P</b>L</b>
erbB4	385	<b>DPEK<b>L</b>N<b>V</b>F<b>R</b>T<b>V</b>RE<b>I</b>T<b>G</b>FL<b>N</b>I<b>Q</b>SW<b>P</b>PN<b>M</b>T<b>D</b>FS<b>V</b>FS<b>N</b>L<b>V</b>T<b>I</b>GG<b>R</b>V<b>L</b>Y<b>S</b>GL<b>S</b>LL-IL<b>K</b>Q<b>Q</b>G<b>I</b>T<b>S</b>L<b>Q</b>V<b>Q</b>S<b>L</b>KE<b>I</b>S<b>A</b>G<b>N</b>T<b>Y</b>I<b>T</b>D<b>N</b>S<b>N</b>L<b>C</b>Y<b>H</b>T<b>I</b>N<b>W</b>T<b>T</b>L<b>F</b>S<b>T</b>I-N</b>
erbB3	361	<b>.....Y.....H.HN.....T.....S..NRGFS.L.M.NLN<b>V</b>...G.R.....R...SA.RQ...H<b>H</b>S<b>L</b>...K<b>V</b>L<b>R</b>GP<b>T</b>E</b>
erbB2	393	<b>Q..Q.Q..E.LE...Y.Y.SA..DSL<b>P</b>.L...Q..Q<b>V</b>.R..I.HN.AYS.-T.QGL..SW.GLR..R.LGS.LAL.HH.TH..FV..VP.DQ..RNP-H</b>
erbB1	365	<b>..QE.DILK..K.....L..A..E.R..LHA.E..EI.R..TKQH.QFS.-AVVSLN....GLR.....D.DVI.SG.K....AN....KK..G.S-G</b>

Abb.11: Aminosäuresequenzen der humanen erbB-Rezeptoren (nach Plowman et al. 1993)

Dargestellt sind die Teilsequenzen der 3 Subdomänen des extrazellulären Bereiches der erbB-Rezeptoren (Subdomänen I und III fett, Subdomäne II kursiv). Die Aminosäuresequenzen sind zum Homologievergleich mit einander abgeglichen, wobei ein Punkt (.) für jeweils identische Aminosäuren und ein Strich (-) für zum optimalen Alignment eingefügte Lücken steht. Die zu den jeweiligen Kaninchensequenzen für erbB1-4 homologen Bereiche sind farbig hervorgehoben.











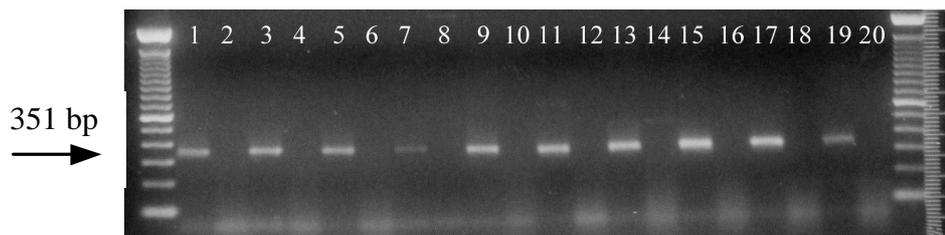
### 3.2. Expressionsmuster während verschiedener Graviditätsstadien

#### 3.2.1. *erbB*-Rezeptoren

##### 3.2.1.1. *erbB1*

Mit den spezifischen Primern konnten Amplikons der erwarteten Größe von 351 bp sowohl in den graviden Uteri der Präimplantationsphase (d 3-6 p.c.) als auch während der Implantations- und Postimplantationsphase (d 7-14 p.c.) - hier jeweils im plazentaren und interplazentaren Uterusanteil - nachgewiesen werden. Die als plazentar bezeichneten Uterusabschnitte entsprechen den Implantationskammern und enthalten neben der eigentlichen Plazenta auch Gewebe des umgebenden Uterus der Implantationskammer und des implantierten Embryos (siehe auch Kap. 2.2). Aus den isolierten 6 Tage alten Blastozysten konnte ebenfalls ein entsprechendes Fragment für *erbB1* amplifiziert werden. Die Ergebnisse sind unter Kap. 3.2.1.5. tabellarisch zusammengefasst.

**Abb.15a:** RT-PCR für *erbB1* (351 bp) Gestationsstadien: **Tag (d) 3 - 9**

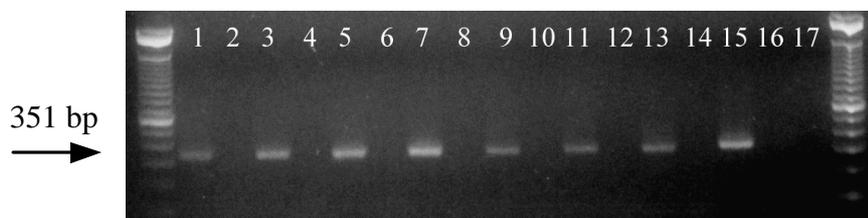


Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                    |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) d 3 Uterus      | 9) d 7 Uterus-plazentar       | 15) d 8 Uterus-interplazentar |
| 3) d 4 Uterus      | 11) d 7 Uterus-interplazentar | 17) d 9 Uterus-plazentar      |
| 5) d 6 Uterus      | 13) d 8 Uterus-plazentar      | 19) d 9 Uterus-interplazentar |
| 7) d 6 Blastozyste |                               |                               |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

**Abb.15b:** RT-PCR für *erbB1* (351 bp) Gestationsstadien: **Tag (d) 10 – 14**



0) 100 bp Längenstandard

- |                              |                                |  |
|------------------------------|--------------------------------|--|
| 1) d 10 Uterus-plazentar     | 7) d 12 Uterus-interplazentar  | 13) d 14 Embryo                          |
| 3) d 10 Uterus-interplazent. | 9) d 14 Utrus-plazentar        | 15) nichtgravider Uterus                 |
| 5) d 12 Uterus-plazentar     | 11) d 14 Uterus-interplazentar | 17) H <sub>2</sub> O-Negativ Kontrolle - |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

### 3.2.1.2. erbB2

Mit den spezifischen Primern für **erbB2** konnte ein entsprechendes Fragment von 388 bp in den graviden Uteri der Präimplantationsphase (d 3-6 p.c.), in den plazentaren und interplazentaren Unterusanteilen der Implantations- und Postimplantationsphase (d 7-14 p.c.) sowie aus den isolierten 6 Tage alten Blastozysten amplifiziert werden. Die Ergebnisse sind unter Kap. 3.2.1.5. tabellarisch zusammengefaßt.

**Abb.16a:** RT-PCR für **erbB2** (388 bp)                      Gestationsstadien: **Tag (d) 3 - 9**

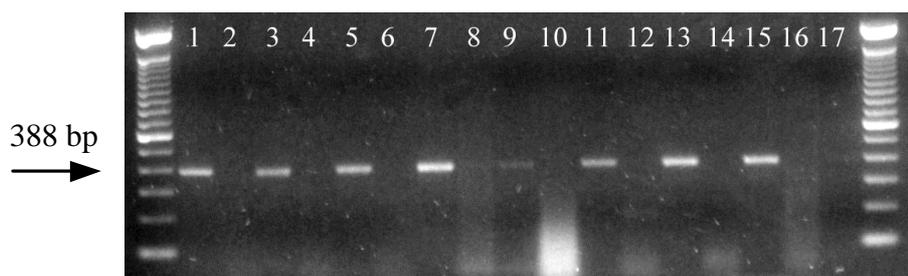


Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                    |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) d 3 Uterus      | 9) d 7 Uterus-plazentar       | 15) d 8 Uterus-interplazentar |
| 3) d 4 Uterus      | 11) d 7 Uterus-interplazentar | 17) d 9 Uterus-plazentar      |
| 5) d 6 Uterus      | 13) d 8 Uterus-plazentar      | 19) d 9 Uterus-interplazentar |
| 7) d 6 Blastozyste |                               |                               |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

**Abb.16b:** RT-PCR für **erbB2** (388 bp)                      Gestationsstadien: **Tag (d) 10 – 14**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1) d 10 Uterus-plazentar      | 9) d 14 Utrus-plazentar                |
| 3) d 10 Uterus-interplazentar | 11) d 14 Uterus-interplazentar         |
| 5) d 12 Uterus-plazentar      | 13) d 14 Embryo                        |
| 7) d 12 Uterus-interplazentar | 15) nichtgravidier Uterus              |
|                               | 17) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |

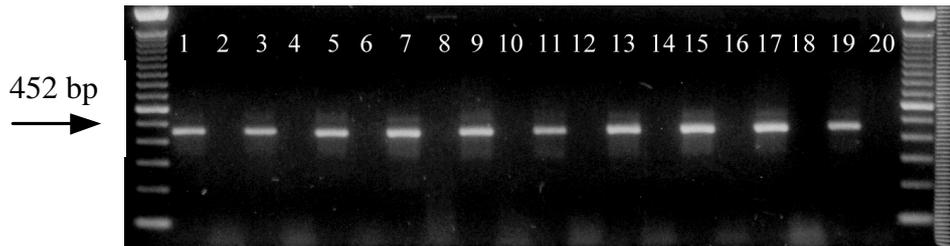
Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

### 3.2.1.3. erbB3

Für erbB3 konnten in allen untersuchten Graviditätsstadien, d.h. in den Uteri der Präimplantationsphase (d 3-6 p.c.), in den plazentaren und interplazentaren Unteranteilen der Implantations- und Postimplantationsphase (d 7-14 p.c.) sowie in isolierten 6 Tage alten Blastozysten Amplikons der erwarteten Größe von 452 bp nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich unter Kap. 3.2.3.

**Abb.17a:** RT-PCR für **erbB3** (452 bp)

Gestationsstadien: **Tag (d) 3 – 9**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                    |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) d 3 Uterus      | 9) d 7 Uterus-plazentar       | 15) d 8 Uterus-interplazentar |
| 3) d 4 Uterus      | 11) d 7 Uterus-interplazentar | 17) d 9 Uterus-plazentar      |
| 5) d 6 Uterus      | 13) d 8 Uterus-plazentar      | 19) d 9 Uterus-interplazentar |
| 7) d 6 Blastozyste |                               |                               |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

**Abb.17b:** RT-PCR für **erbB3** (452 bp)

Gestationsstadien: **Tag (d) 10 – 14**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

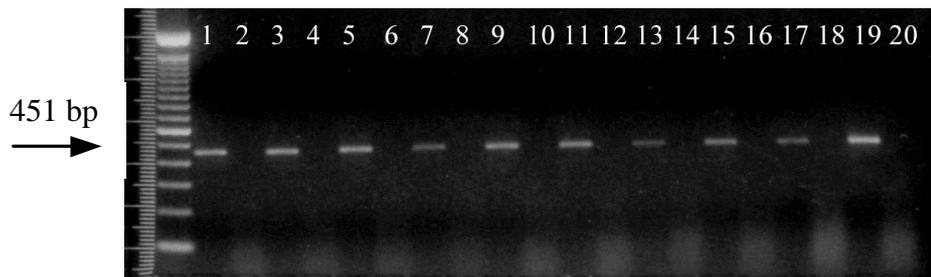
- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| 1) d 10 Uterus-plazentar       | 13) nichtgravider Uterus               |
| 3) d 10 Uterus-interplazentar  | 15) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |
| 5) d 12 Uterus-plazentar       | 16) d 14 Utrus-interplazentar          |
| 7) d 12 Uterus-interplazentar  | 18) d 14 Embryo                        |
| 9) d 14 Utrus-plazentar        | 20) nichtgravider Uterus               |
| 11) d 14 Uterus-interplazentar | 22) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 21) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

### 3.2.1.4. erbB4

Mit den spezifischen Primern für erbB4 ließ sich in 4 von 5 untersuchten Präimplantationsuteri (Tag 3-6 p.c.) ein entsprechendes Amplikon von 451 bp nachweisen. In den isolierten 6 Tage alten Blastozysten wurde nur sehr schwach ein Fragment für erbB4 amplifiziert. Im 7 und 8 Tage graviden Uterus wurde erbB4 nur in 2 von 3 Individuen detektiert, während es am Tag 9, 10, 12 und 14 p.c. wieder in allen getesteten uteroplazentaren Geweben nachzuweisen war.

**Abb.18a:** RT-PCR für **erbB4** (451bp) Gestationsstadien: **Tag (d) 3 - 9**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                    |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) d 3 Uterus      | 9) d 7 Uterus-plazentar       | 15) d 8 Uterus-interplazentar |
| 3) d 4 Uterus      | 11) d 7 Uterus-interplazentar | 17) d 9 Uterus-plazentar      |
| 5) d 6 Uterus      | 13) d 8 Uterus-plazentar      | 19) d 9 Uterus-interplazentar |
| 7) d 6 Blastozyste |                               |                               |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

**Abb.18b:** RT-PCR für **erbB4** (451bp) Gestationsstadien: **Tag (d) 10 – 14**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1) d 10 Uterus-plazentar      | 9) d 14 Utrus-plazentar                |
| 3) d 10 Uterus-interplazentar | 11) d 14 Uterus-interplazentar         |
| 5) d 12 Uterus-plazentar      | 12) d 14 Embryo                        |
| 7) d 12 Uterus-interplazentar | 15) nichtgravider Uterus               |
|                               | 17) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 13, 14, 16) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

### 3.2.1.5. Zusammenfassung

**Tab. 12a:** Expressionsmuster der erbB-Rezeptoren während der Präimplantationsphase

(n = Anzahl untersuchter Individuen; + Amplikon vorhanden; – kein Amplikon)

Tag p.c.	Gewebe	n	erbB1	erbB2	erbB3	erbB4
3	Uterus	5	+	+	+	+ (4/5)
4	Uterus	5	+	+	+	+ (4/5)
6	Uterus	5	+	+	+	+ (4/5)
	Blastozysten	30	+	+	+	+

**Tab. 12b:** Expressionsmuster der erbB-Rezeptoren während der Implantations- und Postimplantationsphase (n = Anzahl untersuchter Individuen; + Amplikon; – kein Amplikon)

Tag p.c.	Uterusteil	n	erbB1	erbB2	erbB3	erbB4
7	uteroplazentar	3	+	+	+	+ (2/3)
	interplazentar	3	+	+	+	+ (2/3)
8	uteroplazentar	3	+	+	+	+ (2/3)
	interplazentar	3	+	+	+	+ (2/3)
9	uteroplazentar	2	+	+	+	+
	interplazentar	2	+	+	+	+
10	uteroplazentar	2	+	+	+	+
	interplazentar	2	+	+	+	+
12	uteroplazentar	2	+	+	+	+
	interplazentar	2	+	+	+	+
14	uteroplazentar	2	+	+	+	+
	interplazentar	1	+	+	+	+
	Fetus	1	+	+	+	+

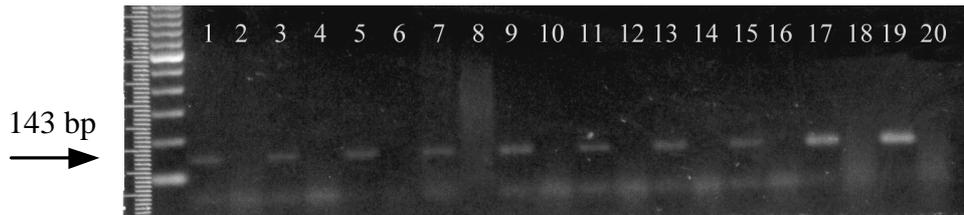
### 3.2.2. *erbB*-Liganden

#### 3.2.2.1. EGF

EGF konnte in allen untersuchten Uteri, d.h. am Tag 3 – 6 p.c. sowie am Tag 7 – 14 p.c. und hier sowohl im plazentaren als auch im interplazentaren Anteil nachgewiesen werden. Isolierte 6 Tage alten Blastozysten exprimierten ebenfalls EGF. Eine Zusammenfassung findet sich bei 3.2.2.4.

**Abb. 19a:** RT-PCR für EGF (143 bp)

Gestationsstadien: **Tag (d) 3 - 9**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                    |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) d 3 Uterus      | 9) d 7 Uterus-plazentar       | 15) d 8 Uterus-interplazentar |
| 3) d 4 Uterus      | 11) d 7 Uterus-interplazentar | 17) d 9 Uterus-plazentar      |
| 5) d 6 Uterus      | 13) d 8 Uterus-plazentar      | 19) d 9 Uterus-interplazentar |
| 7) d 6 Blastozyste |                               |                               |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

**Abb. 19b:** RT-PCR für EGF (143 bp)

Gestationsstadien: **Tag (d) 10 - 14**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| 1) d 10 Uterus-plazentar       | 9) d 14 Utrus-plazentar                |
| 3) d 10 Uterus-interplazentar  | 11) d 14 Uterus-interplazentar         |
| 5) d 12 Uterus-plazentar       | 13) d 14 Embryo                        |
| 7) d 12 Uterus-interplanzentar | 15) nichtgravider Uterus               |
|                                | 17) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |

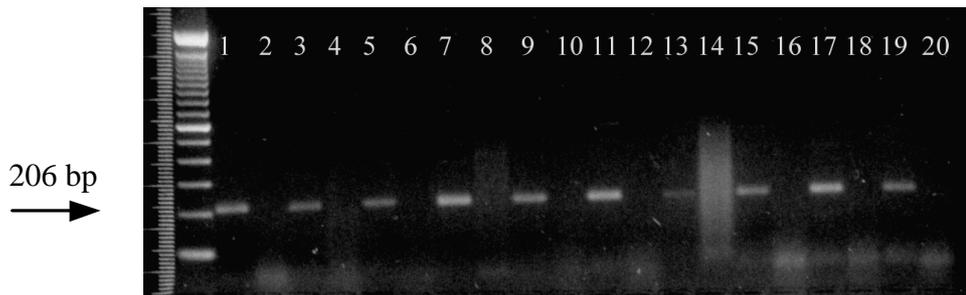
Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

### 3.2.2.2. TGF $\alpha$

Mit den spezifischen Primern für TGF $\alpha$  konnten Amplikons der erwarteten Größe von 205 bp sowohl in den graviden Uteri der Präimplantationsphase (d 3 – 6 p.c.) als auch während der Implantations- und Postimplantationsphase (d 7 – 14 p.c.) – auch hier jeweils im placentaren und interplacentaren Unterusanteil – nachgewiesen werden.

Auch aus den isolierten 6 Tage alten Blastozysten konnten entsprechende Fragmente amplifiziert werden. Die Ergebnisse sind unter Kap. 3.2.2.4. tabellarisch zusammengefaßt.

**Abb.20a:** RT-PCR für TGF $\alpha$  (206 bp)                      Gestationsstadien: **Tag (d) 3 - 9**

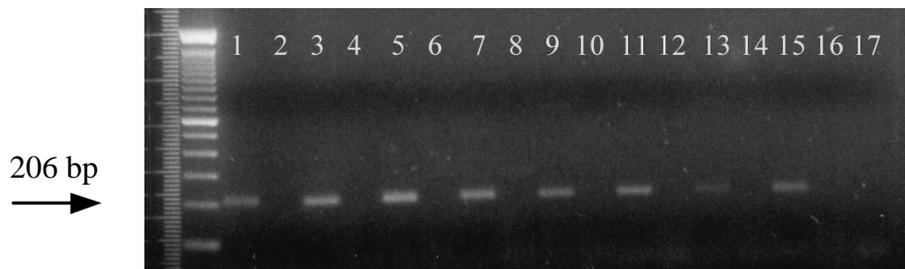


Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                    |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) d 3 Uterus      | 9) d 7 Uterus-plazentar       | 15) d 8 Uterus-interplazentar |
| 3) d 4 Uterus      | 11) d 7 Uterus-interplazentar | 17) d 9 Uterus-plazentar      |
| 5) d 6 Uterus      | 13) d 8 Uterus-plazentar      | 19) d 9 Uterus-interplazentar |
| 7) d 6 Blastozyste |                               |                               |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

**Abb.20b:** RT-PCR für TGF $\alpha$  (206 bp)                      Gestationsstadien: **Tag (d) 10 – 14**



Spur 0) 100 bp Längenstandard

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| 1) d 10 Uterus-plazentar       | 9) d 14 Utrus-plazentar                |
| 3) d 10 Uterus-interplazentar  | 11) d 14 Uterus-interplazentar         |
| 5) d 12 Uterus-plazentar       | 13) d 14 Embryo                        |
| 7) d 12 Uterus-interplanzentar | 15) nichtgravidier Uterus              |
|                                | 17) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) zugehörige RNA-Negativ-Kontrollen

### 3.2.2.3. HB-EGF

HB-EGF wurde mittels der spezifischen Primer in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen (Bilder nicht gezeigt). Lediglich nach Reamplifikation des ersten PCR-Produktes konnte in einigen der Proben ein Fragment der entsprechenden Größe von 396 bp schwach amplifiziert werden. Auf die Darstellung der Reamplifikationsprodukte wird an dieser Stelle verzichtet.

### 3.2.2.4. Zusammenfassung

**Tab. 13a :** Expressionsmuster der erbB-Liganden während der Präimplantationsphase (n = Anzahl untersuchter Individuen; + Amplikon vorhanden; - kein Amplikon; (+) nach Reamplifikation)

Tag p.c.	Gewebe	n	EGF	TGF $\alpha$	HB-EGF
3	Uterus	5	+	+	(+)
4	Uterus	5	+	+	(+)
6	Uterus	5	+	+	(+)
	gepoolte Blastozysten	30	+	+	(+)

**Tab. 13b:** Expressionsmuster der erbB-Liganden während der Implantations- und Postimplantationsphase (n = Anzahl untersuchter Individuen; + Amplikon; - kein Amplikon; (+) nach Reamplifikation)

Tag p.c.	Uterusteil	n	EGF	TGF $\alpha$	HB-EGF
7	uteroplazentar	3	+	+	(+)
	interplazentar	3	+	+	(+)
8	uteroplazentar	3	+	+	(+)
	interplazentar	3	+	+	(+)
9	uteroplazentar	2	+	+	(+)
	interplazentar	2	+	+	(+)
10	uteroplazentar	2	+	+	(+)
	interplazentar	2	+	+	(+)
12	uteroplazentar	2	+	+	(+)
	interplazentar	2	+	+	(+)
14	uteroplazentar	2	+	+	(+)
	interplazentar	1	+	+	(+)
	Fetus	1	+	+	(+)

### 3.3. Pseudogravide und nichtgravide Uteri

Zum Vergleich mit den verschiedenen Graviditätsstadien wurden pseudogravide (d 6-9) und nichtgravide Tiere untersucht, um evtl. Rückschlüsse hinsichtlich des Einflusses des Embryos bzw. der Gravidität des Uterus auf die Expression der erbB-Rezeptoren und ihrer Liganden ziehen zu können. Dabei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei den graviden Uteri, d.h. für die Rezeptoren **erbB1**, **erbB2**, **erbB3** und **erbB4** sowie für die Liganden **EGF** und **TGF $\alpha$**  konnten entsprechende Amplikons nachgewiesen werden, nicht jedoch für **HB-EGF** (Tab. 11). Die PCR-Produkte sind exemplarisch für die Expression der Rezeptoren erbB1 – 4 in pseudograviden Uteri in Abb. 21a-d dargestellt.

Tab. 14: Expressionsmuster der erbB-Rezeptoren und –Liganden in pseudograviden und nichtgraviden Uteri

Stadium	n	Rezeptoren				Liganden		
		erbB1	erbB2	erbB3	erbB4	EGF	TGF $\alpha$	HB-EGF
pseudogravid	d 6	1	+	+	+	+	+	-
	d 7	1	+	+	+	+	+	-
	d 8	1	+	+	+	+	+	-
	d 9	1	+	+	+	+	+	-
nicht-gravide	3	+	+	+	+	+	+	-

#### **Abb.21 a-d:** RT-PCR pseudogravidier Uteri für die erbB-Rezeptoren

Die Probenverteilung entspricht für alle 4 Beispiele folgendem Muster:

- |      |                          |                                       |
|------|--------------------------|---------------------------------------|
| Spur | 0) 100 bp Längenstandard | 5-6) d 8 pp Uterus                    |
|      | 1-2) d 6 pp Uterus       | 7-8) d 9 pp Uterus                    |
|      | 3-4) d 7 pp Uterus       | 9) H <sub>2</sub> O-Negativ-Kontrolle |

(Neben dem Amplikon ist jeweils die RNA-Negativ-Kontrolle aufgetragen.)

Abb.21a : RT-PCR für **erbB1** (351 bp)

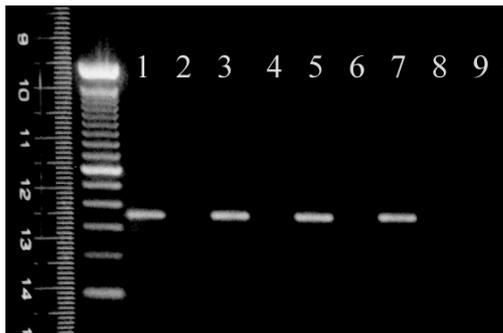


Abb.21b: RT-PCR für **erbB2** (388 bp)

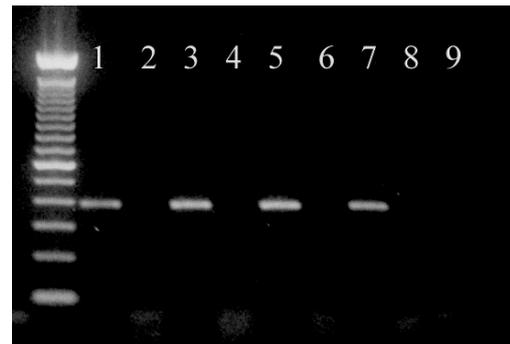


Abb.21c: RT-PCR für **erbB3** (452 bp)

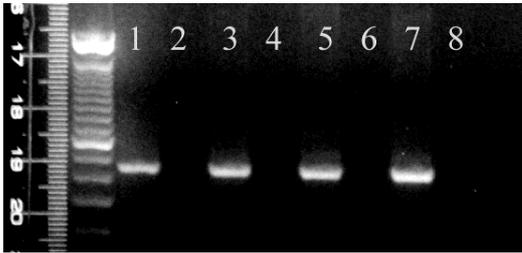
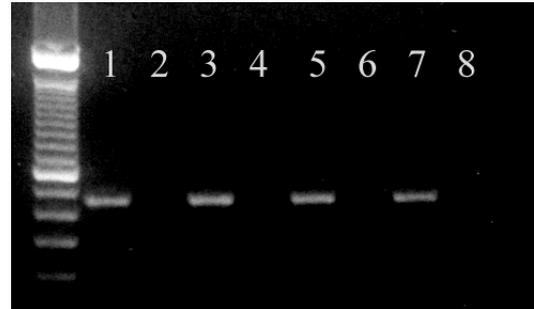


Abb.21d: RT-PCR für **erbB4** (451 bp)



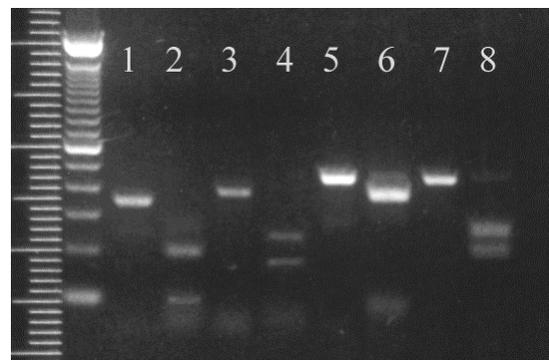
### 3.4. Restriktionsanalyse und Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung jeweils zweier repräsentativer Amplikons und durch Restriktionsanalyse bestätigt. Vor allem für die erbB-Produkte war die Restriktionsanalyse hilfreich, da diese trotz etwa gleicher Größe ein unterschiedliches Restriktionsprofil aufwiesen. Die erhaltenen Restriktionsfragmente entsprachen den erwarteten Größen von 66, 91 und 193 bp für erbB1 (Hpa II), 158 und 230 bp für erbB2 (Apa I), 374 und 78 bp für erbB3 (Apa I), 200 und 251 bp für erbB4 (Apa I) sowie 46 und 160 bp für TGF $\alpha$  (Pst I). EGF wurde dieser Restriktionsanalyse nicht unterzogen, da keine günstig liegenden Schnittstellen vorhanden waren und das Amplikon nur 142 bp groß war. Der Restriktionsenzymverdau für erbB1-4 ist in Abb. 22 gezeigt.

Abb.22: Restriktionsanalyse

Spur 0) 100 bp Längenstandard

- 1) erbB1 unverdaut: 350 bp
- 2) erbB1 verdaut: 66; 91 & 193 bp
- 3) erbB2 unverdaut: 388 bp
- 4) erbB2 verdaut: 158 & 230 bp
- 5) erbB3 unverdaut: 452 bp
- 6) erbB3 verdaut: 374 & 78 bp
- 7) erbB4 unverdaut: 451 bp
- 8) erbB4 verdaut: 200 & 251 bp



## 4. DISKUSSION

### 4.1. Sequenzanalyse

Ein Vergleich der bisher bekannten Sequenzen zeigt, daß die **erbB-Rezeptoren** verschiedener Säugetierspezies relativ homolog sind (Carpenter & Wahl 1990, Lim et al. 1997). Dies bestätigten auch die Sequenzierungsergebnisse für die erbB-Rezeptoren des Kaninchens. Desweiteren ergaben die Homologievergleiche Übereinstimmungen mit trankierten, löslichen Rezeptorformen von erbB1 (Merlino et al. 1985, Ilekis et al. 1995, Petch et al. 1990, Flickinger et al. 1992) und erbB3 (Kato et al. 1993). Diese löslichen Rezeptoren entstehen durch proteolytische Spaltung oder alternatives RNA-Splicing und bestehen nur aus der extrazellulären Domäne der vollständigen Rezeptoren. Da die aus dem Kaninchen klonierten Fragmente zu diesen Bereichen homolog sind (Abb. 11, S. 27), konnte bei der Untersuchung der Gewebe mittels RT-PCR nicht zwischen den beiden Rezeptorformen unterschieden werden.

Auch bei den abgeleiteten Aminosäuresequenzen finden sich erwartungsgemäß relativ hohe Übereinstimmungen, besonders wenn man berücksichtigt, daß es sich bei den unterschiedlichen Aminosäuren um konservative Substitutionen, d.h. dem Austausch von Aminosäuren einer Gruppe mit ähnlichen Eigenschaften, handelt. Dies weist ebenfalls auf eine strukturelle und wahrscheinlich funktionelle Konservierung der untersuchten erbB-Domäne hin und stützt die Theorie der evolutionären Entstehung aus gemeinsamen Vorläufermolekülen.

Das Fragment für **EGF** vom Kaninchen ist in seiner Nukleotidsequenz zu 79% homolog zu einem Bereich der extrazellulären Domäne des Menschen, das von 2 Exonen, die durch ein 1,5 kb großes Intron getrennt sind, kodiert wird und dem letzten EGF-Motiv, d.h. dem reifen EGF-Molekül entspricht (Bell et al. 1986). Geringere Homologien von 65 bzw 72% bestehen im Vergleich mit Nagern und dem Schwein (Gray et al. 1983, Saggi et al. 1992, Joergensen et al. 1998).

Im Vergleich zum EGF scheint **TGF $\alpha$**  stärker konserviert zu sein. Hier finden sich große Übereinstimmungen von 85-92% mit bekannten Sequenzen anderer Säuger wie Mensch, Schaf, Schwein, Rhesusaffe, Maus und Ratte (Quian et al. 1993, Derynck et al. 1984, Vaughan et al. 1992b, 1993, Ma et al. 1994, Berkowitz et al. 1996, Blasband et al. 1990, Lee et al. 1985). Der homologe Bereich entspricht ebenfalls einem Teil des reifen TGF $\alpha$  und wird von 2 Exonen kodiert (Berkowitz et al. 1996, Blasband et al. 1990, Lee et al. 1985, Derynck et al. 1984). Auch die Homologie des reifen TGF $\alpha$  von Primaten und Nagern ist mit ca. 90% sehr hoch, wobei eine bemerkenswerte Konservierung des

zytoplasmatischen Bereichs auf gemeinsame speziesübergreifende Funktionen hindeutet (Derynck et al. 1984, 1986, Lee et al. 1985, Marquardt et al. 1983).

Ähnlich hohe Homologien von 83-92% weist das klonierte **HB-EGF**-Fragment des Kaninchens mit anderen Mammaliern auf (Naglich et al. 1992, Loukianov et al. 1997, Higashiyama et al. 1991, Fen et al. 1993, Kimmerly et al. 1998, Vaughan et al. 1992c, Abraham et al. 1993, Harding et al. 1996), und zwar in einem Bereich, der der extrazellulären und dem Anfangsteil der transmembranen Domäne des Precursors entspricht und ebenfalls von 2 Exonen kodiert wird, die durch ein 5-6 kb großes Intron getrennt sind. Ein Teil dieser extrazellulären Region kodiert für die Heparin-bindende Domäne, die auch in der sezernierten, reifen Form enthalten ist.

Die Sequenzen der Liganden sind innerhalb der Säuger relativ konserviert. Eine eher geringe Homologie von 30-45% besteht dagegen zwischen den einzelnen Liganden untereinander (Marquardt et al. 1983, 84, Higashiyama et al. 1992), obwohl alle an erbB1 binden können (siehe Abschnitt 1.4.1.). Hierin könnte die Ursache für unterschiedliche Funktionen bzw. Signalstärke oder unterschiedliche Bindungsaffinitäten liegen (Komuraski et al. 1997, Shelly et al. 1998). Wie schon bei den Rezeptoren kann auch bei den Liganden mittels der RT-PCR nicht zwischen dem transmembranen Vorläufermolekül und der reifen, löslichen Form unterschieden werden, da die ermittelten Sequenzen in Bereichen liegen, die auch Homologien zu den löslichen Liganden aufweisen.

#### **4.2. Expression der erbB-Rezeptoren**

Rezeptor-Tyrosinkinase der erbB-Familie spielen eine essentielle Rolle bei physiologischen Vorgängen des Zellwachstums (Burden & Yarden 1997; Hynes & Stern 1994; Tzahar & Yarden 1998) sowie der Zell- und Gewebedifferenzierung (Britsch et al. 1998; Riethmacher et al. 1997; Sibilio et al. 1998). Sie integrieren durch die Bindung spezifischer Liganden externe Stimuli in interne Signaltransduktionssysteme und ermöglichen somit der Zelle, auf ihre Umwelt zu reagieren. Aber sie sind auch an pathologischen Prozessen wie der Tumorentwicklung beteiligt (Hynes & Stern 1994; Tzahar & Yarden 1998). Einige Studien der Tumorforschung zeigten, daß der Mechanismus, über den erbB2 ein höheres metastatisches Potential induziert, darin liegt, Adhäsions- und Invasionschritte der Metastasierungskaskade zu fördern (Yu et al. 1992). Das Zusammenwirken von erbB2 und erbB3 in der Aktivierung mitogener Signalkaskaden bei der unkontrollierten Tumorzellproliferation geschieht über die Deregulation der G1-S-Transition durch Modulation des Aktivierungszustandes des essentiellen G1-S-Regulators Cyclin E-abhängige Kinase 2 (Cyclin E-Cdk2) (Neve et al. 2000). Diese Ergebnisse sind

auch für die Plazentation relevant, da zwischen Tumorinvasion und Trophoblastinvasivität doch einige Gemeinsamkeiten bestehen. Von zentraler Bedeutung in beiden Systemen scheint die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen, matrixdegenerierenden Hydrolasen und Motilitätsfaktoren sowie deren Rezeptoren zu sein (Behrens et al. 1991, Birchmeier et al. 1991).

ErbB-Rezeptoren sind auch für eine normale Embryonalentwicklung von Bedeutung. So führt das Ausschalten des erbB1-Gens zu vielen Entwicklungsanomalien im Gehirn, der Haut und des Darms (Miettinen et al. 1995; Sibia & Wagner 1995; Threadgill et al. 1995). Eine adäquate biologische Wirkung der erbB-Liganden wird von der Expression spezifischer erbB-Rezeptor innerhalb eines Gewebes bestimmt (Sundaresan et al. 1998). Zwischen den Rezeptorsubtypen erbB1-4 besteht eine ausgedehnte Kommunikation, wobei die Rezeptoraktivierung nicht unbedingt mit der direkten Ligandenbindung korreliert ist, da es nach Bildung der initialen Dimere durch Rezeptordissoziation zu sekundären Dimerisierungen kommen kann (Gamett et al. 1997).

ErbB2 nimmt innerhalb der erbB-Familie eine Sonderstellung ein, da trotz der großen Anzahl an erbB-Liganden, die bis jetzt identifiziert worden sind, noch kein direkter Ligand für erbB2 gefunden wurde. Er ist ein Rezeptor mit niedriger Affinität, der die bivalenten EGF-ähnlichen Liganden bindet, nachdem sie von einem der Rezeptoren mit hoher Affinität präsentiert worden sind (Tzahar et al. 1996, 1997, Kraus et al. 1989, Plowman et al. 1990). Auf diese Weise stellt erbB2 für alle anderen Mitglieder der erbB-Familie einen bevorzugten Dimerisierungspartner dar, der v.a. der Signalpotenzierung dient, z.B. indem er die Geschwindigkeit, mit der die erbB-Liganden von den Rezeptoren dissoziieren, verlangsamt, was mit einer verlängerten Aktivierung von Downstream-Signalwegen korreliert (Jones et al. 1999; Worthylake et al. 1999; Tzahar et al. 1997; Graus-Porta et al. 1997; Klapper et al. 1997, Karunagaran et al. 1996; Beerli et al. 1995). Biologische Antworten wie Proliferation, morphologische Differenzierung und Migration bzw. Invasion sind in erbB2-exprimierenden Zellen verstärkt (Spencer et al. 2000; Beerli et al. 1995; Graus-Porta et al. 1995). Der Rezeptor wird v.a. im sekretorisch aktiven Epithel exprimiert (Quirke et al. 1989, Press et al. 1990).

ErbB3 und erbB4 sind bevorzugte Rezeptoren für Neureguline (Chang et al. 1997, Carraway et al. 1997). Diese Gruppe multipler Polypeptide sind u.a. essentiell für die Formierung der Trabekel im embryonalen Herzen (Gassmann et al. 1995, Meyer & Birchmeier 1995) und unterstützen die Differenzierung der Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems (Dong et al. 1995, Canoll et al. 1996).

ErbB1 konnte beim Kaninchen mittels RT-PCR sowohl im Uterus der Präimplantationsphase d 3 - 6 als auch im Uterus der Implantations- und Postimplantationsphase an d 7 - 14 nachgewiesen werden. In den späten Stadien wurden Transkripte in den Uterusabschnitten der Implantationskammern und der dazwischen liegenden interplazentaren Uterusabschnitte gefunden. Da die Transkripte in beiden Regionen nachgewiesen wurden, muß man davon ausgehen, daß diese zumindest teilweise vom Uterus stammen. Aber auch der Embryo produziert erbB1, da entsprechende Fragmente in isolierten d 6 Blastozysten und in 14 Tage alten Feten amplifiziert wurden.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten bisher untersuchter Säugerspezies, wobei die meisten Untersuchungen an der Maus durchgeführt worden sind. Hier wurde der Rezeptor im Trophoblast der Blastozysten und während der Entwicklung gemeinsam mit verschiedenen Liganden in Plazenta, Uterus und Dezidua detektiert (Dardik et al. 1992, Cross et al. 1994, Adamson et al. 1990, Tomooka et al. 1986). In einer immunhistochemischen Studie wurde erbB1 im Stroma während der Präimplantationsphase, der Dezidualisierung und der Postimplantationsphase nachgewiesen (Das et al. 1994a). Untersuchungen an verschiedenen erbB1-knock-out-Mäusestämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund ergaben, daß in einigen dieser Mäusestämmen, denen ein funktioneller Rezeptor fehlte, eine Implantation nicht stattfinden kann (Cross et al. 1994, Threadgill et al. 1995, Miettinen et al. 1995, Sibilias et al. 1995, Raab et al. 1996). Bei den Mutanten, die dennoch implantierten, vermutete man, daß der Verlust durch andere Mitglieder der erbB-Familie kompensiert wurde oder noch ausreichend maternale mRNA vorhanden war (Threadgill et al. 1995). Wie in diesen und anderen Studien belegt, beeinflußt erbB1 u.a. die embryo-maternale Adhäsion und somit auch die Plazentafunktion (Sibilias et al. 1995, Fondacci et al. 1994, Harvey et al. 1995, Hoschuetzky et al. 1994).

Die von Paria et al. (1993) beobachtete Herunterregulierung des erbB1-Gens korreliert mit einem sogenannten Blastozystenruhestadium, in dem keine Implantation stattfinden kann. Eine Blastozystenaktivierung kann durch Östrogen experimentell induziert werden. Auch andere Studien belegen eine Steroidhormon-Abhängigkeit von erbB1 (Giudice & Saleh 1995, Troche et al. 1991, Taketani et al. 1991, Bonaccorsi et al. 1989). Für eine erfolgreiche Implantation sind die synchronisierte Blastozystenentwicklung und Vorbereitung des Uterus in ein empfängnisbereites Stadium essentiell (Psychoyos 1986; Paria et al. 1993). Die Etablierung des empfängnisbereiten Uterus wird durch die zeitlich und zellspezifisch koordinierten Effekte von Progesteron ( $P_4$ ) und Estrogen (E) erreicht (Huet-Hudson et al. 1989). Ursprünglich ging man von der Annahme aus, daß die

Proliferation, Differenzierung und Regeneration des Endometriums direkt durch die ovariellen Steroidhormone Östrogen und Progesteron vermittelt wird. Die regulierte Expression von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren im Uterus und Embryo während der Periimplantationsperiode oder unter steroidaler Stimulation deutet darauf hin, daß diese Faktoren als lokale Mediatoren der Steroidhormonwirkungen fungieren (Das et al., 1994a,b, 1997; Huet-Hudson et al. 1990; Kapur et al. 1992; Lim et al. 1997; Paria et al. 1993, 1994; Paria et Dey 1990; Rappollee et al. 1988; Tamada et al. 1991).

Im Myometrium wurde der Rezeptor erbB1 von Das et al. (1994a) immunhistochemisch in der zirkulär angeordneten glatten Muskulatur, nicht jedoch in längsgerichteten Muskeln nachgewiesen, ebensowenig im luminalen und glandulären Epithel. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Tong et al. (1996), die ebenfalls keine Signale für erbB1 im Epithel, aber deutlich im Stroma und Myometrium detektierten. ErbB1 kann so an EGF-vermittelten Kontraktionen des Myometriums zur Unterstützung der Bewegung von Blastozyste und Spermien an ihren Bestimmungsort oder am EGF-vermittelten Wachstum des Uterus beteiligt sein (Das et al. 1994a, Gardner et al. 1987). Letzteres ist zur Raumschaffung bzw. für die Verteilung der Embryonen in Spezies mit multilokalen Implantationsstellen wie Nager und Kaninchen erforderlich.

Neben den membranständigen full-length-Rezeptoren (fl) existieren auch trunkierte (tr) Formen (Kliem et al. 1998a, Ilekis et al. 1997, Baron et al. 1997, Reiter et al. 1996, Scott et al. 1993, Katoh et al. 1993, Ullrich et al. 1984, Merlino et al. 1985, Xu YH et al. 1984). Diese kommen in allen Zelltypen des Uterus der Präimplantationsphase vor (Tong et al. 1996). Das weitverbreitete Vorkommen des tr-erbB1 deutet darauf hin, daß diese Moleküle eine wichtige physiologische Rolle spielen, möglicherweise bei der Feinabstimmung der Liganden-Rezeptor-Signale EGF-verwandter Wachstumsfaktoren im embryo-maternalen Dialog während der Implantation. Diese regulierende Funktion könnte der trunkierte Rezeptor dadurch ausüben, indem er entweder Liganden der EGF-Familie bindet und so deren lokale Konzentration kontrolliert und/oder indem er mit dem membrangebundenen Rezeptor interagiert und nicht funktionale Heterodimere mit diesem bildet (Petch et al. 1990, Basu et al. 1989).

ErbB1 wurde auch im Uterusgewebe adulter Ratten (Mukku & Stancel 1985, Lin et al. 1988), im Schwein (Zhang et al. 1992b, Kennedy et al. 1994, Kliem et al. 1998b, Wollenhaupt et al. 1997) und beim Menschen gefunden (Chegini et al. 1986, Lin et al. 1988, Smith et al. 1991). Besonders hohe Konzentrationen wurden im Plazentagewebe bei verschiedenen Säugerspezies nachgewiesen (*Maus*: Adamson et al. 1984, 1993, Smith &

Talamantes 1986, *Human*: Chegini et al. 1986, Rao et al. 1985, Kawagoe et al. 1990, *Kaninchen*: Hofman et al. 1990, *Schwein*: Corps et al. 1990).

Aber auch die Embryonen exprimieren während ihrer Entwicklung erbB1. Bei der Maus wurden erbB1-mRNA und -Protein in Blastozysten, besonders um den Zeitpunkt der Implantation (Paria et al. 1993a, Tong et al. 1996), gefunden. Adamson et al. (1984) haben den Rezeptor in Zellen, die sich vom Trophoblasten ableiten, nachgewiesen und festgestellt, daß die Rezeptoranzahl in einigen fetalen Geweben während der Schwangerschaft zunimmt, evtl. durch die vermehrte Zellzahl. In späteren Untersuchungen fand die Gruppe den Rezeptor zwar in den meisten Geweben während aller Fetalstadien der Maus, jedoch in Blastozysten nur auf der Oberfläche von Trophoblastzellen (Adamson et al. 1990). Im Gegensatz dazu haben Dardik et al. (1992) erbB1 nicht nur im Trophoblasten, sondern auch in geringerem Maße in der inneren Zellmasse von Blastozysten nachgewiesen.

Auch beim Menschen wird erbB1 im Tropho- und Embryoblasten exprimiert, in den fortgeschrittenen Stadien jedoch immer weniger (Chia et al. 1995). Die Ursache hierfür könnte in der Abnahme der mRNA maternalen Ursprungs liegen, wie bereits bei der Maus gezeigt. Hier ist die trunkierte Form von erbB1 bereits in der befruchteten Eizelle und in 2-Zell-Embryonen als maternales Transkript vorhanden (Tong et al. 1996, Wiley et al. 1992, Paria et al. 1993a), dessen Konzentration vom 2- bis zum 4-Zell-Stadium abnimmt (Wiley et al. 1992). ErbB1 wird bei der Maus ab dem 4-8-Zellstadium vom embryonalen Genom exprimiert (Huet-Hudson et al. 1990, Wiley et al. 1992, Giudice et al. 1995, Paria et al. 1990). Andere Säugerspezies, in denen der Rezeptor bzw. die spezifische Bindung von EGF, einem direkten Liganden von erbB1, in Präimplantationsembryonen nachgewiesen wurde, sind Schwein, Rind, Schaf und Pony (Corps et al. 1990, Zhang et al. 1992a, Gharib-Hamrouche et al. 1993, Fischer et al. 1994). Im Gegensatz dazu wurde in der Ratte eine embryonale Synthese erst ab d 19 festgestellt (Raaberg et al. 1988).

Als Resümee bleibt festzustellen, daß die Expression von erbB1 im Trophoblasten, fetalen Membranen und uterinem Gewebe während der Periimplantationsperiode darauf hinweist, daß der implantierende Embryo und der Uterus in der Lage sind, miteinander über den Rezeptor und seine Liganden zu kommunizieren. Wiley et al. (1992) und Brice et al. (1993) zeigten, daß erbB1 in Blastozysten funktional ist. ErbB1 scheint v.a. für die Zelldifferenzierung des Embryos von Bedeutung zu sein (Adamson et al. 1997, Dardik et al. 1992; Brice et al. 1993; Wiley et al. 1995).

Für erbB2 wurden in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR Transkripte in allen untersuchten Stadien des graviden Kaninchenuterus der Peri- und frühen Postimplantationsphase sowie in isolierten Blastozysten und 14 Tage alten Feten gefunden.

Im Gegensatz zu erbB1 sind die Studien zum Expressionsmuster im graviden Uterus nicht so zahlreich und betreffen überwiegend die Maus. Auch hier wurde eine zeitlich und zelltypisch regulierte Expression von erbB2-mRNA während der Periimplantationsphase in Uterus und Embryo belegt (Lim et al. 1997). Im Präimplantationsuterus kommt der Rezeptor vorwiegend im luminalen und glandulären Epithel vor. Während der frühen Postimplantationsphase wird erbB2 im Epithel der Implantations- aber auch der Interimplantationsbereiche exprimiert. Zu späteren Zeitpunkten (d 7-8) ist das Transkript im verbleibenden luminalen Epithel und Drüsen der interplazentaren Regionen, im Embryo und in Trophoblast-Riesenzellen nachgewiesen worden. Insgesamt war die Konzentration in der Umgebung der implantierten Blastozysten am höchsten, und die Verteilung des Proteins im Uterus an d 1-8 der Gravidität entsprach der mRNA-Lokalisation (Lim et al. 1997). Das von dieser Gruppe beobachtete Vorkommen von erbB2 im Epithel der Interimplantationsbereiche könnte z.B. gemeinsam mit erbB1 eine Rolle bei der Elongation und dem unterschiedlichen Wachstum des interplazentaren Uterusbereiches im Vergleich zu den Implantationsstellen spielen.

Die Implantation des sich entwickelnden Embryos beinhaltet die Invasion des uterinen Stromas durch Trophoblastzellen, die einen komplexen Prozeß der Proliferation, Migration und Differenzierung durchlaufen. Die regulierte Expression von erbB2 in Trophoblast-Riesenzellen scheint für die Invasion des Endometriums durch diese Zellen bedeutend zu sein (Lim et al. 1997). Jokhi et al. (1994) demonstrierten in ihren immunhistochemischen Untersuchungen an humanem Gewebe, daß villöse Zytotrophoblasten, wenn sie von ihrer Basalmembran aus migrieren, um Zellsäulen zu formen, ihren erbB1-Rezeptor verlieren und stattdessen erbB2 exprimieren. Dieses Expressionsmuster wird während der Invasion des Endometriums durch die Trophoblasten beibehalten. Mit der terminalen Differenzierung des invasiven Zytotrophoblasten in den mehrkernige Synzytiotrophoblasten wird die ursprüngliche erbB1-Expression jedoch wieder hergestellt.

Über die Expression von erbB3 und erbB4 während der Periimplantationsphase liegen nur sehr wenige Untersuchungen vor. Beide Gene werden im 8 Tage alten Mausembryo exprimiert. Uterines erbB3 und erbB4 reagieren auf unterschiedliche EGF-verwandte Liganden mit Auto- bzw. Transphosphorylierung und sind demnach im Uterus biologisch aktiv (Lim et al. 1998, Beerli 1996, Soltoff et al. 1994).

Beim Kaninchen wurde das Transkript für erbB3 in allen untersuchten Graviditätsstadien einschließlich der isolierten Embryonen und des nicht- bzw. pseudograviden Uterus nachgewiesen. In anderen Spezies wurde der Rezeptor außer in der Plazenta v.a. im Epithel parenchymatöser Organe und im ZNS gefunden (DiFiore & Kraus 1992, Pinkas-Kramarski et al. 1997). Die von Lim et al. (1998) beobachtete überwiegend epitheliale Expression des erbB3-Genes im Periimplantationsuterus der Maus entspricht auch seiner Expression in vielen humanen Zellarten epithelialen Ursprungs (Kraus et al. 1989), was auf eine direkte Beteiligung an der Proliferation und/oder Differenzierung hindeutet.

ErbB3 ist auf Grund seiner beeinträchtigten Tyrosinkinaseaktivität für seine Aktivierung auf die Transphosphorylierung durch andere erbB-Rezeptoren angewiesen (Soltoff et al. 1994, Beerli & Hynes 1996). So ist durch erbB2 transphosphoryliertes erbB3 in der Lage, mitogene Signale auszulösen (Wallasch et al. 1995). Die Koexpression von erbB3 und erbB2 im ekto-plazentalen Konus und in Trophoblastriesenzellen (Lim et al. 1997, 1998) deutet darauf hin, daß diese Rezeptoren an den Prozessen der Dezidualisierung, der Regulierung der Trophoblastinvasion und Plazentation beteiligt sind. Das erbB2/erbB3-Dimer stellt einen Rezeptor für NRG-1, EGF und BTC dar (Sliwkowski et al 1994; Alimandi et al. 1997; Pinkas-Kramarski et al. 1998a,b). Auf diese Weise können Signale für die epitheliale Zellproliferation und/oder –differenzierung im Periimplantationsuterus bei fehlendem erbB1 (dem klassischen EGF- und BTC-Rezeptor) übertragen werden.

ErbB3 spielt als Rezeptor für Neureguline auch bei der Differenzierung des Nervensystems eine Rolle (Dong et al. 1995, Canoll et al. 1996). Mäuse, denen erbB2 und erbB3 fehlen, zeigen eine fehlerhafte Migration der Neuralrohrzellen, was zur beeinträchtigten Bildung des sympathischen Nervensystems führt (Britsch et al. 1998). Beim Kaninchen wird erbB3 bereits in 6 Tage alten Blastozysten exprimiert, so daß der Rezeptor auch hier eine Funktion bei der Entwicklung des zukünftigen Nervensystems besitzen könnte.

Auch erbB4 ist für die normale Neurogenese erforderlich, da sein Fehlen z.B. schwere Entwicklungsdefekte in kranialen sensorischen Ganglien zur Folge hatte (Kramer et al. 1996, Gassmann et al. 1995). Ähnliches gilt für die Entwicklung des Herzens. Mäuse, denen erbB2, erbB4 oder Neureguline (NRG) fehlen, sterben um den d 10 p.c. durch anormale Herzentwicklung (Gassmann et al. 1995, Lee et al. 1995, Meyer & Birchmeier

1995, Kramer et al. 1996). Pinkas-Kramarski et al. (1997) fanden erbB4 v.a. im sich entwickelnden ZNS und Herzen des Mausembryos.

Beim Kaninchen wurde ein Amplikon für erbB4 zwar in jedem Stadium detektiert, allerdings während der Prä- und Implantationsperiode nicht in jedem Tier. Auch in 6 Tage alten Blastozysten wurde der Rezeptor nur schwach exprimiert. Erst in der Postimplantationsphase (ab Tag 9 p.c.) konnte erbB4 regelmäßig nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, daß erbB4 während der Periimplantationsperiode nur in sehr geringen Konzentrationen exprimiert wird und erst in der Postimplantationsperiode zunehmend an Bedeutung gewinnt (Gassman et al. 1995, Meyer Birchmeier 1995). Dafür spricht auch die in jedem Falle deutlichere Expression zu späteren Zeitpunkten, v.a. an Tag 14 der Gravidität. Lim et al. (1998) identifizierten 2 Spezies von erbB4 mRNA-Spliceprodukten mit differentieller Expression in der zytoplasmatischen Region des Uterus.

Das uterine Expressionsmuster von erbB4 unterscheidet sich innerhalb der erbB-Genfamilie dahingehend, daß dieser Rezeptor in vom implantierenden Embryo entfernt liegenden Zellen exprimiert wird (Lim et al. 1998). Während erbB4 v.a. im submyometrialen Bereich des Stromas lokalisiert ist, wird zum Zeitpunkt der Implantation in seiner Nähe kein bekannter erbB4-Ligand wie HB-EGF, BTC und EPR exprimiert (Lim et al. 1998). Es ist allerdings möglich, daß diese Liganden im Stroma sezerniert werden und erbB4 auf parakrinem Wege beeinflussen. ErbB4 des Uterus könnte mit membranständigem HB-EGF bei der Adhäsion des Embryos zusammenwirken, da HB-EGF ein Ligand für diesen Rezeptor ist (Elenius et al. 1997, Beerli et al. 1996).

### **4.3. Expression der erbB-Liganden**

Typische von Wachstumsfaktoren ausgelöste Reaktionen sind eine verstärkte RNA-, DNA- und Proteinsynthese (Heyner & Wiley 1990; Werb 1990; Wood & Kaye 1989). Die damit verbundenen allgemeinen Effekte der Wachstumsfaktoren wie Stimulierung der Zellproliferation und -differenzierung sind klassische Aspekte der Embryonalentwicklung. Durch die Kontrolle spezifischer Entwicklungsprozesse tragen sie zur synchronisierten embryo-maternalen Interaktion während der Periimplantationsperiode bei.

Beim graviden Kaninchen wurde EGF in allen untersuchten Stadien sowohl im Uterus als auch in isolierten 6 Tage alten Blastozysten und 14 Tage alten Feten detektiert. Diese Daten decken sich nur zum Teil mit denen anderer Studien an verschiedenen Säugerspezies. Der Wachstumsfaktor wurde im Uterus der Maus (DiAugustine et al. 1988, Huet-Hudson et al. 1990), der Ratte (Lin et al. 1988), des Schweins (Kennedy et al. 1994)

und des Menschen (Haining et al. 1991, Chegini et al. 1992, Giudice et al. 1995, Hofmann et al. 1991) nachgewiesen. Während der Gravidität der Maus wurden stadienabhängige Änderungen der EGF-Expression beobachtet (Huet-Hudson et al. 1989, 1990). Es wird zunächst am ersten Tag der Gravidität in luminalen und glandulären Epithelzellen gefunden und dann noch einmal kurzzeitig am Tag 4 innerhalb des luminalen Epithels an der apikalen Grenze. Zum Zeitpunkt der Implantation an Tag 4 und 5 ist EGF erneut nicht im Uterus detektierbar (Huet-Hudson et al. 1990). Auch im Endometrium des Schafs und des Rinds konnte EGF während der Periimplantationsperiode nicht nachgewiesen werden (Gharib-Hamrouche et al. 1995, Watson et al. 1992, 1995). Über das Vorkommen von EGF im Embryo verschiedener Spezies existieren z.T. gegensätzliche Aussagen. Bei der Maus ist EGF in unbefruchteten Eizellen, in 2-, 4- und 16-Zell-Embryonen, in Blastozysten sowie in 12 Tage alten Embryonen detektierbar, wobei es zumindest in den Präimplantationsembryonen maternalen Ursprungs ist (Rappolee et al. 1988, Dardik et al. 1992, Rall et al. 1985). Auch in menschlichen Präimplantationsembryonen wurde das Vorhandensein EGF maternalen Ursprungs nachgewiesen (Chia et al. 1995). Beim Rind und Schaf wurde EGF zu keinem Zeitpunkt der Periimplantationsphase gefunden (Gharib-Hamrouche et al. 1995, Watson et al. 1992, 1995). Zum gleichen Ergebnis kamen auch Corps et al. (1990) bei Präimplantationsembryonen des Schweins, während Vaughan et al. (1992a) hier mRNA detektierten.

EGF beeinflusst in Zielzellen die Mitogenese, den Transport von Nährstoffen und Elektrolyten, die Glykolyse und morphologische Veränderungen (Carpenter & Cohen 1990). Der vorherrschende Effekt von EGF ist jedoch die Förderung der Zellproliferation und Zell-differenzierung (Carpenter & Cohen 1990, Burgess et al. 1988). Diese Prozesse spielen besonders während der Gravidität bei der Entwicklung von Embryo und umgebenden Uterusgewebe eine große Rolle. Die Beteiligung von EGF an der Implantation sowie die spezifische Bindung von EGF durch Präimplantationsembryonen wurde beim Schwein, Rind, Schaf und Pony nachgewiesen (Corps et al. 1990, Gharib-Hamrouche 1993, Fischer et al. 1994). Bei der Maus fördert EGF die Umwandlung der Morula in die Blastozyste sowie deren Ausdehnung und Schlüpfen aus der Zona pellucida (Buyalos & Cai 1994, Paria et al. 1990, Dardik et al. 1991, Taga & Kishimoto 1992, Brice et al. 1993). Während des Übergangs vom Morula- zum Blastozystenstadium erfolgt unter dem Einfluß von EGF eine verstärkte Proteinsynthese (Paria et al. 1990, Werb et al. 1990). In der Blastozyste beschränkt sich dieser Effekt jedoch auf die Trophoblastzellen, während die innere Zellmasse hiervon nicht betroffen ist. Im Gegensatz dazu beobachteten Goldman et al. (1993, 1998) eine stadienabhängige Wirkung von EGF. Die Bildung des

Trophoblasten wurde negativ beeinflusst, wohingegen ein massives Wachstum des Embryoblasten stattfand, wenn EGF später in der Elongationsphase zugegeben wurde.

Für die Ausbildung der Blastozystenhöhle bei der Maus ist ein Austausch von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}^+$  erforderlich. Hierin könnte die Bedeutung von EGF bei der Bildung der Blastozystenhöhle liegen, da EGF membrangebundene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Austauscher aktiviert (Dardik & Schultz 1991, Defize et al. 1986). In bezug auf das Zonaschlüpfen nimmt man an, daß hier die Erhöhung der Aktivität von Plasminogenaktivatoren (PA) in den Trophoblastzellen durch EGF eine Rolle spielt (Galway et al. 1989, Paria et al. 1990). Da EGF die Aktin-Polymerisierung beeinflussen kann (Schlessinger & Geiger 1981, Dadabay et al. 1991) und diese an der Kompaktierung beteiligt ist (Fleming & Johnson 1988), könnte EGF auch in diesem Zusammenhang morphogene Bedeutung haben. Trophoblastzellen sezernieren unter dem Einfluß von EGF vermehrt hCG (Barnea et al. 1990, Maruo et al. 1992, Amemiya et al. 1994, Harvey et al. 1995, Matsumoto et al. 1998). Die Förderung der Expression des hCG-Gens könnte Teil des schwangerschaftserhaltenden Systems sein. Desweiteren stimuliert EGF Proteinasen der extrazellulären Matrix, welche Schlüsselkomponenten in der Trophoblast-Invasion bei der Implantation darstellen (Harvey et al. 1995).

EGF regt auch beim Schwein die Zellproliferation an, wobei die Bindung zeit- und sättigungsabhängig ist (Corps et al. 1990, Fischer et al. 1991). Zugabe von EGF zum Nährmedium fördert die meiotische Reifung von Schweine-Oozyten und verbessert die Entwicklung der Embryonen nach In-vitro-Fertilisation und –Kultur (Arellano et al. 1993, Reed et al. 1993, Singh et al. 1993, 94, Ding et al. 1994, Grupen et al. 1997). Da EGF in Schweineembryonen erst nach deren Elongation exprimiert wird, vermutet einen Einfluß von EGF auf die Differenzierung des Trophoblasten und von Organen (Vaughan et al. 1992a). Ähnliche Ergebnisse wurden beim Rind gefunden. Unter anderem erhöhte sich nach EGF-Zugabe während der In-vitro-Fertilisation der Prozentsatz der Oozyten, die die Kernreifung durchliefen, und der Embryonen, die das Blastozystenstadium erreichten (Lonergan et al. 1996). EGF stimulierte auch das Zonaschlüpfen der Embryonen, die einzeln vom 8-Zell-Stadium an kultiviert wurden, allerdings ohne einen Effekt auf die Blastozystenentwicklung zu haben (Keefer et al. 1994). Im Gegensatz dazu stellten Lee et al. (1995) fest, daß eine vorübergehende Einwirkung von EGF auf Morulae und frühe Blastozysten des Rindes die spätere Entwicklung verbesserte.

Auch nach der Implantation spielt EGF in der Embryonalentwicklung eine Rolle, indem es die Proteinsynthese bzw. die Proliferation embryonaler Zellen während der

Morphogenese und das allgemeine Wachstum des Embryos fördert (Adamson & Meek 1984, Yoneda & Pratt 1981, Gross et al. 1986, O'Neill et al. 1997, Pratten et al. 1998).

Die Hauptquelle des im Plasma vorkommenden EGF bei Mäusen ist die Gl. submandibularis (Rall et al. 1985, Tsutsumi et al. 1987). Eine Sialadenektomie hat daher Mangel an EGF zur Folge. In diesem Zusammenhang wurden nach einer derartigen Operation Aborte und intrauterine Wachstumsretardierung bei Mäusen beobachtet (Tsutsumi et al. 1987, Kamei et al. 1993). Die Aborte wurden auf die ebenfalls festgestellte Beeinträchtigung des Wachstums des Uterus während der Schwangerschaft zurückgeführt. Dagegen wurde die Anzahl der Implantationsstellen durch Sialadenektomie oder Behandlung mit anti-EGF nicht beeinflusst, woraus geschlossen wurde, daß EGF eher wichtig für die Postimplantationsentwicklung als für die Implantation ist (Tsutsumi et al. 1993).

EGF ist ein Stimulator für die Proliferation des Uterusstromas und -epithels beim Menschen und der Maus (Haining et al. 1991, Nelson et al. 1991, Tsutsumi et al. 1993, Giudice et al. 1995, Tomooka et al. 1986) sowie für die Differenzierung von Stromazellen, was sich in einer erhöhten Sekretion der Dezidualisierungsmarker Prolaktin, Laminin und Fibronectin ausdrückt (Irwin et al. 1991). Außerdem fördert es in Zellen des Endometriums die Sekretion von Plasminogenaktivatoren, (Bany et al. 1998, Paria et al. 1991, Zhang et al. 1992b, Miyauchi et al. 1995, Jensen & Rodeck 93, Tranque et al. 1994) und Prostaglandinen (Ishihara et al. 1991, Paria et al. 1991). Beim Kaninchen sind Prostaglandine (PG) für die Blastozystenimplantation und Dezidualisierung bedeutsam. Der PG-Synthesehemmer Indomethacin führt zu einer verminderten Zunahme der Gefäßpermeabilität, die normalerweise an den Implantationsstellen zu verzeichnen ist. Diese Indomethacineffekte sind durch die gleichzeitige Gabe von PGs teilweise reversibel sind (Hoos & Hoffman 1983; Hoffman et al. 1978). Besonders hoch ist die PG-Produktion im graviden Kaninchenuterus zum Zeitpunkt der Implantation zwischen Tag 4 und 7 p.c. (Lytton & Poyser 1982). Die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen sind im Vergleich zu den Interimplantationsbereichen in den Implantationsstellen höher (Hoos & Hoffman 1980; Denker 1995). Die Rolle von EGF hierbei besteht möglicherweise in der Regulation der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> und somit der PG-Synthese im Endometriumsstroma während der Implantation. EGF bewirkt in sensibilisierten Stromazellen des Rattenuterus erhöhte Steady-State-Konzentrationen an zytosolischer Phospholipase A<sub>2</sub>-mRNA und -Protein (Bany et al. 1999).

In engem Zusammenhang mit EGF ist die Rolle von TGF $\alpha$  während der Gravidität zu sehen. TGF $\alpha$  bindet und aktiviert ebenfalls erbB1-Heteromere (Massagué & Pandiella 1983) und kann daher auch ähnliche Funktionen wie EGF auslösen (Smith et al. 1985, Tam et al. 1985). In vielen Fällen ist TGF $\alpha$  wirkungsvoller als EGF (Schreiber et al. 1986, Barrandon et al. 1987, Vaughan et al. 1993). So fördert TGF $\alpha$  in stärkerem Maße als EGF die Angiogenese und könnte daher die ausgedehnte Vaskularisierung, die mit der Dezidualisierung einhergeht, begleiten (Schreiber et al. 1986). Desweiteren scheint TGF $\alpha$  auch eine Rolle bei der Prostaglandin-Synthese (Yokota et al. 1986) und der erhöhten Kapillarpermeabilität (Gupta et al. 1989) während der Implantationsphase zu spielen sowie Wachstum und Funktion von Dezidua- und Trophoblastzellen zu beeinflussen (Han et al. 1987, Wilcox et al. 1988, Graham & Lala 1991). Allerdings scheint TGF $\alpha$  für die Implantation nicht essentiell zu sein, da diese in TGF $\alpha$ -knock-out-Mäusen normal stattfinden konnte und die Mortalität in der Periimplantationsperiode nicht signifikant erhöht war (Luetkecke et al. 1993, Mann et al. 1993). Die neugeborenen Tiere waren zwar kleiner, wiesen ansonsten aber lediglich Mißbildungen an Augen, Haaren und Schnurrhaaren auf. Es ist denkbar, daß der Verlust von TGF $\alpha$  in der Periimplantationsperiode durch andere Wachstumsfaktoren der EGF-Familie kompensiert wurde, so daß zumindest die frühe Embryonalentwicklung einschließlich der Implantation nicht beeinträchtigt wurde. Die Hauptaufgabe von TGF $\alpha$  für die Entwicklung liegt wahrscheinlich in der Anregung der Proliferation verschiedener Zellpopulationen, besonders aber epithelialer Zellen, für die er ein potentes Mitogen darstellt (Sandgren et al. 1990, Jhappan et al. 1990).

Transkripte für TGF $\alpha$  wurden im Kaninchenuterus während aller untersuchten Graviditätsstadien der Peri- und Postimplantationsperiode sowie in 6 Tage alten Blastozysten und 14 Tage alten Feten gefunden, ebenso in den pseudo- und nicht-graviden Uteri. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit Studien an anderen Säugerspezies.

Bereits in der unbefruchteten Eizelle der Maus ist TGF $\alpha$ -mRNA als maternales Transkript vorhanden, wird aber schnell nach der erfolgten Befruchtung und der anfänglichen Embryonalentwicklung herunterreguliert und erscheint erst wieder im Präimplantationsembryo des 4-Zell-Stadiums (Rappolee et al. 1988). Mehrere Gruppen haben das Vorkommen von TGF $\alpha$  im Blastozystenstadium der Maus bestätigt, worin es sich von der EGF-Expression unterscheidet (Rappolee et al. 1988, Tamada et al. 1991, Dardik et al. 1992). TGF $\alpha$ -Protein wird an den basolateralen Membranen des Embryoblasten und im polaren Trophoblast der Blastozyste exprimiert (Dardik et al.

1992). In Postimplantationsembryonen an d 7-8 konnte das Protein im Gegensatz zur RNA nicht detektiert werden, was auf eine schnelle Freisetzung bzw. Umsatz oder verändertes Prozessieren zurückgeführt wurde (Tamada et al. 1991). Das erscheint insofern plausibel, als daß TGF $\alpha$ , wenngleich in geringen Mengen, in verschiedenen fetalen Geweben sowie unmittelbar vor der Geburt nachgewiesen wurde (Wilcox et al. 1988, Brown et al. 1990).

TGF $\alpha$  stimuliert wie EGF die Oozytenreifung bei Ratten, Mäusen, Rind und Schwein (Brucker et al. 1991, Massagué & Padiella 1993, Kobayashi et al. 1994, Coskun et al. 1995). Außerdem ist es an der Morula-Blastozysten-Transformation, dem Zonaschlüpfen und der Blastozystenaktivierung beteiligt (Rappolee et al. 1988, Werb et al. 1990, Dardik & Schultz 1991, Hemmings et al. 1992). In Anwesenheit von TGF $\alpha$  entwickelt sich ein größerer Anteil von 2-Zell-Embryonen zu Blastozysten, wobei diese auch eine im Vergleich zu Kontrollgruppen erhöhte Zellzahl haben (Paria et al. 1990, 1991). Neben der Blastozystenexpansion kann TGF $\alpha$  auch die gerichtete Sekretion von Proteinen entweder ins Blastocoel oder ins Kulturmedium stimulieren (Dardik et al. 1991, 1993). Weiterhin fördert es die Aufnahme von Aminosäuren durch die innere Zellmasse und scheint an der Proliferation und Differenzierung von Embryo- und Trophoblast beteiligt zu sein (Dardik & Schultz 1991). In diesem Zusammenhang beobachteten auch andere Gruppen, daß in Präimplantationsembryonen der Maus eine TGF $\alpha$ -Behandlung zu Veränderungen der Genexpression und Proteinsynthese führt. Es kommt zur vermehrten Bildung von DNA-Polymerase  $\alpha$ , von der angenommen wird, daß sie das Hauptenzym ist, welches für die chromosomale DNA-Replikation im Nukleus verantwortlich ist (Babalola & Schultz 1995). Auch in Embryonen von Rind, Schwein und Schaf konnten entsprechende Transkripte während der Embryonalentwicklung detektiert werden (Watson et al. 1992, 1994, Freemark & Comer 1987, Kliem et al. 1998), und auch hier bestehen Unterschiede im Hinblick auf die Expression. So kommt TGF $\alpha$  im Schwein ausschließlich im Trophoblasten elongierter Blastozysten vor, während er beim Rind nur vor der Elongation und nur in endodermalen Zellen zu finden ist (Kliem et al. 1998a,b).

Im Uterus zeigten Untersuchungen an der Maus TGF $\alpha$  im luminalen Epithel und dezidualisierenden Stroma während des Implantationsprozesses und im Epithel der Interimplantationsbereiche (Paria et al. 1994b, Tamada et al. 1991). In pseudogravidem Uteri wurde TGF $\alpha$  nur vor der Anheftung an Tag 4, nicht jedoch mehr ab Tag 5 detektiert (Paria et al. 1994b). Bei der Ratte wurde TGF $\alpha$  immunhistochemisch in Stromazellen des antimesometrialen Bereiches, jedoch nicht im mesometrialen Bereich detektiert (Bonvissuto et al. 1992). Auch Han et al. wiesen mRNA erstmals an Tag 7, d.h. 2 Tage

nach der Implantation des Embryos, in Deziduazellen der Ratte nach (Han et al. 1987). Die Expression war besonders in unmittelbarer Nähe des implantierenden Embryos hoch und verringerte sich allmählich zum Myometrium hin. In den interplazentaren Bereichen und im nicht-graviden Uterus wurde dagegen nur wenig mRNA detektiert (Han et al. 1987, 1988). Bonvissuto et al. (1992) fanden TGF $\alpha$  auch in der Dezidua pseudogravidier Tiere, wobei das zeitliche Schema dem einer normalen Gravidität entsprach. In Präimplantationsembryonen wurden keine bzw. nur sehr wenig mRNA-Transkripte gefunden (Han et al. 1987, 1988), dagegen jedoch in Postimplantationsembryonen am Tag 8-10 (Lee et al. 1985). TGF $\alpha$  wurde auch beim Menschen im Endometrium, in der reifen Plazenta sowie im Urin schwangerer Frauen gefunden (Twardzik et al. 1982, Stromberg et al. 1982, Giudice & Saleh 1995).

Während der Implantation scheint auch die membranständige Precursor-Form von Bedeutung zu sein. Pro-TGF $\alpha$ , das auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert wird, kann an erbB1 von benachbarten Zellen binden und dadurch Zelladhäsion, Rezeptorautophosphorylierung und Signaltransduktion sowie Mitogenese bewirken (Anklesaria et al. 1990, Brachmann et al. 1989, Wong et al. 1989). TGF $\alpha$  wird zunächst überwiegend als membranständige Form auf dem Oberflächenepithel des humanen Endometriums exprimiert wird. Zum Zeitpunkt der Implantation jedoch nimmt die Konzentration des Precursors ab, wahrscheinlich durch seine Prozessierung zur löslichen Form (Hansard et al. 1997). Daraus ergibt sich die Möglichkeit der parakrinen Wechselwirkung zwischen dem uterinen pro-TGF $\alpha$  und dem erbB1-Rezeptor bei der Initiation der Implantation. Es ist wahrscheinlich, daß die wechselseitige Kommunikation zwischen Embryo und Mutter zumindest teilweise durch die Bindung von membranverankerten embryonalen TGF $\alpha$  an maternale erbB1-Rezeptoren stattfindet. Wenn der Kontakt erst einmal hergestellt ist, können alle Zellen mit entsprechenden Rezeptoren entweder auf die lösliche oder die membrangebundene TGF $\alpha$ -Form reagieren und die schnelle Proliferation von Zellen der Dezidua und des Trophoblasten stimulieren, um eine erfolgreiche Implantation zu gewährleisten.

Ebenso wie EGF und TGF $\alpha$  übernimmt auch HB-EGF wichtige Funktionen während der Gravidität. Es stimuliert die Entwicklung von Blastozysten, die Blastozystenexpansion, das Zonaschlüpfen und das Trophoblastwachstum (Das et al. 1994, Raab et al. 1996, Chia et al. 1995, Martin et al. 1998). In den untersuchten Geweben des Kaninchen konnte ein Transkript für HB-EGF nur nach Reamplifikation des primären PCR-Produktes nachgewiesen werden. Dagegen wurde es im Uterus von Ratte, Maus und Schwein

gefunden (Zhang et al. 1994, Das et al. 1994b, Raab et al. 1996, Kim et al. 1995). Im humanen und murinen Endometrium ist die HB-EGF-Expression räumlich und zeitlich eng reguliert. Bei der Maus wird die mRNA nur wenige Stunden (6-7h) vor der uterinen Implantation im luminalen Uterusepithel ausschließlich an der Blastozystenappositionstelle detektiert (Paria et al. 1999; Das et al. 1994b, Raab et al. 1996). HB-EGF wird nicht in pseudograviden Tieren exprimiert und läßt daher eine durch die Blastozyste vermittelte Induktion der mRNA-Synthese vermuten (Das et al. 1994b). Auch wenn die Implantation in ovariectomierten Mäusen durch Progesterongaben künstlich verzögert wird, kann HB-EGF nicht detektiert werden (Das et al. 1994). Nach Aufheben dieses künstlichen Ruhezustandes der Blastozyste durch Östrogengabe wird die Expression jedoch wieder induziert. Scheinbar erfordert die Expression von HB-EGF zumindest bei der Maus die Wechselwirkung zwischen der aktiven Blastozyste und einem rezeptiven Uterus. Das epitheliale HB-EGF scheint mit dem erbB1 der Blastozyste auf parakrine/juxtakrine Weise zu reagieren (Das et al. 1994b, Raab et al. 1996).

Beim Menschen wird HB-EGF sowohl im nicht-graviden Endometrium als auch zu allen Zeitpunkten der Schwangerschaft gefunden (Birdsall et al. 1996, Yoo et al. 1997). Die Expression des HB-EGF-Proteins steigt während der späten proliferativen Phase an und nimmt dann in der frühen sekretorischen Phase wieder ab. Im Gegensatz dazu akkumuliert das Protein in den luminalen Epithelzellen, den Drüsenzellen und im Endothel der Blutgefäße zwischen der Zyklusmitte und dem 20. Zyklustag. Gegen Ende des Zyklus nimmt die HB-EGF-Expression dramatisch ab. Während der frühen Schwangerschaft wird eine Immunfärbung für HB-EGF in der Dezidua sowie in villösen und extravillösen Trophoblastzellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß HB-EGF die Implantation und Trophoblastinvasion durch para- und autokrine Signale fördert (Leach et al. 1999, Yoo et al. 1997).

Im Uterus des Schweins wird ebenfalls HB-EGF exprimiert (Kim et al. 1995, Kliem et al. 1998). Es wird auch im Endometrium und der Uterusspülflüssigkeit nicht-gravider Tiere gefunden (Kim et al. 1995). Die Hauptquelle des sezernierten HB-EGF ist das luminale Epithel, obwohl auch eine Expression in Zellen des Stromas und der Drüsen während der Schwangerschaft nicht ausgeschlossen wird. Im Gegensatz dazu konnten Kennedy et al. (1994) mittels RT-PCR jedoch keine Transkripte für HB-EGF im Endometrium des Schweins nachweisen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten mit der einfachen RT-PCR keine Transkripte für HB-EGF im Uterus des Kaninchens amplifiziert werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die Vielzahl unterschiedlicher Spliceprodukte sein, die von diesem Wachstumsfaktor bekannt sind (Higashiyama 1991,

1992, Loukianov et al. 1997), so daß die Primer nicht immer entsprechende Hybridisierungsmöglichkeiten finden.

Die Tatsache, daß die Expression von HB-EGF im Endometrium unmittelbar vor der Implantation zunimmt und besonders während der frühen Plazentation große Mengen an mRNA vorhanden sind, läßt vermuten, daß HB-EGF auch während der Proliferation von Stromazellen, der Dezidualisierung und Plazentaentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Yoo et al. 1997, Das et al. 1994b). Bei Ratten führte die intraluminale Injektion eines anti-HB-EGF-Antiserums in die Uterushörner am Tag 5 p.c. zur Verminderung der Anzahl an Implantationsstellen an Tag 6 p.c., während die intraluminale Injektion einer HB-EGF-Lösung in die Uterushörner bei etwa der Hälfte der ovariectomisierten und Progesteron-behandelten Ratten eine Implantation induzierte. Dabei nahm die Anzahl der Implantationsstellen pro Tier mit steigender Konzentration zu. Diese Ergebnisse zeigen, daß HB-EGF an der Präimplantationsentwicklung des Embryos und der Initiierung der Implantation bei der Ratte beteiligt ist (Tamada et al. 1999)

Für die Funktion von HB-EGF ist das Vorhandensein von Heparin oder intakten Zelloberflächen-Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) notwendig, die die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor modulieren (Besner et al. 1992, Higashiyama et al. 1993, Aviezer et al. 1994, Cook et al. 1995). HSPG-Moleküle wurden auf der Oberfläche von Trophoblastzellen und dem Uterusepithel gefunden (Raboudi et al. 1992, Carson et al. 1993). Ihr Vorhandensein auf den Trophoblastzellen ist für die Anheftungsfähigkeit der Blastozyste wichtig (Carson et al. 1993). Man nimmt an, daß HB-EGF zuerst an diese HSPG-Moleküle bindet, auf diese Weise die Adhäsion initiiert und anschließend mit dem erbB1-Rezeptor des Trophoblasten reagiert, um weitere Signale zwischen Embryo und Mutter während der Implantation zu ermöglichen (Das et al. 1994, Raab et al. 1996). Diese könnten die entwicklungsabhängige Regulierung von Integrinen, die an der Blastozystenanhftung und der Trophoblastinvasion beteiligt sind, beinhalten (Aplin 1991, Damsky et al. 1992). Für Tumorzellen wurde bereits gezeigt, daß HB-EGF die Adhäsionsfähigkeit durch die Hochregulierung der Expression von Integrinen erhöht (Narita et al. 1996, Sato et al. 1996). Da ebenso wie beim TGF $\alpha$  sowohl der sezernierte als auch der membrangebundene Wachstumsfaktor biologisch aktiv ist (Higashiyama et al. 1995), geht ein anderes Modell davon aus, daß allein die membranständige Precursor-Form von HB-EGF ausreichend ist, um die Adhäsion von Zellen des Uterus mit der Blastozyste durch Wechselwirkung mit deren HSPG und erbB1 zu bewirken.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Wachstumsfaktoren der EGF-Familie und ihre Rezeptoren erbB1-4 haben eine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung und werden zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und verschiedenen Geweben und Zellen exprimiert. Die erbB-Rezeptoren gehören zu einer Klasse von Wachstumsfaktorrezeptoren mit Strukturgleichheiten, die membrangebundene Tyrosinkinasen darstellen. Durch Liganden-induzierte Bildung von Homo- oder Heterodimeren werden über diese Tyrosinkinasen intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die viele für die Embryonalentwicklung typische Zellfunktionen wie Proliferation, Migration und Differenzierung beeinflussen. Durch Rezeptor-Interaktionen bildet die erbB-Familie ein Netzwerk, welches verschiedenste biologische Signale auslösen kann. Eine große Familie EGF-verwandter Peptide dient als Liganden für die erbB-Rezeptoren. Diese werden als membrangebundene Vorläufermoleküle gebildet, welche an der Zelloberfläche akkumulieren oder durch proteolytische Spaltung die löslichen Formen freisetzen.

In dieser Arbeit wurden die Rezeptoren erbB1-4 und die drei Liganden EGF, HB-EGF und TGF $\alpha$  im Uterusgewebe der Prä- bis Postimplantationsperiode (Tag 3 bis 14) sowie in 6 Tage alten Blastozysten und 14 Tage alten Feten untersucht.

Mittels nested RT-PCR wurden zunächst Teilsequenzen für die Transkripte von erbB1-4 und ihrer Liganden EGF, HB-EGF und TGF $\alpha$  ermittelt und hinsichtlich ihrer Homologie zu bereits bekannten Sequenzen anderer Spezies beurteilt. Diese Sequenzen wurden dann genutzt, um für das Kaninchen spezifische Primer zu synthetisieren. Alle für das Kaninchen ermittelten cDNA-Rezeptor- und Ligandenteilsequenzen weisen hohe Homologien zu anderen Spezies auf, was auf eine evolutionär konservierte Funktion der klonierten Proteinbereiche hindeutet. Die Sequenzen der erbB-Rezeptoren liegen in den ersten 3 Subdomänen des extrazellulären Bereiches. Sie verfügen auch untereinander über relativ homologe Bereiche, was die Entstehung aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül vermuten läßt. Zwischen den einzelnen Liganden bestehen dagegen nur geringe Homologien. Hierin könnte die Ursache für unterschiedliche Funktionen bzw. Signalstärken und unterschiedliche Bindungsaffinitäten liegen. Durch die Lage der ermittelten Rezeptorteilsequenzen im extrazellulären Bereich kann nicht zwischen full-length und trunkierten Formen unterschieden werden. Auch bei den Liganden ist eine Differenzierung zwischen membranständigem Vorläufermolekül und löslicher Form nicht möglich, da der in der Arbeit sequenzierte Bereich in beiden Formen enthalten ist.

Die Rezeptoren erbB1-3 konnten beim Kaninchen mittels RT-PCR sowohl im Uterus der Präimplantationsphase vom 3. bis 6. Tag als auch im Uterus der Implantations- und

Postimplantationsphase vom 7. bis 14. Tag nachgewiesen werden. In den späten Stadien werden Transkripte in den Uterusabschnitten der Implantationskammern und der dazwischenliegenden interplazentaren Uterusabschnitte gefunden. Entsprechende Fragmente können auch in 6 Tage alten Blastozysten und in 14 Tage alten Feten amplifiziert werden. Sie scheinen somit für Wachstum und Entwicklung von Embryo und Uterus während der Gravidität des Kaninchens von Bedeutung zu sein.

ErbB4 wird im Kaninchenuterus während der Prä- und Implantationsperiode schwächer exprimiert als in der Postimplantationsperiode. Es findet sich auch nur eine schwache Expression in 6 Tage alten Blastozysten, wohingegen es in 14 Tage alten Feten deutlich amplifiziert werden kann. Möglicherweise ist erbB4 während der Periimplantationsperiode nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und gewinnt erst in der Postimplantationsperiode zunehmend an Bedeutung.

Transkripte der Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  werden im Uterus des Kaninchen während der Peri- und Postimplantationsperiode sowie in 6 Tage alten Blastozysten und 14 Tage alten Feten gefunden. HB-EGF scheint für die Entwicklungsprozesse während der Gravidität des Kaninchen dagegen weniger essentiell zu sein und nur in geringem Maße exprimiert zu werden. Sein Transkript konnte mittels RT-PCR nur nach Reamplifikation primärer PCR-Produkte in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden.

Die Expression von erbB-Rezeptoren und ihrer Liganden im graviden Uterus ist unabhängig von der Anwesenheit des Konzeptus, da Transkripte auch in verschiedenen Pseudograviditätsstadien gefunden wurden. Ihr Vorhandensein im uterinen Gewebe während der Implantation und Plazentation weist auf eine funktionelle Bedeutung für fetomaternalen Interaktionen in dieser Entwicklungsphase hin. Ihre entwicklungsabhängige Expression, die Bindung der Wachstumsfaktoren durch Trophoblast- und Embryoblastzellen sowie die Stimulation der embryonalen Zellproliferation, Proteinsynthese und Blastozystenexpansion sprechen für eine spezifische Funktion der Wachstumsfaktoren und ihrer Liganden bei der Regulation der frühen Embryonalentwicklung und der Implantation auch beim Kaninchen.

## 6. Literatur

- Abraham JA, Damm D, Bajardi A, Miller J, Klagsbrun M, Ezekowitz RA (1993): Heparin-binding EGF-like growth factor: characterization of rat and mouse cDNA clones, protein domain conservation across species, and transcript expression in tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 190(1):125-33
- Adamson ED (1990): EGF receptor activities in mammalian development. *Mol Reprod Dev* 27(1):16-22
- Adamson ED, Meek J (1984): The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development. *Dev Biol.* 103(1):62-70.
- Adamson ED, Wiley LM (1997): The EGFR gene family in embryonic cell activities. *Curr Top Dev Biol* 35:71-120
- Alimandi M, Wang LM, Bottaro D, Lee CC, Kuo A, Frankel M, Fedi P, Tang C, Lippman M, Pierce JH (1997): Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *EMBO J* 16(18):5608-17
- Alroy I, Yarden Y (1997): The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410(1):83-6
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403-10
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-402
- Amemiya K, Kurachi H, Adachi H, Morishige KI, Adachi K, Imai T, Miyake A (1994): Involvement of epidermal growth factor (EGF)/EGF receptor autocrine and paracrine mechanism in human trophoblast cells: functional differentiation in vitro. *J Endocrinol* 143(2):291-301
- Anderson TL, Olson GE, Hoffman LH (1986): Stage-specific alterations in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. *Biol Reprod.* 34(4):701-20.
- Anklesaria P, Teixeira J, Leihö M, Pierce J. H., Greenberger, J. S., Massagué, J (1990). Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3289-3293
- Aplin JD (1991): Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99 ( Pt 4):681-92
- Arellano RO, Miledi R (1993): Novel Cl<sup>-</sup> currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 102(5):833-57
- Aviezer D, Yayon A (1994): Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25):12173-7
- Avivi A, Lax I, Ullrich A, Schlessinger J, Givol D, Morse B (1991): Comparison of EGF receptor sequences as a guide to study the ligand binding site. *Oncogene* 6(4):673-6.
- Babalola GO, Schultz RM (1995): Modulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo by TGF-alpha and TGF-beta. *Mol Reprod Dev* 41(2):133-9
- Bany BM, Schultz GA, Kennedy TG (1999): Regulation of cytosolic phospholipase A2 in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor. *Mol Reprod Dev* 52(4):335-40
- Bany BM, Zhang X, Kennedy TG (1998): Regulation of plasminogen activator in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor. *Mol Reprod Dev* 50(1):63-9
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA (1986): The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319(6050):226-30
- Barnea ER, Feldman D, Kaplan M, Morrish DW (1990): The dual effect of epidermal growth factor upon human chorionic gonadotropin secretion by the first trimester placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 71(4):923-8
- Baron AT, Huntley BK, Lafky JM, Reiter JL, Liebenow J, McCormick DJ, Ziesmer SC, Roche PC, Mailhe NJ (1997): Monoclonal antibodies specific for peptide epitopes of the epidermal growth factor receptor's extracellular domain. *Hybridoma* 16(3):259-71.
- Barrandon Y, Green H (1987): Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50(7):1131-7

- Basu A, Raghunath M, Bishayee S, Das M (1989): Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol Cell Biol* 9(2):671-7
- Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cood K, Chen X, Yarden Y, Hynes N. E (1995): Neu Differentiation factor activation of erbB-3 and erbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for erbB-2. *Molecular and Cellular Biology* 15: 6496-6505
- Beerli RR, Hynes NE (1996): Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of erbB receptors and differ in their biological activities. *Journal of Biological Chemistry* 271: 6071-6076
- Beguinot L, Lyall RM, Willingham MC, Pastan I (1984): Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(8):2384-8
- Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper JH, Sachs M, Arakaki N, Daikuhara Y, Birchmeier W (1991): The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *EXS* 59:109-26
- Beier HM (1974): Oviducal and uterine fluids. *J Reprod Fertil* 37(1):221-37
- Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R (1986): Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res* 14(21):8427-46
- Berkowitz EA, Seroogy KB, Schroeder JA, Russell WE, Evans EP, Riedel RF, Phillips HK, Harrison CA, Lee DC, Luetkeke NC (1996): Characterization of the mouse transforming growth factor alpha gene: its expression during eyelid development and in waved 1 tissues. *Cell Growth Differ* 7(9):1271-82
- Besner GE, Whelton D, Crissman-Combs MA, Steffen CL, Kim GY, Brigstock DR (1992): Interaction of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) with the epidermal growth factor receptor: modulation by heparin, heparinase, or synthetic heparin-binding HB-EGF fragments. *Growth Factors* 7(4):289-96
- Birchmeier W, Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper J (1991): Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* 3(5):832-40
- Birdsall MA, Hopkisson JF, Grant KE, Barlow DH, Mardon HJ (1996): Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium. *Hum Reprod* 2(1):31-4
- Blasband AJ, Rogers KT, Chen X., Azizkhan JC, Lee DC (1990): Characterization of the rat transforming growth factor alpha gene and identification of promoter sequences. *Mol. and Cell. Biol.* 10: 2111-2121
- Bonaccorsi G, Pansini F, Segala V, Bagni B, Bergamini CM, Mollica G (1989): Modification of number and of affinity of endometrial EGF receptors during the menstrual cycle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 33(2):177-82
- Bonvissuto AC, Lala PK, Kennedy TG, Nygard K, Lee DC, Han VK (1992): Induction of transforming growth factor-alpha gene expression in rat decidua is independent of the conceptus. *Biol Reprod* 46(4):607-16
- Brachmann R, Lindquist PB, Nagashima M, Kohr W, Lipari T, Napier M, Derynck R (1989). Transmembrane TGFA precursors activate EGF/TGFA receptors. *Cell* 56: 691-700
- Breyer JA, Cohen S (1990): The epidermal growth factor precursor isolated from murine kidney membranes. Chemical characterization and biological properties. *J Biol Chem* 265(27):16564-70
- Brice EC, Wu JX, Muraro R, Adamson ED, Wiley LM (1993): Modulation of mouse preimplantation development by epidermal growth factor receptor antibodies, antisense RNA, and deoxyoligonucleotides. *Dev Genet* 14(3):174-84
- Bringman TS, Lindquist PB, Derynck R (1987): Different transforming growth factor-alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. *Cell.* 48(3):429-40.
- Britsch S, Li L, Kirchoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D (1998): The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12(12):1825-36
- Brown PI, Lam R, Lakshmanan J, Fisher DA (1990): Transforming growth factor alpha in developing rats. *Am J Physiol* 259(2 Pt 1):E256-60
- Browning JY, Keyes PL, Wolf RC (1980): Comparison of serum progesterone, 20 alpha-dihydroprogesterone, and estradiol-17 beta in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 23(5):1014-9

- Brucker C, Alexander NJ, Hodgen GD, Sandow BA (1991): Transforming growth factor-alpha augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 28(1):94-8
- Burden S, Yarden Y (1997): Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18(6):847-55
- Burgess AW, Lloyd CJ, Smith S, Stanley E, Walker F, Fabri L, Simpson RJ, Nice EC (1988): Murine epidermal growth factor: structure and function. *Biochemistry* 27(14):4977-85
- Burke CL, Stern DF (1998): Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol.* 18(9):5371-9.
- Buyalos RP, Cai X (1994): Preimplantation embryo development enhanced by epidermal growth factor. *J Assist Reprod Genet* 11(1):33-7
- Canoll PD, Musacchio JM, Hardy R, Reynolds R, Marchionni MA, Salzer JL (1996): GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron* 17(2):229-43
- Carpenter G, Cohen S (1990). Epidermal growth factor. *J of Biol Chem* 265: 7709-7712;
- Carpenter G, Wahl MI (1990). The epidermal growth factor family. In: Sporn, M.B.; Roberts, A.B., eds. *Peptide growth factors and their receptors I*. Berlin, Heidelberg: Springer; p. 69-133.
- Carraway KL 3rd, Cantley LC (1994). A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78: 5-8 ;
- Carraway KL 3rd, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C (1997): Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387(6632):512-6
- Carson DD, Tang JP, Julian J (1993): Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev Biol* 155(1):97-106
- Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK (1996): Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 16(2):107-22
- Chang H, Riese DJ 2nd, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ (1997): Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387(6632):509-12
- Chantry A (1995): The kinase domain and membrane localization determine intracellular interactions between epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*;270(7):3068-73
- Chegini N, Rao CV, Wakim N, Sanfilippo J (1986): Binding of 125I-epidermal growth factor in human uterus. *Cell Tissue Res* 246(3):543-8
- Chegini N, Rossi MJ, Materson BJ (1992). Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) and EGF and PDGF beta-receptors in human endometrial tissue: localisation and in vitro action. *Endocrinology* 130: 2373-2385
- Chia CM, Winston RM, Handyside AH (1995): EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development* 121(2):299-307
- Cohen S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J. Biol. Chem.* 237: 1555-1562
- Cohen S, Fava RA, Sawyer ST (1982): Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(20):6237-41
- Cook PW, Damm D, Garrick BL, Wood KM, Karkaria CE, Higashiyama S, Klagsbrun M, Abraham JA (1995): Carboxyl-terminal truncation of leucine76 converts heparin-binding EGF-like growth factor from a heparin-enhancible to a heparin-suppressible growth factor. *J Cell Physiol* 163(2):407-17
- Corps AN, Brigstock DR, Littlewood CJ, Brown KD (1990): Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on preimplantation trophoderm of the pig. *Development* 110(1):221-7
- Coskun S, Lin YC (1995): Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 42(3):311-7
- Coussens L, Yang-Feng TL, Chen Y-C LE, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homolgy to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230: 1132-1139
- Crane LH, Martin L (1991): In vivo myometrial activity during early pregnancy and pseudopregnancy in the rat. *Reprod Fertil Dev* 3(3):233-44

- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ (1994): Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266(5190):1508-18
- Dadabay CY, Patton E, Cooper JA, Pike LJ (1991): Lack of correlation between changes in polyphosphoinositide levels and actin/gelsolin complexes in A431 cells treated with epidermal growth factor. *J Cell Biol* 112(6):1151-6
- Dai D, Ogle TF (1995): Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 61(1):326-32
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ (1992): Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest*;89(1):210-22
- Dardik A, Doherty AS, Schultz RM (1993): Protein secretion by the mouse blastocyst: stimulatory effect on secretion into the blastocoel by transforming growth factor-alpha. *Mol Reprod Dev* 34(4):396-401
- Dardik A, Schultz R (1991). Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF alpha and EGF. *Development* 113: 919-930
- Dardik A, Smith RM, Schultz RM (1992): Colocalization of transforming growth factor-alpha and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 154(2):396-409
- Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey SK (1994a): Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. *Endocrinology* 134(2):971-81
- Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, Dey SK (1994b): Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120(5):1071-83
- Davies J, Hoffman LH (1973): Studies on the progestational endometrium of the rabbit. I. Light microscopy, day 0 to day 13 of gonadotrophin-induced pseudopregnancy. *Am J Anat* 137(4):423-45
- Davis CG (1990): The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* 2(5):410-9
- De Larco JE, Tadaro GJ (1978): A human fibrosarcoma cell line producing multiplication stimulating activity(MSA)-related peptides. *Nature*. 272(5651):356-8.
- Defize LH, de Laat SW (1986;): Structural and functional aspects of epidermal growth factor (EGF) and its receptor. *Prog Brain Res* 69:169-82
- Denker H-W (1995). Cell biological views of embryo implantation (a review). *Tr. J. of Medical Sciences Suppl.*: 1-12
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV (1984): Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 38(1):287-97
- Dey SK, Johnson DC (1986): Embryonic signals in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 476:49-62
- Di Augustine RP, Petrusz P, Bell GI, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA, Teng CT (1988): Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 122(6):2355-63
- Ding J, Foxcroft GR (1994): Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol Reprod Dev* 39(1):30-40
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR (1995): Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15(3):585-96
- D'souza B, Taylor-Papadimitriou J (1994): Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15):7202-6
- Elenius K, Paul S, Allison G, Sun J, Klagsbrun M (1997): Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J* 16(6):1268-78
- Enders AC, Schlafke S (1971): Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *Am J Anat* 132(2):219-30
- Fantl WJ, Escobedo JA, Martin GA, Turck CW, del Rosario M, McCormick F, Williams LT (1992): Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different signaling

- pathways. *Cell* 69(3):413-23
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT (1993): Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 62:453-81
- Fedi P, Pierce JH, di Fiore PP, Kraus MH (1994): Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 14(1):492-500
- Fen Z, Dhadly MS, Yoshizumi M, Hilkert RJ, Quertermous T, Eddy RL, Shows TB, Lee ME (1993): Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding the human heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/diphtheria toxin receptor. *Biochemistry* 32(31):7932-8
- Fischer B (1989): Effects of asynchrony on rabbit blastocyst development. *J Reprod Fertil* 86(2):479-91
- Fischer B, Mootz U, Denker HW, Lambertz M, Beier HM (1991): The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. III. Transformation of coverings under non-physiological developmental conditions. *Anat Embryol (Berl)* 183(1):17-27
- Fischer B, Rose-Hellekant TA, Sheffield LG, Bertics PJ, Bavister BD (1994): Binding of EGF and TGF $\alpha$  in mammalian preimplantation embryos. *Theriogenology* 41: 879-887
- Fischer B, Schumacher A, Hegele-Hartung C, Beier HM (1988): Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. *Fertil Steril* 50(6):938-44
- Fleming TP, Johnson MH (1988): From egg to epithelium. *Annu Rev Cell Biol* 4:459-85
- Flickinger TW, Mailhe NJ, Kung HJ (1992): An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. *Mol Cell Biol* 12(2):883-93
- Fondacci C, Alsat E, Gabriel R, Blot P, Nessmann C, Evain-Brion D (1994): Alterations of human placental epidermal growth factor receptor in intrauterine growth retardation. *J Clin Invest* 93(3):1149-55
- Freemark M, Comer M (1987): Epidermal growth factor (EGF)-like transforming growth factor (TGF) activity and EGF receptors in ovine fetal tissues: possible role for TGF in ovine fetal development. *Pediatr Res* 22(5):609-15
- Galway AB, Oikawa M, Ny T, Hsueh AJ (1989): Epidermal growth factor stimulates tissue plasminogen activator activity and messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells: mediation by pathways independent of protein kinases-A and -C. *Endocrinology* 125(1):126-35
- Gamett DC, Pearson G, Cerione RA, Friedberg I (1997): Secondary dimerization between members of the epidermal growth factor receptor family. *J Biol Chem* 272(18):12052-6
- Gardner RM, Lingham RB, Stancel GM (1987): Contractions of the isolated uterus stimulated by epidermal growth factor. *FASEB J* 1(3):224-8
- Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G (1995): Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378(6555):390-4
- Gharib-Hamrouche N, Chêne N, Guillomot M, Martal J (1993). Localization and characterization of EGF/TGF- $\alpha$  receptors on peri-implantation trophoblast in sheep. *J. Reprod. Fert.* 98: 385-392
- Gharib-Hamrouche N, Chêne N, Martal J (1995): Comparative expression of TGF $\alpha$  and EGF genes in the ovine conceptus and uterine endometrium in the peri-implantation period. *Reprod Nutr Dev* 34: 291-303
- Giudice L, Saleh W (1995): Growth factors in reproduction. *TEM* 6(2): 60-69
- Goldenring JR, Tsunoda Y, Stoch SA, Coffey RJ, Modlin IM (1993): Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) inhibition of parietal cell secretion: structural requirements for activity. *Regul Pept* 22;43(1-2):37-47
- Goldman S, Dirnfeld M, Koifman M, Gonen Y, Lissak A, Abramovici H (1993). The effect of epidermal growth factor on growth and differentiation of mouse preimplantation embryos in vitro. *Human Reproduction* 8: 1459-1462
- Goldman S, G. Y (1998). Monoclonal antibodies against epidermal growth factor prevent outgrowth of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod* 13: 2231-3
- Graham CH, Lala PK (1991): Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol* 148(2):228-34
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997): ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16(7):1647-55

- Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE (1995): Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 15(3):1182-91
- Gray A, Dull TJ, Ullrich A (1983). Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303: 722-725
- Gross I, Dynia DW, Rooney SA, Smart DA, Warshaw JB, Sissom JF, Hoath SB (1986): Influence of epidermal growth factor on fetal rat lung development in vitro. *Pediatr Res* 20(5):473-7
- Gruppen CG, Nagashima H, Nottle MB (1997): Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development in vitro. *Reprod Fertil* 9(6):571-5
- Gupta A, Huet YM, Dey SK (1989): Evidence for prostaglandins and leukotrienes as mediators of phase I of estrogen action in implantation in the mouse. *Endocrinology* 124(1):546-8
- Haining RE, Schofield JP, Jones DS, Rajput-Williams J, Smith SK (1991): Identification of mRNA for epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha present in low copy number in human endometrium and decidua using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Mol Endocrinol* 6(3):207-14
- Han VK, D'Ercole AJ, Lee DC (1988): Expression of transforming growth factor alpha during development. *Can J Physiol Pharmacol* 66(8):1113-21
- Han VK, Hunter ES 3d, Pratt RM, Zendegui JG, Lee DC (1987): Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal decidua. *Mol Cell Biol* 7(7):2335-43
- Hanks SK, Quinn AM (1991): Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200:38-62
- Hansard LJ, Healy-Gardner BE, Drapkin AT, Bentley RC, McLachlan JA, Walmer DK (1997): Human endometrial transforming growth factor-alpha: a transmembrane, surface epithelial protein that transiently disappears during the midsecretory phase of the menstrual cycle. *J Soc Gynecol Investig* 4(3):160-6
- Harding PA, Brigstock DR, Shen L, Crissman-Combs MA, Besner GE (1996): Characterization of the gene encoding murine heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *Gene* 169(2):291-2
- Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA (1995): Roles of growth factors during peri-implantation development. *Hum Reprod* 10(3):712-8
- Heisermann GJ, Gill GN (1988): Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo. *Biol Chem* 263(26):13152-8
- Hellyer NJ, Kim H-H, Greaves CH, Sierke SL, Koland JG (1995). Cloning of the rat erbB3 cDNA and characterization of the recombinant protein. *Gene* 165: 279-284
- Hemmings R, Langlais J, Falcone T, Granger L, Miron P, Guyda H (1992): Human embryos produce transforming growth factors alpha activity and insulin-like growth factors II. *Fertil Steril* 58(1):101-4
- Heyner S, Wiley LM, eds.(1990): Early embryo development and paracrine relationships. New York: Alan R. Liss
- Higashiyama S, Abraham J, Klagsbrunn M (1993). Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J. Cell Biol.* 122: 933-940
- Higashiyama S, Abraham J, Miller J, Fiddes J C, Klagsbrunn M (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251: 936-939
- Higashiyama S, Iwamoto R, Goishi K, Raab G, Taniguchi N, Klagsbrunn M, Mekada E (1995): The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol* 128(5):929-38
- Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham J, Klagsbrunn M (1992). Structure of Heparine-binding EGF-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 267: 6205-6212
- Hoffman LH, DiPietro DL, McKenna TJ (1978): Effects of indomethacin on uterine capillary permeability and blastocyst development in rabbits. *Prostaglandins* 15(5):823-8
- Hoffman LH, Winfrey VP, Hoos PC (1990): Sites of endometrial vascular leakage during implantation in the rabbit. *Anat Rec* 227(1):47-61
- Hofmann GE, Anderson TL (1990): Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor during implantation in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):837-41

- Hofmann GE, Scott RT Jr, Bergh PA, Deligdisch L (1991): Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73(4):882-7
- Honegger AM, Szapary D, Schmidt A, Lyall R, van Obberghen E, Dull TJ, Ullrich A, Schlessinger J (1987). A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis. *Mol and Cell Biology* 7: 4568-4571
- Hoos PC, Hoffman LH (1980): Temporal aspects of rabbit uterine vascular and decidual responses to blastocyst stimulation. *Biol Reprod* 23(2):453-9
- Hoos PC, Hoffman LH (1983): Effect of histamine receptor antagonists and indomethacin on implantation in the rabbit. *Biol Reprod* 29(4):833-840
- Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994): Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127(5):1375-80
- Huang GC, Ouyang X, Epstein RJ (1998): Proxy activation of protein ErbB2 by heterologous ligands implies a heterotetrameric mode of receptor tyrosine kinase interaction. *Biochem J* 331 ( Pt 1):113-9
- Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK (1989): Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 125(3):1683-90
- Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK (1990): Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 4(3):510-23
- Hunter T, Ling N, Cooper JA (1984): Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* 311(5985):480-3
- Hynes NE, Stern DF (1994): The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198(2-3):165-84
- Ilekis JV, Gariti J, Niederberger C, Scoccia B (1997): Expression of a truncated epidermal growth factor receptor-like protein (TEGFR) in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 65(1):36-41
- Ilekis JV, Stark BC, Scoccia B (1995): Possible role of variant RNA transcripts in the regulation of epidermal growth factor receptor expression in human placenta. *Mol Reprod Dev* 41(2):149-56
- Irwin JC, Utian WH, Eckert RL (1991): Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129(5):2385-92
- Ishihara S, Taketani Y, Mizuno M (1991): EGF rapidly stimulates tyrosine phosphorylation in cultured endometrial cells. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 17(4):363-7
- Jakowlew SB, Kondaiah P, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB (1988): A novel low molecular weight ribonucleic acid (RNA) related to transforming growth factor alpha messenger RNA. *Mol Endocrinol* 2(11):1056-63
- Jensen PJ, Rodeck U (1993): Autocrine/paracrine regulation of keratinocyte urokinase plasminogen activator through the TGF-alpha/EGF receptor. *J Cell Physiol* 155(2):333-9
- Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT (1990): TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61(6):1137-46
- Joergensen,P.E., Jensen,L.G., Soerensen,B.S., Poulsen,S.S. and Nexoe,E. (1998): The pig epidermal growth factor precursor contains segments which are highly conserved among species *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*
- Jokhi PP, King A, Loke YW (1994): Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine* 6(4):433-42
- Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX (1999): Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447(2-3):227-31
- Kainulainen V, Sundvall M, Maatta JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K (2000): A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinasemediates proliferation but not survival or chemotaxis.*J Biol Chem.* 275(12):8641-9
- Kamei Y, Tsutsumi O, Kuwabara Y, Taketani Y (1993): Intrauterine growth retardation and fetal losses are caused by epidermal growth factor deficiency in mice. *Am J Physiol* 264(3 Pt 2):R597-600
- Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK (1992): Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 46(2):208-19

- Karunagaran D.; Tzahar, E.; Beerli, R. R.; Chen, X.; Graus-Porta, D.; Ratzkin, B. J.; Seger, R.; Hynes, N. E.; Yarden, Y (1996). erbB2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO Journal* 15: 254-264
- Katoh M, Yazaki Y, Sugimura T, Terada M (1993). c-erbB3 Gene encodes secreted as well as transmembrane receptor tyrosine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 192: 1189-1197
- Kavanaugh WM, Williams LT (1994): An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 266(5192):1862-5
- Kawagoe K, Akiyama J, Kawamoto T, Morishita Y, Mori S (1990): Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor (EGF) receptors in normal human placental villi. *Placenta* 11(1):7-15
- Keefer CL, Stice SL, Matthews DL (1994): Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol Reprod*;50(4):935-9
- Kennedy TG, Brown KD, Vaughan TJ (1994): Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine oviduct and endometrium. *Biol Reprod* 50(4):751-6
- Kim GY, Besner GE, Steffen CL, McCarthy DW, Downing MT, Luquette MH, Abad MS, Brigstock DR (1995): Purification of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor from pig uterine luminal flushings, and its production by endometrial tissues. *Biol Reprod* 52(3):561-71
- Kimmerly, W., Bondoc, M., Cheng, J., Connolly, K.S., Gunning, K.M., Kadner, K., Miguel, T., Miller, C., Pitluck, S., Pollard, M., Rojeski, H., Subramanian, S. and Martin, C.H (1998): Homo sapiens chromosome 5, BAC clone 189n23 (LBNL H168), complete sequence. AC004634. Human Genome Center, DOE Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory, MS 74-157, Berkeley, CA 94720, USA
- Klapper LN, Vaisman N, Hurwitz E, Pinkas-Kramarski R, Yarden Y, Sela M (1997): A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to ErbB-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene* 14(17):2099-109
- Kliem A, Tetens F, Klonisch T, Grealy M, Fischer B (1986): Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1998 Dec;51(4):402-12
- Kliem A, Tetens F, Klonisch T, Grealy M, Fischer B (1998): Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 51(4):402-12
- Kliem A, Tetens F, Klonisch T, Grealy M, Fischer B (1998a): Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 51(4):402-12
- Kliem A, Tetens F, Niemann H, Fischer B (1998b): Only a truncated epidermal growth factor receptor protein is present in porcine endometrium. *Biol Reprod* 58(6):1367-71
- Kline TP, Brown FK, Brown SC, Jeffs PW, Kopple KD, Mueller L (1990): Solution structures of human transforming growth factor alpha derived from 1H NMR data. *Biochemistry* 29(34):7805-13
- Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H (1994): Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 100(2):439-46
- Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T (1991): SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252(5006):668-74
- Kohda D, Shimada I, Miyake T, Fuwa T, Inagaki F (1989): Polypeptide chain fold of human transforming growth factor alpha analogous to those of mouse and human epidermal growth factors as studied by two-dimensional 1H NMR. *Biochemistry* 28(3):953-8
- Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA (1995): Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1307-11
- Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, Morimoto S (1997): Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene*. 15(23):2841-8.
- Kramer R, Bucay N, Kane DJ, Martin LE, Tarpley JE, Theill LE (1996): Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10):4833-8
- Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA (1989): Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23):9193-7
- Kwatra MM, Bigner DD, Cohn JA (1992): The ligand binding domain of the epidermal growth factor

- receptor is not required for receptor dimerization. *Biochim Biophys Acta* 1134(2):178-81
- Larsen JF (1961). Electron microscopy of the implantation site in the rabbit. *American Journal of Anatomy* 109: 319-334
- Lax I, Johnson A, Howk R, Sap J, Bellot F, Winkler M, Ullrich A, Vennstrom B, Schlessinger J, Givol D (1988): Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha. *Mol Cell Biol* 8(5):1970-8
- Lazar E, Vicenzi E, Van Obberghen-Schilling E, Wolff B, Dalton S, Watanabe S, Sporn MB (1989): Transforming growth factor alpha: an aromatic side chain at position 38 is essential for biological activity. *Mol Cell Biol* 9(2):860-4
- Leach RE, Khalifa R, Ramirez ND, Das SK, Wang J, Dey SK, Romero R, Armant DR (1999): Multiple roles for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor are suggested by its cell-specific expression during the human endometrial cycle and early placentation. *J Clin Endocrinol Metab* 84(9):3355-63
- Lee DC, Fenton SE, Berkowitz EA, Hissong MA (1995): Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities. *Pharmacol Rev* 47(1):51-85
- Lee DC, Rochford R, Todaro GJ, Villarreal LP (1985): Developmental expression of rat transforming growth factor-alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 5(12):3644-6
- Lee K-F, Simon H, Chen H, Bates B, Hung M-C, Hauser C (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378: 394-398
- Legrand C, Banuelos-Nevarez A, Maltier JP (1989): Changes in electrical activity of myometrium during intrauterine distribution of rat blastocysts and after prazosin administration. *J Reprod Fertil* 86(1):39-49
- Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J (1997): Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16(2):281-94
- Levkowitz G, Klapper LN, Tzahar E, Freywald A, Sela M, Yarden Y (1996): Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF-receptor but not to other ErbB proteins. *Oncogene* 12(5):1117-25
- Lim H, Das SK, Dey SK (1998): erbB genes in the mouse uterus: cell-specific signaling by epidermal growth factor (EGF) family of growth factors during implantation. *Dev Biol* 204(1):97-110
- Lim H, Dey SK, Das SK (1997): Differential expression of the erbB2 gene in the periimplantation mouse uterus: potential mediator of signaling by epidermal growth factor-like growth factors. *Endocrinology* 138(3):1328-37
- Lin TH, Mukku VR, Verner G, Kirkland JL, Stancel GM (1988): Autoradiographic localization of epidermal growth factor receptors to all major uterine cell types. *Biol Reprod* 38(2):403-11
- Lofts FJ, Hurst HC, Sternberg MJ, Gullick WJ (1993): Specific short transmembrane sequences can inhibit transformation by the mutant neu growth factor receptor in vitro and in vivo. *Oncogene* 8(10):2813-20
- Loneragan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P (1996): Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 54(6):1420-9
- Loukianov E, Loukianova T, Wiedlocha A, Olsnes S (1997): Expression of mRNA for a short form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Gene* 195(1):81-6
- Luetkeke NC, Michalopoulos GK, Teixido J, Gilmore R, Massague J, Lee DC (1988): Characterization of high molecular weight transforming growth factor alpha produced by rat hepatocellular carcinoma cells. *Biochemistry* 27(17):6487-94
- Luetkeke NC, Phillips HK, Qiu TH, Copeland NG, Earp HS, Jenkins NA, Lee DC (1994): The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 8(4):399-413
- Luetkeke NC, Qiu TH, Peiffer RL, Oliver P, Smithies O, Lee DC (1993): TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73(2):263-78
- Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J (1996): Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383(6596):181-5
- Lytton FD, Poyser NL (1982): Prostaglandin production by the rabbit uterus and placenta in vitro. *J Reprod Fertil* 66(2):591-9
- Ma YJ, Costa ME, Ojeda SR (1994): Developmental expression of the genes encoding transforming growth factor alpha and its receptor in the hypothalamus of female rhesus macaques. *Neuroendocrinology*

- Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR (1993): Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73(2):249-61
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ (1984): Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 223(4640):1079-82
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR, Todaro GJ (1983): Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(15):4684-8
- Martin KL, Barlow DH, Sargent IL (1998): Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 13(6):1645-52
- Maruo T, Matsuo H, Murata K, Mochizuki M (1992): Gestational age-dependent dual action of epidermal growth factor on human placenta early in gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 75(5):1362-7
- Massagué J (1990). Transforming growth factor alpha. *J. Biol. Chem.* 265: 21393-21396
- Massagué J.; Pandiella, A (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 515-541
- Matsumoto K, Yamamoto T, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Homma H, Morishige K, Miyake A, Murata Y (1998): Human chorionic gonadotropin-alpha gene is transcriptionally activated by epidermal growth factor through cAMP response element in trophoblast cells. *J Biol Chem* 3;273(14):7800-6
- Merlino GT, Ishii S, Whang-Peng J, Knutsen T, Xu Y-H, Clark AJL, Stratton RH, Wilson RK, Ma DP, Roe BA, Hunts JH, Shimizu N, Pastan I (1985). Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNAs from A431 human carcinoma cells. *Mol. and Cell. Biol.* 5: 1722-1734
- Meyer D, Birchmeyer C (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378: 386-390
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R (1995): Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376(6538):337-41
- Miyauchi A, Momoeda M, Nakabayashi M, Osuga Y, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y (1995): Regulation of the plasminogen activator/plasmin system by epidermal growth factor in cultured human endometrial cells. *Hum Reprod* 10(12):3284-8
- Montelione GT, Winkler ME, Burton LE, Rinderknecht E, Sporn MB, Wagner G (1989): Sequence-specific 1H-NMR assignments and identification of two small antiparallel beta-sheets in the solution structure of recombinant human transforming growth factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 86(5):1519-23.
- Moolenaar WH, Bierman AJ, Tilly BC, Verlaan I, Defize LH, Honegger AM, Ullrich A, Schlessinger J (1988): A point mutation at the ATP-binding site of the EGF-receptor abolishes signal transduction. *EMBO J* 7(3):707-10
- Mukku VR, Stancel GM (1985). Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J of Biolog Chem* 260: 9820-9824
- Murali R, Brennan PJ, Kieber-Emmons T, Greene MI (1996): Structural analysis of p185c-neu and epidermal growth factor receptor tyrosine kinases: oligomerization of kinase domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13):6252-7
- Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS (1999): Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* 19(10):6845-57
- Naglich JG, Metherall JE, Russell DW, Eidels L (1992). Expression and cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69: 1051-1061
- Nakamura T, Ushijima T, Ishizaka Y, Nagao M, Arai M, Yamazaki Y, Ishikawa T (1994): Cloning and activation of the Syrian hamster neu proto-oncogene. *Gene* 140(2):251-5
- Narita T, Kawakami-Kimura N, Sato M, Matsuura N, Higashiyama S, Taniguchi N, Kannagi R (1996): Alteration of integrins by heparin-binding EGF-like growth factor in human breast cancer cells. *Oncology* 53(5):374-81
- Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA (1991): Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- Neve RM, Sutterluty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, Krek W, Hynes NE (2000): Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 19(13):1647-56
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19(13):3159-67.
- O'Neill C (1997): Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod*;56(1):229-37
- Pandiella A, Massagué J (1991). Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1726-1730
- Paria BC, Das SK, Andrews GK, Dey SK (1993a): Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(1):55-9
- Paria BC, Das SK, Huet-Hudson YM, Dey SK (1994b): Distribution of transforming growth factor alpha precursors in the mouse uterus during the periimplantation period and after steroid hormone treatments. *Biol Reprod* 50(3):481-91
- Paria BC, Das SK, Mead RA, Dey SK (1994a): Expression of epidermal growth factor receptor in the preimplantation uterus and blastocyst of the western spotted skunk. *Biol Reprod* 51(2):205-13
- Paria BC, Dey SK (1990): Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12):4756-60
- Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK (1999): Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*126(9):1997-2005
- Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK (1993b): Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*;90(21):10159-62
- Paria BC, Tsukamura H, Dey SK (1991): Epidermal growth factor-specific protein tyrosine phosphorylation in preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 45(5):711-8
- Pawson T (1995): Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373(6514):477-8
- Petch LA, Harris J, Raymond VW, Blasband A, Lee DC, Earp HS (1990): A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol Cell Biol* 10(6):2973-82
- Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Alroy I, Levkowitz G, Lonai P, Yarden Y (1997): Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* 15(23):2803-15
- Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, Alimandi M, Kuo A, Moyer JD, Lavi S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Seger R, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1998): ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol* 1998 Oct;18(10):6090-101; Published erratum appears in *Mol Cell Biol* 18(12):7602
- Plowman GD, Culouscou J-M, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M (1993). Ligand-specific activation of her4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Biochemistry* 90: 1746-1750
- Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M (1990): Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13):4905-9
- Pratten MK (1998) The role of exogenous growth-promoting factors and their receptors in embryogenesis. *Reprod Toxicol* 12: 201-207
- Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ (1990): Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5(7):953-62
- Prigent SA, Gullick WJ (1994): Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J* 13(12):2831-41
- Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ (1992): Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 7(7):1273-8
- Psychoyos A (1986): Uterine receptivity for nidation. *Ann N Y Acad Sci* 476:36-42
- Pupa SM, Menard S, Morelli D, Pozzi B, De Palo G, Colnaghi MI (1993): The extracellular domain of the c-

- erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* 8(11):2917-23
- Qian JF, Lazar-Wesley E, Breugnot C, May E (1993): Human transforming growth factor alpha: sequence analysis of the 4.5-kb and 1.6-kb mRNA species. *Gene* 132(2):291-6
- Quirke P, Pickles A, Tuzi NL, Mohamdee O, Gullick WJ (1989): Pattern of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *J Cancer* 60(1):64-9
- Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M (1996): Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 122(2):637-45
- Raaberg L, Nexø E, Damsgaard Mikkelsen J, Seier Poulsen S (1988): Immunohistochemical localisation and developmental aspects of epidermal growth factor in the rat. *Histochemistry* 89(4):351-6
- Raboudi N, Julian J, Rohde LH, Carson DD (1992): Identification of cell-surface heparin/heparan sulfate-binding proteins of a human uterine epithelial cell line (RL95). *J Biol Chem* 267(17):11930-9
- Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall H, Coghlan JP (1985). Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313: 228-231
- Rao CV, Ramani N, Chegini N, Stadig BK, Carman FR Jr, Woost PG, Schultz GS, Cook CL (1985): Topography of human placental receptors for epidermal growth factor. *J Biol Chem* 260(3):1705-10
- Rappolee DA, Brenner CA, Schultz R, Mark D, Werb Z (1988): Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241(4874):1823-5
- Reed ML, Estrada JL, Illera MJ, Petters RM (1993): Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 266(1):74-8
- Reiter JL, Maihle NJ (1996): A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res.* 24(20): 4050-6.
- Riese DJ 2nd, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF (1995): The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15(10):5770-6 ;Published erratum appears in *Mol Cell Biol* 16(2):735
- Riese DJ, Kim ED, Elenius K, Buckley S, Klagsbrun M, Plowman GD, Stern DF (1996): The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor-alpha, heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J Biol Chem* 271(33):20047-52
- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997): Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389(6652):725-30
- Saggi SJ, Safirstein R, Price PM (1992): Cloning and sequencing of the rat preproepidermal growth factor cDNA: comparison with mouse and human sequences. *DNA Cell Biol* 11(6):481-7
- Sandgren EP, Luetke NC, Palmiter RD, Brinster RL, Lee DC (1990): Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61(6):1121-35
- Sarantis L, Roche D, Psychoyos A (1988): Displacement of receptivity for nidation in the rat by the progesterone antagonist RU 486: a scanning electron microscopy study. *Hum Reprod* 3(2):251-5
- Sato M, Narita T, Kawakami-Kimura N, Higashiyama S, Taniguchi N, Akiyama S, Hashimoto T, Manabe T, Kannagi R (1996): Increased expression of integrins by heparin-binding EGF like growth factor in human esophageal cancer cells. *Cancer Lett* 102(1-2):183-91
- Schaefer G, Akita RW, Sliwkowski MX (1999): A discrete three-amino acid segment (LVI) at the C-terminal end of kinase-impaired ErbB3 is required for transactivation of ErbB2. *J Biol Chem.* 274(2):859-66.
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984): The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312(5994):513-6
- Schlafke S, Enders AC (1975): Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod* 12(1):41-65
- Schlessinger J, Geiger B (1981): Epidermal growth factor induces redistribution of actin and alpha-actinin in human epidermal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 134(2):273-9
- Schlessinger J, Ullrich A, Honegger AM, Moolenaar WH (1988): Signal transduction by epidermal growth factor receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 1:515-9

- Schorr B (1989): Embryologie der Haustiere: ein Kurzlehrbur. 2. neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke, 1989
- Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232(4755):1250-3
- Scott GK, Robles R, Park JW, Montgomery PA, Daniel J, Holmes WE, Lee J, Keller GA, Li W-L, Fendly BM, Wood WI, Shepard HM, Benz CC (1993). A truncated intracellular her2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology* 13: 2247-2257
- Scott J, Ureda M, Quroga M, Sanchez-Pescador R, Fon N, Selby N, Rutter WJ, Bell GI (1983). Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 221: 236-240
- Segalen J, Chambon Y (1983): Ultrastructural aspects of the antimesometral implantation in the rabbit. *Acta Anat (Basel)* 115(1):1-7
- Segatto O, Pelicci G, Giuli S, Digiesi G, Di Fiore PP, McGlade J, Pawson T, Pelicci PG (1993): Shc products are substrates of erbB-2 kinase. *Oncogene* 8(8):2105-12
- Shelly M, Pinkas-Kramarski R, Guarino BC, Waterman H, Wang LM, Lyass L, Alimandi M, Kuo A, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1998): Epregrin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J Biol Chem.* 273(17):10496-505.
- Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF (1998): A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 17(3):719-31
- Sibilia M, Wagner EF (1995): Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269: 234-238
- Singh B, Zhang X, Armstrong DT (1993): Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine cumulus expansion in vitro is independent of the oocyte. *Endocrinology* 132(4):1860-2
- Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL 3rd (1994): Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269(20):14661-5
- Smith JM, Sporn MB, Roberts AB, Derynck R, Winkler ME, Gregory H (1985): Human transforming growth factor-alpha causes precocious eyelid opening in newborn mice. *Nature* 315(6019):515-6
- Smith K, LeJeune S, Harris AH, Rees MC (1991): Epidermal growth factor receptor in human uterine tissues. *Hum Reprod* 6(5):619-22
- Smith SO, Smith CS, Bormann BJ (1996): Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat Struct Biol* 3(3):252-8
- Smith WC, Talamantes F (1986): Characterization of the mouse placental epidermal growth factor receptor: changes in receptor number with day of gestation. *Placenta* 7(6):511-22
- Soltoff SP, Carraway KL 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC (1994): ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 14(6):3550-8
- Soltoff SP, Carraway KL 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC (1994): ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 14(6):3550-8
- Sorkin A, Waters CM (1993): Endocytosis of growth factor receptors. *Bioessays* 15(6):375-82
- Sorokin A, Lemmon MA, Ullrich A, Schlessinger J (1994): Stabilization of an active dimeric form of the epidermal growth factor receptor by introduction of an inter-receptor disulfide bond. *J Biol Chem* 269(13):9752-9
- Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL (2000): ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 148(2):385-97
- Staros JV, Anjaneyulu PS (1989): Membrane-impermeant cross-linking reagents. *Methods Enzymol.* 172:609-28.
- Stein RA, Staros JV (2000): Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *J Mol Evol* 50(5):397-412
- Stoscheck CM, Carpenter G (1984): Down regulation of epidermal growth factor receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 98(3):1048-53
- Stromberg K, Pigott DA, Ranchalis JE, Twardzik DR (1982): Human term placenta contains transforming

- growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 106(2):354-61
- Summerfield AE, Hudnall AK, Lukas TJ, Guyer CA, Staros JV (1996): Identification of residues of the epidermal growth factor receptor proximal to residue 45 of bound epidermal growth factor. *J Biol Chem* 271(33):19656-9.
- Sundaresan S, Roberts PE, King KL, Sliwkowski MX, Mather JP (1998): Biological response to ErbB ligands in nontransformed cell lines correlates with a specific pattern of receptor expression. *Endocrinology* 139(12):4756-64
- Sutton R, Ward WG, Raphael KA, Cam GR (1995): Growth factor expression in skin during wool follicle development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 110(4):697-705
- Taga T, Kishimoto T (1992): Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J* 6(15):3387-96
- Taketani Y, Mizuno M (1991): Evidence for direct regulation of epidermal growth factor receptors by steroid hormones in human endometrial cells. *Hum Reprod* 6(10):1365-9
- Tal M, King CR, Kraus MH, Ullrich A, Schlessinger J, Givol D (1987): Human HER2 (neu) promoter: evidence for multiple mechanisms for transcriptional initiation. *Mol Cell Biol* 7(7):2597-601
- Tam JP (1985): Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. *Science* 229(4714):673-5
- Tamada H, Higashiyama C, Takano H, Kawate N, Inaba T, Sawada T (1999): The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation in the rat. *Life Sci* 64(22):1967-73.
- Tamada HI, Das SK, Andrews GK, Dey SK (1991). Cell-type-specific expression of transforming growth factor- $\alpha$  in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Biology of Reproduction* 45: 365-372
- Tanner KG (1997). Persistence of dimerization and enzymatic activity of epidermal growth factor receptor in the absence of epidermal growth factor. *Biochemistry* 36: 14889-14896
- Teixido J, Wong ST, Lee DC, Massague J (1990): Generation of transforming growth factor- $\alpha$  from the cell surface by an O-glycosylation-independent multistep process. *J Biol Chem* 265(11):6410-5
- Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al (1995): Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269(5221):230-4
- Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE (1980): Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(9):5258-62
- Tomooka Y, DiAugustine RP, McLachlan JA (1986): Proliferation of mouse uterine epithelial cells in vitro. *Endocrinology* 118(3):1011-8
- Tong BJ, Das SK, Threadgill D, Magnuson T, Dey SK (1996). Differential expression of the full-length and truncated forms of the epidermal growth factor receptor in the preimplantation mouse uterus and blastocyst. *Endocrinology* 137: 1492-1496
- Tranque P, Naftolin F, Robbins R (1994): Differential regulation of astrocyte plasminogen activators by insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Endocrinology* 134(6):2606-13
- Troche V, O'Connor DM, Schaudies RP (1991): Measurement of human epidermal growth factor receptor in the endometrium during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 165(5 Pt 1):1499-503
- Tsutsumi O, Kubota Y, Oka T (1987): Effect of sialoadenectomy, treatment with epidermal growth factor (EGF) antiserum and replacement of EGF on the epidermis in mice. *J Endocrinol* 113(2):193-7
- Tsutsumi O, Taketani Y, Oka T (1993): The uterine growth-promoting action of epidermal growth factor and its function in the fertility of mice. *J Endocrinol* 138(3):437-44
- Twardzik DR, Sherwin SA, Ranchalis J, Todaro GJ (1982): Transforming growth factors in the urine of normal, pregnant, and tumor-bearing humans. *J Natl Cancer Inst*;69(4):793-8
- Tzahar E, Levkowitz G, Karunagaran D, Yi L, Peles E, Lavi S, Chang D, Liu N, Yayon A, Wen D, et al (1994): ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms. *J Biol Chem* 269(40):25226-33
- Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y (1997): Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 16(16):4938-50

- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996): A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16(10):5276-87
- Tzahar E, Yarden Y (1998): The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta* 1377(1):M25-37
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Grey A, Tam AW, Yarden Y, Liberman TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes EL, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-424
- Ullrich A, Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2):203-12
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251-337
- Vaughan TJ, James PS, Pascall JC, Brown KD (1992a). Expression of the genes for TGF $\alpha$ , EGF and the EGF receptor during early pig development. *Development* 116: 663-669
- Vaughan TJ, James PS, Pascall JC, Brown KD (1993): Molecular cloning and tissue distribution of pig transforming growth factor alpha. *Biochem J* 296 ( Pt 3):837-42
- Vaughan TJ, Pascall JC, Brown KD (1992b): Nucleotide sequence and tissue distribution of mouse transforming growth factor-alpha. *Biochim Biophys Acta* 1992 1132(3):322-4
- Vaughan TJ, Pascall, J. C.; Brown, K. D (1992c). Tissue distribution of mRNA for heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochem J.* 287: 681-684
- Wada T, Qian XL, Greene MI (1990): Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell* 61(7):1339-47
- Walker F, Burgess AW (1994). Epidermal growth factor receptor. In: Nicola, N.A., ed. *Guidebook to cytokines and their receptors*. New York: Oxford University Press; p. 198-201.
- Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A (1995): Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 14(17):4267-75
- Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA (1992): Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 31(2):87-95
- Watson AJ, Watson PH, Arcellana-Panlilio M, Warnes D, Walker SK, Schultz GA, Armstrong DT, Seamark RF (1995): A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol Reprod* 50(4):725-33
- Watson H, Franks S, Bonney RC (1994): Characterization of epidermal growth factor receptor in human endometrial cells in culture. *J Reprod Fertil* 101(2):415-20
- Werb Z (1990). Expression of EGF and TGF-alpha genes in early mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.* 27: 10-15
- Wilcox JN, Derynck R (1988): Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Mol Cell Biol* 8(8):3415-22
- Wiley LM, Adamson ED, Tsark EC (1995): Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development. *Bioessays* 17(10):839-46
- Wiley LM, Wu JX, Harari I, Adamson ED (1992): Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev Biol* 149(2):247-60
- Wollenhaupt K, Tiemann U, Einspanier R, Schneider F, Kanitz W, Brussow KP (1997): Characterization of the epidermal growth factor receptor in pig oviduct and endometrium. *J Reprod Fertil* 111(2):173-81
- Wong ST, Winchell LF, McCune BK, Earp HS, Teixido J, Massague J, Herman B, Lee DC (1989). The TGF alpha precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor in adjacent cells, leading to signal transduction. *Cell* 56: 495-506
- Wood SA, Kaye PL (1989): Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil* 85(2):575-82
- Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS (1999): ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 274(13):8865-74

- Worthylake R, Wiley HS (1997): Structural aspects of the epidermal growth factor receptor required for transmodulation of erbB-2/neu. *J Biol Chem* 272(13):8594-601
- Wu DG, Wang LH, Chi Y, Sato GH, Sato JD (1990): Human epidermal growth factor receptor residue covalently cross-linked to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*;87(8):3151-5
- Xu YH, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I (1984): Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(23):7308-12
- Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K (1986): Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*. 319(6050):230-4.
- Yarden Y, Schlessinger J (1987). EGF induces rapid, reversible aggergation of the purified EGF-receptor. *Biochem*. 26: 1443-1451
- Yokota H (1997): AB008451, direct submission to DDBJ/EMBL/GenBank databases. Rakuno Gakuen University, Veterinary Biochemistry; Bunkyo-daimidori-mati, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan
- Yokota K, Kusaka M, Ohshima T, Yamamoto S, Kurihara N, Yoshino T, Kumegawa M (1986): Stimulation of prostaglandin E2 synthesis in cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1) by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 261(33):15410-5
- Yoneda T, Pratt RM (1981): Mesenchymal cells from the human embryonic palate are highly responsive to epidermal growth factor. *Science*;213(4507):563-5
- Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ (1997): Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet* 21(1):102-8
- Yu D, Hamada J, Zhang H, Nicolson GL, Hung MC (1992): Mechanisms of c-erbB2/neu oncogene-induced metastasis and repression of metastatic properties by adenovirus 5 E1A gene products. *Oncogene* 7(11):2263-70
- Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, Carney W (1991): The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J Biol Chem* 266(3):1716-20
- Zhang K, Sun J, Liu N, Wen D, Chang D, Thomason A, Yoshinaga SK (1996): Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 271(7):3884-90
- Zhang Y, Paria BC, Dey SK, Davis DL (1992a): Characterization of the epidermal growth factor receptor in preimplantation pig conceptuses. *Dev Biol* 151(2):617-21
- Zhang Z, Funk C, Roy D, Glasser S, Mulholland J (1994): Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is differentially regulated by progesterone and estradiol in rat uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology* 134(3):1089-94
- Zhang Z, Krause M, Davis DL (1992b): Epidermal growth factor receptors in porcine endometrium: binding characteristics and the regulation of prostaglandin E and F2 alpha production. *Biol Reprod* 46(5):932-6
- Zhou M, Felder S, Rubinstein M, Hurwitz DR, Ullrich A, Lax I, Schlessinger J (1993): Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry* 32(32):8193-8
- Zrihan-Licht S, Lim J, Keydar I, Sliwkowski MX, Groopman JE, Avraham H (1997): Association of csk-homologous kinase (CHK) (formerly MATK) with HER-2/ErbB-2 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 272(3):1856-63

## 7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<u>Abbildungen</u>	<u>Seite</u>	
1	Zusammenfassung möglicher Rezeptorinteraktionen	4
2	Schematische Darstellung eines erbB-Rezeptors	6
..3	Homologien zwischen den einzelnen Domänen der humanen erbB-Rezeptoren	8
4	Transmembranöse Vorläufer einiger Liganden der EGF-Familie	9
5	EGF-Molekül	10
6	Vorgehensweise bei der nested PCR	16
7 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen erbB1-Sequenz	20
7 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für erbB1	21
8 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen erbB2-Sequenz	22
8 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für erbB2	22
9 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen erbB3-Sequenz	23
9 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für erbB3	24
10 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen erbB4-Sequenz	24
10 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für erbB4	25
11	Homologien zwischen den einzelnen Domänen der humanen erbB-Rezeptoren	27
12 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen EGF-Sequenz	28
12 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für EGF	29
13 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen TGF $\alpha$ -Sequenz	29
13 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für TGF $\alpha$	30
14 a	Alignment der Kaninchensequenz mit der humanen HB-EGF-Sequenz	31
14 b	Vergleich der Aminosäuresequenzen für HB-EGF	32
15 a	RT-PCR für erbB1 am Tag 3 – 9 p.c.	33
15 b	RT-PCR für erbB1 am Tag 10 – 14 p.c.	33
16 a	RT-PCR für erbB2 am Tag 3 – 9 p.c.	34
16 b	RT-PCR für erbB2 am Tag 10 – 14 p.c.	34
17 a	RT-PCR für erbB3 am Tag 3 – 9 p.c.	35
17 b	RT-PCR für erbB3 am Tag 10 – 14 p.c.	35
18 a	RT-PCR für erbB4 am Tag 3 – 9 p.c.	36
18 b	RT-PCR für erbB4 am Tag 10 – 14 p.c.	36
19 a	RT-PCR für EGF am Tag 3 – 9 p.c.	38
19 b	RT-PCR für EGF am Tag 10 – 14 p.c.	38
20 a	RT-PCR für TGF $\alpha$ am Tag 3 – 9 p.c.	39
20 b	RT-PCR für TGF $\alpha$ am Tag 10 – 14 p.c.	39
21 a-d	RT-PCR pseudogravider Uteri für die erbB-Rezeptoren	41
22	Restriktionsanalyse	42
<u>Tabellen</u>		
1	Differentielle primäre Aktivierung von erbB-Rezeptoren durch EGF-verwandte Liganden	9
2	Primer für die initiale RT-PCR	17
3	Spezifische Primer	18
4	Restriktionsanalyse	19
5	Zusammenfassung der Homologievergleiche für erbB1	21
6	Zusammenfassung der Homologievergleiche für erbB2	22
7	Zusammenfassung der Homologievergleiche für erbB3	24
8	Zusammenfassung der Homologievergleiche für erbB4	25
9	Zusammenfassung der Homologievergleiche für EGF	28
10	Zusammenfassung der Homologievergleiche für TGF $\alpha$	30
11	Zusammenfassung der Homologievergleiche für HB-EGF	32
12a	Expressionsmuster der erbB-Rezeptoren während der Präimplantationsphase	37
12b	Expressionsmuster der erbB-Rezeptoren während der Implantations- und Postimplantationsphase	37
13a	Expressionsmuster der erbB-Liganden während der Präimplantationsphase	40
13b	Expressionsmuster der erbB-Liganden während der Implantations- und Postimplantationsphase	40
14	Expressionsmuster der erbB-Rezeptoren und –Liganden in pseudograviden und nichtgraviden Uteri	41

## 8. THESEN

1. Wachstumsfaktoren der EGF-Familie und ihre Rezeptoren haben eine wichtige Funktion für Wachstum und Entwicklung von Embryonen und Uterus sowie die embryo-maternalen Interaktionen während der Frühgravidität.
2. Mittels nested RT-PCR konnten die bisher noch unbekanntes Kaninchen-spezifischen cDNA-Teilsequenzen für die erbB-Rezeptoren 1-4 und ihre Liganden EGF, TGF $\alpha$  und HB-EGF bestimmt werden.
3. Die cDNA-Rezeptor- und Ligandensequenzen weisen innerhalb der Mammalier eine hohe Homologie auf. Dies läßt auf eine evolutionär konservierte Funktion der klonierten Molekülbereiche schließen.
4. Alle aus dem Kaninchen klonierten Fragmente für die erbB-Liganden besitzen ein offenes Leseraster. Auch hier gilt, daß die Homologien relativ hoch sind und die Aminosäuren größtenteils konservativ substituiert sind.
5. Die Rezeptorsequenzen verfügen untereinander über homologe Bereiche, was die Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül vermuten läßt.
6. Untereinander bestehen zwischen den einzelnen Liganden nur geringe Homologien. Hierin könnte die Ursache für unterschiedliche Funktionen bzw. Signalstärken und unterschiedliche Bindungsaffinitäten liegen. Durch die Lage der ermittelten Rezeptorteilsequenzen im extrazellulären Bereich kann nicht zwischen full-length und trunkierten Formen unterschieden werden. Auch bei den Liganden ist eine Differenzierung zwischen membranständigem Vorläufermolekül und löslicher Form nicht möglich, da der in der Arbeit sequenzierte Bereich in beiden Formen enthalten ist.
7. Die Rezeptoren erbB1-3 scheinen für Wachstum und Entwicklung von Embryo und Uterus während der frühen Gravidität des Kaninchens von Bedeutung zu sein. Sie konnten beim Kaninchen mittels RT-PCR sowohl im Uterus der Präimplantationsphase vom 3. bis 6. Tag als auch im Uterus der Implantations- und Postimplantationsphase vom 7. bis 14. Tag nachgewiesen werden. In den späten Stadien werden Transkripte in den Uterusabschnitten der Implantationskammern und der dazwischen liegenden interplazentaren Uterusabschnitte gefunden. Entsprechende Fragmente können auch in 6 Tage alten Blastozysten und in 14 Tage alten Feten amplifiziert werden.

8. ErbB4 wird im Kaninchenuterus während der Prä- und Implantationsperiode schwächer exprimiert als in der Postimplantationsperiode. Es findet sich auch nur eine schwache Expression in 6 Tage alten Blastozysten, wohingegen es in 14 Tage alten Feten deutlich amplifiziert werden kann. Möglicherweise ist erbB4 während der Periimplantationsperiode nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und gewinnt erst in der Postimplantationsperiode zunehmend an Bedeutung.
9. Die Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  spielen eine Rolle bei der Gravidität des Kaninchens. Entsprechende Transkripte werden im Uterus des Kaninchen während der Peri- und Postimplantationsperiode sowie in 6 Tage alten Blastozysten und 14 Tage alten Feten gefunden.
10. HB-EGF scheint für die Entwicklungsprozesse während der Gravidität des Kaninchen weniger essentiell zu sein und nur in geringen Maße exprimiert zu werden. Sein Transkript konnte mittels RT-PCR nur nach Reamplifikation primärer PCR-Produkte in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden.
11. Die Expression von erbB-Rezeptoren und ihrer Liganden im graviden Uterus ist unabhängig von der Anwesenheit des Konzeptus, da ein nahezu identisches Transkriptmuster auch in verschiedenen Pseudograviditätsstadien gefunden wurde.
12. Das Vorhandensein von erbB-Rezeptoren und ihren Liganden im uterinen Gewebe während der Implantation und Plazentation weist auch beim Kaninchen auf eine funktionelle Bedeutung für feto-maternale Interaktionen hin. Ihre entwicklungsabhängige Expression, die Bindung der Wachstumsfaktoren durch Trophoblast- und Embryoblastzellen sowie die Stimulation der embryonalen Zellproliferation, Proteinsynthese und Blastozystenexpansion, die von anderen Autoren beschrieben werden, sprechen für eine spezifische Funktion der Wachstumsfaktoren und ihrer Liganden bei der Regulation der frühen Embryonalentwicklung und Implantation.

## Lebenslauf

Am 15.09.1973 wurde ich als Tochter von Bernd Wolf und Lidia Wolf, geb. Mikowa, in Lublin geboren.

1980 – 1993 Schulbesuch in Halle  
Mai 1992 Highschool Diploma an der Pandora-Gilboa-Highschool,  
Pandora, Ohio, USA  
Mai 1993 Abitur am Gymnasium im Bildungszentrum, Halle  
1993 – 2000 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

### *Famulaturen:*

- Chirurgische Ambulanz, St. Elisabeth-Krankenhaus Halle
- Department of Medicine, District General Hospital  
Eastbourne England
- Abteilung für Anästhesiologie und allgemeine Intensivmedizin,  
Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Wien, Österreich
- Abteilung für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie,  
Hôpital St-Vincent-de-Paul, Paris, Frankreich

1999 – 2000 *Praktisches Jahr*

- Neurologische Klinik, Universitätskliniken Tours, Frankreich
- Klinik und Poliklinik für Visceralchirurgie,  
Universitätskliniken Genf, Schweiz
- Medizinische Klinik II, St. Elisabeth-Krankenhaus, Halle

November 2000 Abschluß der Ärztlichen Prüfung (III. Staatsexamen)

seit Januar 2001 AiP an der Universitätsklinik für Innere Medizin III,  
Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien (Universitätskliniken),  
Wien, Österreich (Direktor: Prof. Dr. Werner Waldhäusl)

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung von Herrn PD Dr.med. Thomas Klonisch in der Zeit vom Dezember 1995 bis Dezember 1998 am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg.

Mein Dank gilt ganz besonders

Herrn PD Dr.med. Thomas Klonisch für die Anregung zu diesem Thema, die Einführung in molekularbiologische Techniken, seine freundschaftliche Unterstützung, die engagierten Diskussionen und die vielfältige Beratung bei der Gestaltung der vorliegenden Dissertation.

Herrn Prof. Dr.med. Dr.agr. Bernd Fischer nicht nur für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können, sondern auf für das mir jederzeit entgegengebrachte Vertrauen, seine stetige Hilfsbereitschaft und zahlreichen Anregungen.

Herrn Dr. Frank Tetens und Frau Dipl.-Biochem. Anne Navarrete-Santos für viele Diskussionen, regen Gedankenaustausch und Einführung in die Molekularbiologie.

den Mitarbeiter/innen der Arbeitsgruppe von Prof. Fischer im Institut für Anatomie und Zellbiologie in Halle, insbesondere Christine Fröhlich, Sylke Vogt und Elisabeth Schlüter für gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Halle, im Dezember 2000

Patricia Wolf