

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



**16. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der
DGGEF und DGRM Düsseldorf, 25.–26. November 2016 –**

Abstracts

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2017; 14 (1), 19-24

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

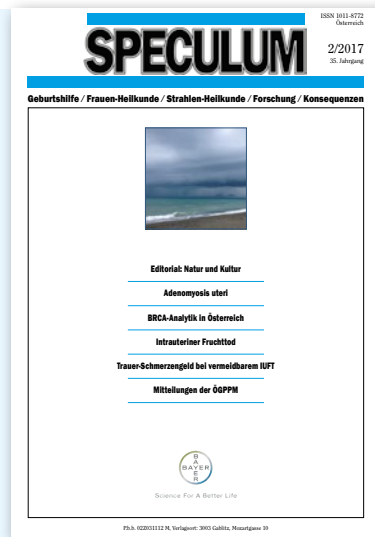
Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Mitteilungen aus der Redaktion

Die meistgelesenen Artikel



Speculum

Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie



16. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der DGGEF und DGRM

Düsseldorf, 25.–26. November 2016

Abstracts*

Vorwort

Zum nunmehr 16. Mal fand vom 25.–26.11.2016 das Treffen des Arbeitskreises „Molekularbiologie in der Frauenheilkunde“ der DGGEF und DGRM in Düsseldorf statt und hat wie in den Jahren zuvor, erneut große Begeisterung bei den Teilnehmern hervorgerufen. In diesem Arbeitskreis haben vorwiegend jüngere Nachwuchswissenschaftler, die sich mit der Reproduktions-Physiologie, -Biologie und -Medizin befassen die Möglichkeit, ihre Forschungsarbeiten vorzustellen. Auch 2016 zeichnete sich das Treffen durch eine stimulierende Vielfalt der Themen und hohen wissenschaftlichen Anspruch aus. Die Diskussion nach den jeweiligen Vorträgen spiegelte wider, dass die Themen von hoher Relevanz waren und das Interesse des Auditoriums genau getroffen haben. Ebenso waren die Teilnehmer sehr daran interessiert, den Vortragenden hilfreiche Ansätze für die Weiterentwicklung der vorgestellten Projekte aufzuzeigen. Wie auch schon in den letzten Jahren, haben sich dadurch auch dieses Jahr wieder mögliche neue Kooperationen abgezeichnet. Dies unterstreicht den Charakter der Veranstaltung, der den Fokus auf Nachwuchsförderung und Networking legt. Die Früchte einer vor 2 Jahren geschlossenen Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe von Frau **Professor Dr. rer. nat. Ruth Grümmer** (Institut für Anatomie, Universitätsklinikum

Essen) und von Frau **PD Dr. med. Alexandra Bielfeld** (UniKiD-Kinderwunschzentrum der Universitätsfrauenklinik, Düsseldorf) wurden gleich durch 3 Vorträge auf dem diesjährigen Treffen präsentiert.

Zur Eröffnung des Arbeitskreistreffens hat Frau **Dr. med. Justine Fitzgerald** aus dem Kinderwunschzentrum am Anger in Erfurt und dem Plazentalabor der Universitätsfrauenklinik Jena einen umfassenden Vortrag über die Trophoblasteninvasion gehalten.

Wie in jedem Jahr wurde ein Preis für den besten Vortrag ausgelobt. Nach einer spannenden Stichwahl hat den Preis in Höhe von EUR 500,- Frau **Franziska Kaiser** aus der Abteilung Entwicklungspathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn für ihre Arbeit „Komplette Reprogrammierung von Embryonalen Stammzellen in Trophoblast Stammzellen“ erhalten. Die Auswahlbegutachtung der wissenschaftlichen Abstracts erfolgte durch die Organisatorinnen des Treffens, Frau **Dr. rer. nat. Dunja Baston-Büst** und Frau **PD Dr. med. Alexandra Bielfeld**, Düsseldorf. Die Vergabe des Preises erfolgte, wie bei diesem Treffen üblich, durch geheime Wahl der teilnehmenden Arbeitsgruppen.

*PD Dr. med. Alexandra Bielfeld
Organisationskomitee*

Gibt es Unterschiede in der Genexpression des eutopen Endometriums von gesunden Frauen versus Frauen mit einer Endometriose-Erkrankung?

L. Beyer¹, R. van Rensburg², S. J. Pour¹, R. Grümmer³, D. M. Baston-Büst¹, J.-S. Krüssel¹, T. N. Fehm⁴, D. Niederacher², A. P. Bielfeld¹

¹UniKiD; ²Oncologisches Forschungslabor, Universitätsfrauenklinik Düsseldorf; ³Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen; ⁴Universitätsfrauenklinik Düsseldorf

Einleitung Die Endometriose ist eine der häufigsten und gleichzeitig unterdiagnostiziertesten Krankheiten bei Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter. Die Frauen zeigen sehr divergierende Anzeichen von Schmerzen, die meist nicht mit dem Ausmaß der Erkrankung korrelieren. Zusätzlich ist die Endometriose oft mit Subfertilität verbunden. Die bisher anerkannteste Pathomechanismus-Hypothese ist die der retrograden Menstruation. Die zugrundeliegenden Konditionen sind jedoch bislang nicht vollständig aufgedeckt. Darüber hinaus werden endometriotische Läsionen außerhalb des Bauchraums durch die oben erwähnte Hypothese nicht zufriedenstellend erklärt. Prozesse der Neoangiogenese, Proliferation und Inflammation scheinen weitere wichtige Rollen in der Entwicklung der Endometriose zu spielen. Weiterhin stellt

sich die Frage, ob endometriale Stammzellen ebenso eine Rolle spielen können.

Fragestellung Gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung des eutopen Endometriums von gesunden Frauen und Endometriose-Patientinnen mit Hinsicht auf die Expression von Proliferations-, Vaskularisierungs-, Inflammations- und Stammzellmarkern?

Material und Methoden Biopsien des eutopen Endometriums wurden während der diagnostischen Hysteroskopie und Laparoskopie von gesunden Frauen und Endometriose-Patientinnen sowie von therapeutischen „endometrial scratchings“ im Rahmen der assistierten Reproduktion gesammelt. Anschließend wurde eine quantitative Real-time-PCR für eine Gruppe von Genen durchgeführt, die mit Proliferation, Vaskularisierung, Inflammation und Stammzeleigenschaften assoziiert sind.

Ergebnisse Eine erste Analyse ergab signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen dem eutopen Endometrium gesunder Individuen im Vergleich zu Endometriose-Patientinnen.

Schlussfolgerungen Die Ergebnisse auf mRNA Ebene zeigten signifikante Unterschiede in allen untersuchten Fragestellungen. Darüber hinaus konnten Proben von Frauen mit Endometriose I° und II° gegenüber Proben von Patientinnen mit Endometriose III° und IV° durch ein unterschiedliches Genexpressionsmuster diskriminiert werden. Laufende Untersuchungen werden die aktuellen Daten an einem größeren Kollektiv validieren und beteiligte Signalkaska-

den der regulierten Gene sowie die Proteinlokalisierung weiter aufklären.

Einfluss der miRNA let-7d auf die epithelial-mesenchymale Transition in der Pathogenese der Endometriose

C. Brandhorst¹, B. Greve², M. Götte¹

¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe;

²Klinik für Strahlentherapie-Radioonkologie, Universitätsklinikum Münster

Einleitung Die Endometriose ist durch außerhalb des Uterus auftretendes endometriales Gewebe charakterisiert, und mit einer Schmerzsymptomatik und reduzierter Fertilität assoziiert. Die bei dieser Erkrankung auftretende Fehlregulation kleiner nichtkodierender RNAs mit regulatorischer Funktion – der mikroRNAs – wird mit dem Pathogenesemechanismus in Zusammenhang gebracht. So stellten Cho et al. fest, dass die miRNA let-7d im Serum von Endometriosepatientinnen in der proliferativen Phase des Endometriums im Vergleich zu gesunden Frauen herunterreguliert war [1]. Außerdem konnte u. a. in oralen Plattenepithelkarzinomen gezeigt werden, dass eine Überexpression der miRNA let-7d eine Umkehr der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) als Grundlage invasiven Wachstums bewirken kann [2]. Dies gibt Anhalt zur Frage, inwieweit die miRNA let-7d in der gutartigen Krankheit Endometriose Teil der Pathogenese ist.

Material und Methoden Die immortalisierte Endometriosezell-Linie 12Z und die en-

*Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee, Verzeichnis der Erstautoren siehe Seite 24.

ometriale Stromazell-Linie ST-t1b wurden transient mit let-7d Precursor-miRNA und unspezifischen Kontroll-miRNAs transfiziert und die Auswirkungen auf die Zielgen- und Proteinexpression mittels qPCR, Western-Blotting und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Auswirkungen der let-7-Hochregulation auf das Zellverhalten wurden in MTT-Proliferationsassays, Matrigel-Invasionskammerassays und mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse untersucht.

Ergebnisse Es konnten signifikante let-7d-abhängige Veränderungen der mRNA-Konzentrationen mehrerer EMT-Marker festgestellt werden. Dabei zeichneten sich starke Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zell-Linien St-T1b und 12Z ab. Während die stromale Endometrium-Zell-Linie St-T1b eine Herabregulierung der mesenchymalen Marker N-Cadherin und Fibronectin und einen Trend zur Überexpression des epithelialen Markers E-Cadherin zeigt, bildet sich bei der epithelialen Endometriose-Zell-Linie 12Z ein Bild einer verstärkten EMT mit signifikant erhöhten mesenchymalen Markern (Fibronectin, Snail1, Snail2, Vimentin, Twist und ZEB2) ab. Es lassen sich ebenfalls leichte Effekte der let-7d-Überexpression in der Invasion, Proliferation bzw. der Zellzyklusphasenverteilung erkennen.

Schlussfolgerung Die miRNA let-7d könnte als einzelner Faktor einen Teil der Pathogenese der Endometriose durch eine Regulation der epithelial-mesenchymalen Transition beeinflussen. Weitere Untersuchungen an Primärkulturen erscheinen auf Basis dieser Daten lohnenswert.

Literatur:

1. Cho S, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertil Steril* 2015; 103: 1252–60.
2. Chang CJ, et al. Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer. *Oncol Rep* 2011; 26: 1003–10.

Das ovarielle Endocannabinoidsystem ist nicht an der reproduktionstoxischen Wirkung von DEHP beteiligt

J. Ernst, K. Schädlich, K. Falk, U. Grabiec, B. Fischer, F. Dehghani
 Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Plastik ist aus dem täglichen Leben nicht mehr wegzudenken. Doch inzwischen werden die gesundheitlichen Gefahren, die von den darin enthaltenen Weichmachern ausgehen, immer ernsthafter hinterfragt. Di-(2-ethylhexyl)-phthalat (DEHP) als der am häufigsten verwandte Weichmacher wurde durch In-vivo- und In-vitro-Studien der vergangenen Jahre als endokriner Disruptor mit reproduktionstoxischen Eigenschaften identifiziert. Neue Erkenntnisse weisen auf seinen Einfluss auf verschiedene Signalwege und Regelkreise, jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen seiner Wirkungen noch nicht ausreichend geklärt. Dies mag auch an der Tatsache liegen, dass die Fertilität und

Reproduktion durch eine Vielzahl physiologischer Prozesse mit verschiedensten ineinandergreifenden endokrinen Regulatoren und Modulatoren feinabgestimmt ist. In diesem Zusammenhang sollten 2 endokrin regulativ wirkende Systeme – das Adipokinsystem und das Endocannabinoidsystem – bezüglich ihrer Rolle in der DEHP-Wirkung untersucht werden. Dabei kam einerseits ovarielles Gewebe *in vivo* exponierter Mäuse zum Einsatz, andererseits wurden *In-vitro*-Daten mithilfe der immortalisierten humanen Granulosa-zell-Linie KGN erhoben.

Morphologisch konnte im murinen Ovar eine von der DEHP-Konzentration abhängige Verminderung der Follikelzahl festgestellt werden. Bei den Adipokinrezeptoren zeigte sich für den Leptinrezeptor eine erhöhte Genexpression durch DEHP, während die Adiponektinrezeptoren unbeeinflusst waren. Im Gegensatz zu den In-vivo-Daten konnte *in vitro* kein Effekt von DEHP auf die Adipokinrezeptoren beobachtet werden. Diesem Unterschied scheint ein indirekter übergeordneter Effekt zugrundeliegend, da die exponierten Mäuse einen durch DEHP erhöhten Serum-Leptinspiegel aufwiesen. Auch weitere Expressionsveränderungen (Estrogenrezeptoren, Glukosetransporter) konnten nicht im *In-vitro*-Modell KGN validiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die ovariellen Effekte Interaktionen der einzelnen ovariellen Zellkompartimente sowie übergeordnete Regulationsmechanismen, z.B. dem Leptinsystem, bedürfen. Jedoch scheint das intrinsische Endocannabinoidsystem nicht daran beteiligt zu sein.

Wie beeinflusst der Knock-out von Syndecan-1 die Reproduktion der Maus?

C. Gougoula¹, A. P. Bielfeld², S. J. Bötdeker², W. P. M. Benten¹, D. M. Baston-Büst²
¹ZET-Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben Universität Düsseldorf; ²niKID-Universitätsfrauenklinik Düsseldorf

Einleitung Die Syndecan- (Sdc-) Familie gehört zu den multifunktionalen Transmembran-Heparansulfat-Oberflächenrezeptoren. In der Literatur wurde eine Funktion von Sdc-1 bei der Regulierung der Wirkung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren während der Dezidualisierung und Implantation [1] sowie eine zyklusspezifische Expression in Bezug auf den Menstruationszyklus der Frau beschrieben [2]. Studien bezüglich des Einflusses von Sdc auf den Stoffwechsel haben gezeigt, dass die transgene Überexpression von Sdc-1 im Hypothalamus von „Syntrophin“-Mäusen mit Fettleibigkeit assoziiert ist [3]. Um den reproduktiven Phänotyp der Sdc-1-KO-Maus zu charakterisieren und eine mögliche Assoziation zu metabolischen Funktionen aufzuzeigen, wurden Sdc-1-KO-Mäuse verpaart und mit Wildtypmäusen (WT) des gleichen Hintergrundes bezüglich reproduktiver und entwicklungspezifischer Parameter untersucht.

Materialien und Methoden Es wurde ein Östruszyklus-Monitoring durchgeführt, um

so möglichst effektiv die Zeitverpaarungen zur Untersuchung des reproduktiven Phänotyps der KO- vs. WT-Maus durchzuführen. Folgende Parameter wurden untersucht: Schwangerschaftshäufigkeit, Anzahl der Implantationsflecken an Tag 6 *pc*, die Dauer der Trächtigkeit, Wurfgröße, Zahl der toten Nachkommen in verschiedenen Zeitintervallen nach der Geburt, Anzahl und Gewicht der Jungtiere bis zum 6. Lebensmonat und Organengewichte der adulten Tiere.

Darüber hinaus wurden Blutanalysen mit immunologischen Methoden (ELISA) angewendet, um die folgenden metabolischen Parameter zu messen: Leptin, Kortikosteron, Insulin und Glukose. Ebenfalls wurden Hoden/Nebenhoden und Spermioogramme bei den adulten männlichen Nachkommen durchgeführt. Um die Frage zu beantworten, ob es sich um einen embryonalen oder maternalen Effekt handelt, wurden *vice versa* Embryotransferversuche durchgeführt, bei denen Embryonen von WT-Spenderinnen KO-Weibchen und KO-Embryonen auf WT-Ammen transferiert wurden.

Ergebnisse Bezüglich des Östruszyklus zeigten die Sdc-1-KO Mäuse $1,72 \pm 0,12$ Zyklen im Vergleich zu $1,85 \pm 0,10$ Zyklen der B6J-Mäuse innerhalb von 12 Tagen. Außerdem haben die Sdc-1-KO-Weibchen einen verlängerten Proöstrus vor der Östrusphase. Hinsichtlich der Etablierung einer Schwangerschaft zeigten die KO-Tiere mehr Implantationsstellen im Uterus an Tag 6 *pc* als die WT-Tiere. Infolgedessen wurden mehr Jungtiere in der KO-Gruppe pro Wurf geboren. Der Anteil toter Nachkommen vor dem 6. Tag *post partum* im Vergleich zur WT-Gruppe war jedoch signifikant höher. Die Gewichtsanalysen der geborenen Nachkommen bei Geburt sowie in der gesamten Nachbeobachtungszeit von 6 Monaten zeigten, dass die KO-Mäuse signifikant leichter waren und blieben. Außerdem ergab die T-Test-Analyse des Verhältnisses von Organ- zu Körpergewicht zwischen den beiden Gruppen statistisch signifikant leichtere Nieren für KO-Männchen und Weibchen. Darüber hinaus waren die Hoden und Nebenhoden bei KO- vs. WT-Männchen ebenfalls leichter. Bei den KO-Weibchen wogen jedoch das Herz, die Lunge und der Darm vor der Entleerung signifikant mehr. Die anschließenden Spermioogramm-Untersuchungen zeigten weniger normal geformte Spermien und mehr Mittelstück- und Schwanzdefekte bei den KO-Männchen im Vergleich zu den WT-Männchen. Die Blutuntersuchung zeigte, dass die KO-Mäuse – sowohl Weibchen und Männchen – eine signifikant geringere Menge an Kortikosteron und ein signifikant höheres Niveau von Leptin im Alter von 6 Monaten gebildet haben. Der *Vice-versa*-Embryotransfer-Versuch zeigte, dass die KO-Nachkommen bei Geburt und während der ersten 60 Tage signifikant leichter waren.

Schlussfolgerung Zunächst scheint die Reproduktion der Sdc-1-KO-Maus durch die größere Anzahl an Nachkommen durch die genotypische Veränderung nicht negativ beeinträchtigt zu sein. Allerdings fällt der große Anteil toter Nachkommen in den ersten 6 Ta-

gen nach Geburt auf. Des Weiteren sind und bleiben die KO-Nachkommen leichter als die WT-Tiere. Der Vice-versa-Versuch mit weiterhin leichteren KO-Nachkommen bei WT-Ammen legt die Vermutung nahe, dass der genetische Hintergrund ursächlich ist, der das Organgewicht und das Niveau von Hormonen wie z. B. Leptin beeinflusst.

Literatur:

1. Baston-Bust D, et al. Syndecan-1 knock-down in decidualized human endometrial stromal cells leads to significant changes in cytokine and angiogenic factor expression patterns. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 133.
2. Inki P, et al. Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 299–305.
3. Reizes O, et al. Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell* 2001; 106: 105–16.

Myofibroblastic Metaplasia in Endometriosis (EM) can be induced by Seminal Plasma (SP) and its Transforming Growth Factor beta 1 (TGFβ1)-content

M. G. Ibrahim¹, S. Schäfer¹, S. Kliesch², L. Kiesel¹, M. Götte¹, A. N. Schüring¹
¹Department of Gynecology and Obstetrics; ²Center of Reproductive Medicine and Andrology (CeRA), UKM Kinderwunschzentrum, University Hospital of Muenster

Introduction TGFβ1 mediates a myofibroblastic metaplasia in EM lesions, in which myofibroblasts predominate and express alpha smooth muscle actin (ASMA). TGFβ1 is highly concentrated in the peritoneal fluid (PF) in EM, but higher concentrated in SP.

Objective Our objective was to determine whether SP and its TGFβ1-content can induce metaplasia in EM.

Materials and Methods Liquefied semen samples were obtained from normozoospermic men (n = 23), centrifuged and the supernatant was pooled. PF from EM patients (n = 12) was collected intra-operative. TGFβ1-ELISA was carried out. Endometrial biopsies (n = 4), 12Z (endometriotic epithelial) and St-T1b (endometrial stromal) cell lines were used for in-vitro-studies and PCR was performed.

TGFβ1 was measured in SP and in PF. In-vitro-studies were conducted to investigate an effect of 2h/6h incubation with SP 10% regarding the expression of metaplasia markers (ASMA, Fibronectin) and metaplasia mediators (SNAIL 1/2, ZEB2, and TWIST). To neutralize TGFβ1 in SP, anti-TGFβ1 antibody was added.

Results TGFβ1 concentration in SP-pool (88.17 ng/ml) was significantly (p < 0.001) higher than in PF (6.79 pg/ml). ASMA and fibronectin expression was significantly higher in both endometrial biopsies as well as in both cell lines after 2h and 6h incubation with SP 10%. Furthermore, neutralizing TGFβ1 in SP down-regulated ASMA and fibronectin expression. Incubation with SP 10% induced a rapid up-regulation of SNAIL1/2 (as early as 2h incubation), in addition to a delayed up-

regulation of ZEB2 expression (as late as 6 h incubation). In contrast, TWIST expression was down regulated in both cell lines.

Conclusion SP induces a robust myofibroblastic metaplasia of both endometriotic and endometrial cells which is a key biological step in the pathogenesis of EM. This metaplasia is (early) SNAIL-mediated but (late) ZEB2-mediated. This effect could be a new start point for further research about the influence of SP on the pathogenesis of EM.

Digitalholographische Mikroskopie – eine innovative Methode für die 3D-Analyse der Spermienbewegung

M. Muschol, C. Wenders, D. F. Babcock, G. Wennemuth
 Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Einleitung Über die Bewegung von Spermien in 3D ist nur wenig bekannt. Bisherige Studien zur Analyse der Spermienbewegung basierten lediglich auf 2D-Darstellungen mithilfe der „computer-assisted sperm analysis“ (CASA) oder „stop motion“ Analyse. Wir verwenden die Digitale Holografische Mikroskopie (DHM) zur Untersuchung von Schwimmbewegungen und Schlagmustern muriner, humaner und boviner Spermien in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern und Umgebungsbedingungen in 4 Dimensionen (x, y, z, t). Zudem analysieren wir erstmals den Geißelschlag dreidimensional.

Material und Methoden Die DHM ist ein bildgebendes Verfahren zur nicht-invasiven Untersuchung transparenter Objekte. Im Gegensatz zur herkömmlichen Mikroskopie, die lediglich Intensitätsunterschiede beziehungsweise Brechungsindizes darstellt, wird bei der DHM eine kohärente Lichtquelle verwendet, um quantitative Phasenunterschiede zwischen einem Objekt- und einem Referenzstrahl sichtbar zu machen. Anstelle von konventionellen Bildern werden Hologramme mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Hologramme enthalten nicht nur x- und y- sondern auch alle z-Daten der Aufnahme. Mit diesen Daten können kleine bewegliche Objekte wie Spermien in Echtzeit analysiert werden.

Ergebnisse Die Analyse der Spermienbewegung in 3D ergab Auslenkungen des Flagellums in z-Richtung, die mit den Auslenkungen in der xy-Ebene vergleichbar sind. Die z-Auslenkungen breiten sich periodisch als sinusförmige Welle entlang des Flagellums aus. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die z-Auslenkungen mit der Schlagfrequenz und den Rollbewegungen des Spermiums um seine Längsachse korrelieren. Die Rollbewegungen alternieren zwischen Drehungen im und gegen den Uhrzeigersinn für Spermien mit einer linearen Trajektorie. Spermien, die nicht rollen, bewegen sich hingegen auf einer Kreisbahn.

Schlussfolgerung Die Technik der DHM ermöglicht innovative wissenschaftliche Be-

obachtungen. Für die Spermienphysiologie konnten wertvolle Erkenntnisse über die Chiralität der Schwimmtrajektorie, über Rollbewegungen und Schlagmuster sowie deren Koordination gewonnen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse helfen uns zu verstehen, wie Spermien ihren Weg zur Eizelle finden.

Dreidimensionale Darstellung der Gefäßentwicklung in der murinen Dezidua während der frühen Implantation

J. Ossendorf¹, A. Klingberg², A. Brenzel¹, G. Wennemuth¹, M. Gunzer², R. Grümmer¹
¹Institut für Anatomie, ²Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Für eine regelgerechte Entwicklung der Plazenta ist die Ausbildung eines adäquaten Gefäßnetzes in der sich zu Beginn der Schwangerschaft entwickelnden maternalen Dezidua essentiell. Fehlregulationen in diesem Prozess können zu einer gestörten Plazentaentwicklung und in Folge zu einer Unterversorgung des Embryos führen. Um grundlegende Mechanismen dieser maternale Gefäßbildung untersuchen zu können, wurde in dieser Studie im Modellorganismus Maus die Ausbildung der dezidualen Gefäße als Reaktion auf die Implantation des Embryos mit einer innovativen Methode analysiert und dreidimensional dargestellt.

Hierzu wurde weiblichen C57Bl/6 Mäusen an Tag 5,5–9,5 *post conceptionem* (pc) ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (BioLegend) intravenös injiziert. Nach 20 min wurden die Mäuse getötet und mit PFA perfusionsfixiert. Die Implantationskammern wurden entnommen, in Agarose eingebettet und für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Die Analyse erfolgte mit einem Lightsheet-Laser-Mikroskop (LSFM, LaVision Bio-Tec, Bielefeld). Die 3D-Rekonstruktion der LSFM-Daten erfolgte mittels Imaris 8.1.2 Software (Bitplane, Schweiz).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 5,5–9,5 dpc konnte die Entwicklung des uterinen Gefäßnetzes dreidimensional dargestellt werden. Es zeigte sich ein Einsprossen der Gefäße sowohl von der mesometrialen als auch von der antimesometrialen Uterusseite der Implantationskammer. Hierbei stellten sich die mesometrialen Blutgefäße deutlich dicker dar, während sich auf der antimesometrialen Seite ein feineres Netz kleinkalibriger Gefäße entwickelte. Die Intermediärzone zwischen mesometrialer und antimesometrialer Seite schien in diesen Schwangerschaftsstadien nicht durchblutet zu werden. Mithilfe dieser Methode kann somit das gesamte Gefäßnetz in der Dezidua zum Zeitpunkt der Embryoimplantation erfolgreich dargestellt und analysiert werden.

In zukünftigen Untersuchungen soll mit dieser Methode die Auswirkung genetischer Veränderungen auf die Gefäßentwicklung im schwangeren Uterus aufgeklärt werden.

Nachweis und Regulation des Glukokortikoidrezeptors im Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose

G. Rusch¹, J. Thomczik¹, I. Beyer², A. Bielfeld², G. Wennemuth¹, R. Grümmer¹

¹Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen; ²UnikID-Universitätsfrauenklinik Düsseldorf

Endometriose ist charakterisiert durch das Vorkommen von Endometriumgewebe außerhalb des Cavum uteri. Für das ektope Anwachsen des Gewebes spielen Stromazellen eine wichtige Rolle, deren Differenzierung zu Deziiduaellen bei Frauen mit Endometriose durch eine Progesteronresistenz vermindert sein kann. Da möglicherweise auch der Glukokortikoidrezeptor-Signalweg an dieser Differenzierung beteiligt sein könnte, wurde in der vorliegenden Studie das Vorkommen des Glukokortikoidrezeptors (GR) im Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose sowie in primären endometrialen Stromazellen dieser Patientinnen mittels Immunfluoreszenz lokalisiert und mittels Western-Blot quantifiziert. Zudem wurde der Einfluss des Epithels auf die stromale Expression des GR analysiert.

Es zeigte sich, dass der GR primär in den uterinen Epithelzellen lokalisiert ist. Interessanterweise zeigte sich eine verstärkte Ausbildung des GR in den Stromazellen, wenn das Endometrium weniger Drüsenepithelien enthielt. Dies zeigte sich auch in der In-vitro-Kultur isolierter primärer endometrialer Stromazellen, die bei Abwesenheit von Epithelzellen ein stark erhöhtes Vorkommen des GR aufwiesen, was auf eine mögliche Epithel-Stroma-Interaktion bei der Expression und Lokalisation des GR hindeutet. Ein signifikanter Unterschied im Vorkommen des GR zwischen den Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose konnte nicht beobachtet werden.

Deletion von Protamin-2 resultiert in muriner, männlicher Infertilität – Haploinsuffizienz nicht

S. Schneider¹, M. Balbach², J. F. Jikeli², D. Fietz², D. Nettersheim¹, S. Jostes¹, R. Schmidt¹, M. Kressin³, M. Bergmann³, D. Wachten², K. Steger⁴, H. Schorle¹

¹Abteilung für Entwicklungspathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn; ²Minerva Max Planck Forschungsgruppe - Molekulare Physiologie, Center of Advanced European Studies and Research, Bonn; ³Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie; ⁴Abteilung für Urologie, Pädiatrische Urologie und Andrologie, Sektion Molekulare Andrologie, Biomedizinisches Forschungszentrum der Justus-Liebig Universität, Giessen

Protamine sind Arginin-reiche, DNA-bindende Proteine, die in elongierenden Spermien schrittweise Histone ersetzen. Dies führt zu einer Hyperkondensation des Chromatins und ist von essenzieller Bedeutung für eine

physiologische Spermienmorphologie und den Erhalt der DNA-Integrität. In menschlichen und murinen Spermien werden 2 Protamin-Gene, Protamin-1 (Prm1) und Protamin-2 (Prm2) exprimiert, welche schließlich in einem Spezies-spezifischen Proteinverhältnis in das Spermienom genom inkorporiert werden. Abweichungen von diesem Mengenverhältnis sollen beim Menschen in Subfertilität resultieren.

Durch CRISPR/Cas9-vermitteltes Gen-editing in befruchteten Eizellen haben wir ein Allel des Prm2-Gens deletiert und Mauslinien etabliert. Überraschenderweise sind heterozygote Männchen fertil. Morphologie und Motilität der Spermien unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und heterozygoten Tieren. Bei Prm2-/- Spermien hingegen waren DNA-Hyperkondensation und Akrosombildung stark beeinträchtigt. Die Spermien waren vollständig immotil und zeigten schwere Membrandefekte. Ein Verlust von Protamin-2 führt also nicht nur zu einer Störung der DNA-Hyperkondensation, sondern darüberhinaus zu schweren Membrandefekten, die schließlich in Immotilität der Spermien münden. Interessanterweise zeigten die 2001 publizierten Prm2-defizienten Mäuse, die durch homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen und anschließende Blastozysteninjektion generiert wurden, schwerere Defekte. Hier waren bereits die chimären Tiere steril. Die hier beschriebenen Prm2-defizienten Mauslinien zeigen jedoch eindrucksvoll, dass Maus-Spermien den Verlust eines Prm2-Allels ohne phänotypische Auswirkung tolerieren. Damit stellen die hier etablierten Mauslinien ein ideales Modell für weitere Studien zur Analyse der Protaminfunktion und Chromatinkondensation in Spermien dar.

Verteilung und funktionelle Bedeutung der Carboanhydrasen II und IV im weiblichen Genitaltrakt und im Embryo der Maus

S. Schumann, G. Wennemuth
Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen

Einleitung Carboanhydrasen katalysieren die reversible Reaktion von CO₂ und H₂O zu HCO₃⁻ und H⁺ und sind auf diese Weise an einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie der intra- und extrazellulären pH-Regulation, der Sekretion von Bikarbonat oder dem Atemgastransport beteiligt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität der Carboanhydrase-Isoformen II und IV essentiell für die Motilität und Fertilität muriner Spermien ist. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Funktion der Carboanhydrasen II und IV auch für die Fertilität weiblicher Mäuse und die Embryogenese von Bedeutung ist.

Material und Methoden In der hier vorgestellten Studie wurde die Verteilung der Carboanhydrasen II und IV im murinen weiblichen Genitaltrakt und im sich entwickelnden murinen Embryo immunhistochemisch untersucht.

Ergebnisse Im weiblichen Genitaltrakt konnten wir die Carboanhydrase II im isthmischen Tubenepithel, sowie im uterinen glandulären und luminalen Epithel nachweisen. Die Carboanhydrase IV war in den Epithelien des weiblichen Genitaltraktes im nicht-schwangeren Zustand nicht nachweisbar. Interessanterweise zeigte sich jedoch eine Induktion der Carboanhydrase IV im endometrialen Drüsenepithel im Verlauf der Frühschwangerschaft. Im embryonalen Kompartiment ließ sich die Carboanhydrase II im Spongiotrophoblasten nachweisen. Für die Carboanhydrase IV zeigten sich immunhistochemisch deutliche Signale in einer Subpopulation der Trophoblastriesenzellen, sowie in den Trophoblastzellen des sich entwickelnden plazentaren Labyrinths und im Endoterm.

Schlussfolgerung Diese räumlich und zeitlich fein regulierte Verteilung der Carboanhydrasen deutet auf ihre Bedeutung für die Funktion von Dottersack- und hämochorialer Plazenta hin. Weiterführende Untersuchungen in einem Knockout-Mausmodell sollen diese Funktionen weiter charakterisieren.

Unterschiede in der Trophoblastzellinvasion – Vergleich intra- und extrauteriner Implantationsstellen

S. J. Terstege¹, V. Buck¹, U. von Rango², I. Classen-Linke¹

¹Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Uniklinik RWTH Aachen, Deutschland; ²Department of Anatomy & Embryology, Maastricht University, Niederlande

Eine Besonderheit bei der menschlichen Implantation ist die Fähigkeit, die Blastozyste auch extrauterin, also außerhalb des Uterus, zu implantieren. Die häufigste Form dieser ektopten Schwangerschaften ist die Tubargravidität (TG). Bei der eutopen intrauterinen Implantation erfolgt nach der initialen Invasion durch das endometriale Oberflächenepithel eine weitere Invasion durch die Deziidua. Der extravillöse Trophoblast (EVT) durchdringt als endovaskulärer bzw. endoglandulärer Trophoblast die Gefäße und Drüsen von basal. Bei der ektopten TG erfolgt nach Durchdringen des tubaren Oberflächenepithels eine Invasion des EVT durch das lockere Bindegewebe der *Lamina propria* und die muskuläre Wand der *Tuba uterina*. Dies führt letztlich bei einer vitalen Tubargravidität zu einer Ruptur der Eileiterwand und lebensbedrohlichen Blutungen.

Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Implantationsvorgänge besser zu verstehen, wurde die Invasion fetaler Trophoblastzellen in Tubargraviditäten (5.–9. SSW) mit der Invasion in die Deziidua in intrauterinen Schwangerschaften (7.–16. SSW) verglichen.

Hierzu wurde der EVT immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen das humane Leukozytenantigen HLA-G markiert. Um die Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionskontakten zwischen EVT und maternalen Zellen nachzuweisen, wurde in Doppelmarkierungen mit HLA-G das desmosomale Plaques-

protein Desmoplakin detektiert. Deziduaellen wurden mit einem Antikörper gegen Vimentin identifiziert.

Im Bereich der Zotten und Zellsäulen konnte sowohl bei intrauterinen als auch extrauterinen Schwangerschaften eine starke Desmoplakin-Reaktion zwischen den Zytotrophoblastzellen gezeigt werden. Je weiter der EVT von der Zotte entfernt war, desto schwächer wurde die Desmoplakin-Markierung und umso stärker die HLA-G-Expression. Trotzdem zeigten auch einzeln liegende Trophoblastzellen sowohl intra- als auch extrauterin in bestimmten Bereichen, vor allem in Gefäßen, ein positives Signal für Desmoplakin, sodass hier eine desmosomale Bindung zu Endothelzellen postuliert werden kann. Bei der intrauterinen Gravidität infiltrierten die Trophoblastzellen das glanduläre Epithel, lagerten sich von basal dem Drüsenepithel an und durchdrangen es, um die Drüsen für die histiotrophe Versorgung des Embryos zu eröffnen. Im Fall der TG lagerten sich die Trophoblastzellen, die in die *Lamina propria* invadiert waren, dem Oberflächenepithel der Schleimhautfalten von basal an, durchdrangen es aber nicht. Auch in der TG invadierte der EVT maternale Gefäße; Drüsen sind in der *Tuba uterina* jedoch nicht vorhanden. In der TG konnte auch keine Dezidualisierung nachgewiesen werden. Im Vergleich extrauteriner und intrauteriner Proben aus der gleichen Schwangerschaftswoche wurden in den extrauterinen Proben eine sehr viel stärkere Invasion der Trophoblastzellen in das lockere Stroma der *Tuba uterina* und in die Gefäße festgestellt. Die Trophoblastzellen infiltrierten das komplette Gewebe der *Tuba uterina* massiv und wurden nicht wie in den intrauterinen Proben durch Deziduaellen in ihrem Eindringen begrenzt.

HLA-G wird auch in ektopten Schwangerschaften auf dem EVT exprimiert, obwohl es keine Dezidua und – wie man aus vorhergehenden Studien weiß – keine NK-Zellen gibt. Somit ist die Expression unabhängig von der Implantationsstelle. Generell scheinen die Vorgänge der frühen Trophoblastinvasion bei extrauterinen Schwangerschaften in vielen Punkten ähnlich wie bei intrauterinen Schwangerschaften abzulaufen.

Rolle der Notch-Signalkaskade in der Endometriose

D. Thavatheesan¹, L. Kettler¹, M. Hubert¹, B. Greve², A. Schüring¹, M. Götte¹

¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe;

²Klinik für Strahlentherapie-Radiationologie, Universitätsklinikum Münster

Einleitung Endometriose ist durch außerhalb des Cavum uteri auftretendes funktionell endometriales Gewebe gekennzeichnet. Die betroffenen Patientinnen leiden unter Verwachsungen im Unterleib, die häufig Schmerzen, Dysmenorrhoe und Sterilität hervorrufen. Das Stammzellkonzept der Endometriose postuliert, dass eine Auswanderung endometrialer Stammzellen aus dem Uterus, welche eine hohe Proliferation und Dif-

ferenzierungsfähigkeit während der Menstruationszyklen ausweisen, die Ausbildung und Persistenz von Endometrioseherden begünstigt. Die erhöhte Expression des adulten Stammzellmarkers Musashi-1 in ektopten Endometrioseherden und Endometriumkarzinomgewebe [Götte et al. J Pathol 2008] legt eine Rolle des Notch-Msi1-Signalweges bei diesen Erkrankungen nahe. Das RNA-bindende Protein Musashi1 erfüllt eine regulatorische Funktion in der Notch-Signalkaskade, welche bei der Zell-Zell-Kommunikation zur Bestimmung des „cell-fate“ entscheidend ist. Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Auswirkung einer Hemmung dieses Signalwegs auf die Eigenschaften von Endometriosezellen in vitro im Hinblick auf zukünftige therapeutische Ansätze.

Material und Methoden In der immortalisierte Endometriosezell-Linie I2Z und in Primärzellkulturen von Endometriosepatientinnen wurde der Msi-Notch-Signalweg mittels siRNA gegen Msi1 und Msi2, sowie mittels Gamma-Sekretase-Inhibitoren (GSI), welche die Notch-Aktivierung verhindern, inhibiert. Die Auswirkungen auf das Zellverhalten wurden mittels MTT-Assay, Zellzyklusanalyse und Annexin V-Apoptoseassay untersucht. Auswirkungen der Behandlung auf Notch-assoziierte Signalwege wurden mittels TaqMan low density array (TLDA), qPCR, Durchflusszytometrie und Western-Blotting analysiert.

Ergebnisse GSI-Behandlung und Msi-Knockdown führten zu einer Hemmung der Zellproliferation und zu einer Erhöhung der Apoptoserate. Nach GSI-Behandlung wurde in I2Z-Zellen eine Umverteilung der Zellzyklusphasen von der S-Phase zur G2-Phase nachgewiesen. TLDA- und qPCR-Analysen zeigten eine Fehlregulation zahlreicher Stammzell-assoziiierter Faktoren, wie LIFR, SOX2, PODXL und IFITM1 auf, welche im Falle des LIFR auf Proteinebene bestätigt werden konnten.

Schlussfolgerung Eine Hemmung des Notch-Msi-Signalwegs führt in Endometriosezellen zu einer Hemmung des Zellwachstums und zu einer vermehrten Apoptose. Die Genexpressionsanalysen weisen auf neue Zusammenhänge zwischen dem Msi-Notch-Signalweg und weiteren Stammzell-assoziierten Wegen hin, wobei im Besonderen die Fehlregulation des LIFR die Möglichkeiten zukünftiger therapeutischer Ansätze erweitern könnte.

Einfluss der Epithel-Stroma-Interaktion auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen

J. Thomczik¹, I. Beyer², D. M. Baston-Büst², S. J. Bötdeker², G. Wennemuth¹, A. P. Bielfeld², R. Grümmer¹

¹Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen; ²UnikID- Universitätsfrauenklinik Düsseldorf

Einleitung Endometriose ist eine Erkrankung, die durch das Auftreten von Endometriosegewebe außerhalb der Gebärmutter-

höhle charakterisiert ist. Sie betrifft mehr als 10 % der Frauen im gebärfähigen Alter und ist häufig mit starken abdominalen Schmerzen und Subfertilität assoziiert. Die Induktion der Dezidualisierung, d. h. der terminalen Differenzierung der endometrialen Stromazellen, stellt einen vielversprechenden innovativen Therapieansatz dar. Bislang wurden Untersuchungen hierzu jedoch überwiegend an isolierten endometrialen Stromazellen durchgeführt. Da neuere Studien darauf hinweisen, dass auch die endometrialen Drüsenepithelzellen eine Rolle bei der Induktion der Dezidualisierung spielen könnten, wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss der Epithelzellen auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen untersucht.

Material und Methoden Endometriales Gewebe von jeweils 10 Patientinnen mit und ohne Endometriose wurde in der Klinik für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf entnommen. Das Verhältnis von Epithel- zu Stromazellen im nativen Endometrium wurde nach immunhistochemischer Färbung für Cytokeratin und DNA bestimmt. Die Isolation endometrialer Stromazellen (ESCs) und Epithelzellen (EECs) erfolgte mittels enzymatisch-mechanischem Verdau. Zusätzlich wurden die endometrialen Epithelzell-Linien HEC1a, Ishikawa und RL95-2 (American Type Culture Collection) verwendet. ESCs wurden alleine (Kontrolle), in Ko-Kultur mit Epithelzellen oder unter Zugabe von Überstand kultivierter Epithelzell-Linien oder kultivierter EECs mit Progesteron (1 µM), MPA (1 µM), cAMP (0,5 mM) und Forskolin (25 µM) alleine oder mit Progesteron in Kombination mit cAMP oder Forskolin für 6–15 Tage behandelt. Die Ko-Kultur erfolgte entweder direkt in Monolayern oder unter Verwendung Matrigel beschichteter Inserts. Zur Evaluation der optimalen Matrigel-Konzentration wurden Mengen von 0,5–10 mg/ml getestet. Das Ausmaß der Dezidualisierung wurde anhand der Prolaktin-Konzentration im Mediumüberstand mittels ELISA (IBL) bestimmt.

Ergebnisse Abhängig von der Zyklusphase beträgt der physiologische Anteil der Epithelzellen im nativen Endometrium 25–50 % der Zellen. Dieses Zellverhältnis wurde daher in allen Versuchen eingesetzt. Ein gut polarisiertes Wachstum der Epithelzellen zeigte sich auf mit 0,5 mg/ml Matrigel beschichteten Inserts. In der 2D-Ko-Kultur mit endometrialen Epithelzellen zeigten mit MPA behandelte Stromazellen von Endometriose-Patientinnen eine reduzierte Dezidualisierung. Ebenso verminderten EECs unabhängig vom Grad der Zellpolarisation sowie der Induktionsart der Dezidualisierung (cAMP- oder Progesteron-vermittelter Signalweg) indirekt durch sezernierte Faktoren die Dezidualisierung der primären endometrialen Stromazellen.

Schlussfolgerung Die reduzierte Prolaktinsekretion sowohl nach direkter wie nach indirekter Interaktion zwischen ESCs mit endometrialen Epithelzelllinien sowie mit primären EECs weist auf einen hemmenden Einfluss endometrialer Epithelzellen auf die Dezidualisierung von ESCs hin.

Autorenverzeichnis (nur Erstautoren)

| | | |
|---|---|---|
| <p>B</p> <p>Beyer I.19</p> <p>Brandhorst C.19</p> <p>E</p> <p>Ernst J.20</p> <p>G</p> <p>Gougoula C.20</p> | <p>I</p> <p>Ibrahim M. G.21</p> <p>M</p> <p>Muschol M.21</p> <p>O</p> <p>Ossendorf J.21</p> <p>R</p> <p>Rusch G.22</p> | <p>S</p> <p>Schneider S.22</p> <p>Schumann S.22</p> <p>T</p> <p>Terstegge S. J.22</p> <p>Thavatheesan D.23</p> <p>Thomczik J.23</p> |
|---|---|---|

**Alle angenommenen Abstracts der Februartagung
 50. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung
 und
 42. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung
 15.2.–17.2.2017 in München, Martinsried finden Sie online:**

<http://www.kup.at/kup/pdf/13832.pdf>

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)