

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde  
und Geburtshilfe - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Hepp

Direkter Einfluss von Spermatozoen  
und seminalem Plasma  
auf das Endometrium

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Stefanie Gutsche**

aus

**Augsburg**

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. C.J. Thaler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Wolff
	Priv. Doz. Dr. U. Peschers
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. von Wolff
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	15.12.2003





*Der Mensch wird gesund genannt,  
dessen Physiologie im Gleichgewicht ist,  
dessen Verdauung und Stoffwechsel gut arbeiten,  
dessen Gewebe und Ausscheidungen normal sind,  
und  
dessen Seele, Geist und Sinne sich im Zustand  
dauerhaften Glücks befinden.*

**Sushruta, ca. 700 v. Chr.**  
***Sutrasthanam 15 - 41***



Μητρὶ καὶ πατρὶ ἐμοῦ ;



Οἶδα οὐδέν εἰδώς ;

[dt.: Ich weiß, daß ich nichts weiß. Sokrates ]











---

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I – III</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>IV – V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII – VIII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Oligonukleotide und Sonden .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Patienten und Gewebeproben .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Patientenauswahlkriterien für die Endometriumzellkultur .....	5
2.2.2. Asservierung von Endometriumgewebe und Serum .....	5
2.2.3. Dokumentation .....	6
2.2.4. Patientenauswahl für die Ejakulatanalyse .....	6
<b>2.3. Chemikalien, Enzyme und Antikörper .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Zellisolierung .....</b>	<b>9</b>
3.1.1. Endometriale Epithel- und Stromazellen .....	9
3.1.1.1. Aufarbeitung des Endometriumgewebes .....	9
3.1.1.2. Isolierung der Epithel- und Stromazellen .....	9
3.1.1.3. Aufreinigung der Stromazellen .....	10
3.1.2. Seminalplasma und Spermien .....	10
3.1.2.1. Präparation der Spermien und swim up - Technik .....	10
3.1.2.2. Aufreinigung der Spermien .....	11
3.1.2.3. Isolierung von Seminalplasma .....	11
<b>3.2. Zellkultur .....</b>	<b>11</b>
3.2.1. Endometriumkultur .....	11
3.2.1.1. Beschichten der Einsätze mit Matrigel für die Epithelzellkultur .....	11
3.2.1.2. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität .....	12
3.2.1.3. Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	12
3.2.1.3.1. Zellkulturmedien .....	12
3.2.1.3.2. Kultivieren der Epithel- und Stromazellen .....	12

3.2.1.4. Vitalitätsnachweis der Epithel- und Stromazellen .....	13
3.2.1.5. Kokultur der Epithel- und Stromazellen .....	13
3.2.1.5.1. Kokultur der Epithelzellen und Stromazellen mit Seminalplasma .....	14
3.2.1.5.2. Kokultur der Epithelzellen mit verschiedenen Zytokinen .....	14
3.2.2. Kultur der Spermien .....	14
3.2.2.1. Bestimmung der Spermienzahl .....	14
3.2.2.2. Kultivierung der Spermien .....	15
<b>3.3. Nukleinsäuretechniken .....</b>	<b>15</b>
3.3.1. RNA-Isolierung .....	15
3.3.2. Quantifizierung der RNA .....	15
3.3.3. Überprüfung der RNA auf Unversehrtheit .....	16
3.3.4. RNase Protection Assay (RPA) .....	16
3.3.5. cDNA-Synthese .....	19
3.3.6. PCR .....	19
3.3.7. Dokumentation der PCR-Produkte .....	20
<b>3.4. Immunologische Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.4.1. Beladung der Dynabeads .....	20
3.4.2. ELISA .....	20
<b>3.5. Statistik .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Spermien .....</b>	<b>22</b>
4.1.1. Nachweis der RNA-Sekretion .....	22
4.1.1.1. Nachweis der RNA im RPA .....	22
4.1.1.2. Bestätigung mittels RT-PCR .....	23
4.1.2. Nachweis der Protein-Sekretion .....	24
<b>4.2. Seminalplasma .....</b>	<b>24</b>
4.2.1. Konzentrationsbestimmung der Zytokine und Wachstumsfaktoren .....	24
4.2.2. Nachweis der Inhibierung von TGF- $\beta$ 1 durch seinen spezifischen Antikörper .....	25
<b>4.3. Endometriale Epithel- und Stromazellen .....</b>	<b>26</b>
4.3.1. Vitalitätsnachweis der Endometriumzellen .....	26
4.3.1.1. Vitalitätsnachweis der Epithelzellen .....	26
4.3.1.2. Vitalitätsnachweis der Stromazellen .....	26
4.3.2. Expression der Zytokin-Rezeptoren unter Stimulation mit Seminalplasma .....	27
4.3.2.1. Expression der Zytokin-Rezeptoren in Epithelzellen .....	27
4.3.2.2. Expression der Zytokin-Rezeptoren unter Stimulation mit Seminalplasma in Stromazellen .....	29
4.3.3. Untersuchung der Regulation der Expression pro-inflammatorischer Zytokine unter Stimulation mit Seminalplasma .....	29
4.3.3.1. Durchführung der Versuche an Epithelzellen .....	29
4.3.3.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma .....	29
4.3.3.1.2. Zeitabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma .....	34
4.3.3.1.3. Effekt der Stimulation mit denaturiertem Seminalplasma .....	37
4.3.3.1.4. Vergleich der Expression in verschiedenen Zyklusphasen .....	39

---

4.3.3.2. Durchführung der Versuche in Stromazellen.....	42
4.3.3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma.....	42
4.3.3.2.2. Zeitabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma.....	44
4.3.4. Untersuchung der Regulation der Expression pro-inflammatorischer Zytokine unter Stimulation mit rekombinanten Zytokinen in Epithelzellen .....	44
4.3.4.1. Stimulierung mit VEGF .....	44
4.3.4.2. Stimulierung mit IL-8.....	45
4.3.4.3. Stimulierung mit TGF- $\beta$ 1.....	46
4.3.4.4. Gesamtschau.....	47
4.3.4.5. Stimulierung mit TGF- $\beta$ 1,2,3-Antikörper im Seminalplasma.....	48
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1. Endometriale Dysregulation als Ursache der Infertilität.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2. Allgemeines zur Implantation.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3. Die Bedeutung der untersuchten Zytokine für das Endometrium.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4. Grundlagen der uterinen Seminalplasma- und Spermien-Azension.....</b>	<b>57</b>
<b>5.5. Die Zusammensetzung des Ejakulates und dessen Bedeutung.....</b>	<b>59</b>
<b>5.6. Die Zusammensetzung des Seminalplasmas.....</b>	<b>61</b>
<b>5.7. Die Bedeutung einiger in großen Mengen vorkommenden Faktoren im Seminalplasma.....</b>	<b>61</b>
<b>5.8. Bemerkenswertes für die Etablierung einer Schwangerschaft.....</b>	<b>68</b>
<b>5.9. Schlussbetrachtung und Ausblick .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>74</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>85</b>

**Abkürzungen**

Ak	Antikörper
ART	assistierte Reproduktionsverfahren
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
cDNA	komplementäre DNA
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CN(T)F	„ciliary neurotropic factor“
CT-1	Cardiotrophin 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM/HAM F-12	„Dulbecco´s modified Eagle´s medium nutrient mixture Ham F-12“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„epidermal growth factor“
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
gp	Glykoprotein
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
G-CSF	„granulocyte colony-stimulating factor“
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“
h	human
HBSS	Hanks´gepufferte Salzlösung („Hanks Balt. Salt Solution“)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IgG	Immunglobulin vom Isotyp G
IL	Interleukin
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
LIF	„Leukaemia inhibitory factor“
$\lambda$	Wellenlänge
mCi	milli Curie
mRNA	„messenger RNA“
MEM	„Minimum essential medium“
MG	Molekulargewicht
nt	Nukleotide „nucleotids“
OSM	Oncostatin M
p55	Protein mit MG 55 kDa
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“)
PER	Ammoniumpersulfat
PG	Prostaglandin
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	RNase Protection Assay
RT	Raumtemperatur

---

RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SP	Seminalplasma
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor („transforming growth factor“)
Th1	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
Th2	T-Helfer-Zellen vom Typ 2
Th3	T-Helfer-Zellen vom Typ 3
TNF	Tumornekrosefaktor („tumor necrosis factor“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	„transfer RNA“
U	Unit (Aktivitätseinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Urea	Harnstoff
UTP	Uridintriphosphat
ü.N.	über Nacht
VEGF	„vascular endothelial growth factor“

**Tabellenverzeichnis**

1. Sonden für den RNase Protection Assay .....	4
2. Oligonukleotide .....	5
3. PCR-Bedingungen für die verwendeten Primer .....	18
4. Konzentrationen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren im SP-Pool .....	24

**Abbildungsverzeichnis**

1: PCR; Nachweis der RNA-Expression in Spermien .....	23
2: Nachweis der Vitalität einer Epithelzellkultur .....	26
3: Nachweis der Vitalität einzelner endometrialer Stromazellen .....	27
4: RPA; Expression der Rezeptor-mRNA in Epithelzellen .....	28
5: RPA; Abhängigkeit der Zytokin-Expression in Epithelzellen von der SP-Konzentration	30
6: PCR; Abhängigkeit der Zytokin-Expression in Epithelzellen von der SP-Konzentration	31
7: Expression der TNF $\alpha$ -mRNA in Abhängigkeit von der SP-Konz. ....	32
8: Expression der IL-1 $\beta$ -mRNA in Abhängigkeit von der SP-Konz. ....	32
9: Expression der IL-6-mRNA in Abhängigkeit von der SP-Konz. ....	33
10: Expression der LIF-mRNA in Abhängigkeit von der SP-Konz. ....	33
11: Expression diverser Zytokin-mRNA in Abhängigkeit von der SP-Konz. ....	34
12: RPA; Abhängigkeit der Zytokin-Expression in Epithelzellen von der Stimulationsdauer mit Seminalplasma .....	35
13: Expression der IL-1 $\beta$ -mRNA in Abhängigkeit von der Expositionsdauer mit 10% SP ...	36
14: Expression der IL-6-mRNA in Abhängigkeit von der Expositionsdauer mit 10% SP .....	36
15: Expression der LIF-mRNA in Abhängigkeit von der Expositionsdauer mit 10% SP .....	37
16: RPA; Effekt der Stimulation mit denaturiertem Seminalplasma in Epithelzellen .....	38
17: Expression diverser Zytokin-mRNA nach Stimulierung mit denaturiertem SP .....	39
18: Expression diverser Zytokin-mRNA in der Follikelphase .....	40
19: Expression diverser Zytokin-mRNA in der frühen und mittleren Lutealphase .....	40
20: Expression diverser Zytokin-mRNA in der späten Lutealphase .....	41
21: Vergleich der Zyklusphasen bezüglich der mRNA-Expression diverser Zytokine .....	41
22: RPA; Abhängigkeit der Zytokin-Expression in Stromazellen von der SP-Konz. ....	43
23: Expression diverser Zytokin-mRNA in Epithelzellen nach Stimulierung mit VEGF .....	45

24: Expression diverser Zytokin-mRNA in Epithelzellen nach Stimulierung mit IL-8 .....	46
25: Expression diverser Zytokin-mRNA in Epithelzellen nach Stimulierung mit TGF- $\beta$ 1 ...	47
26: Vergleich der mRNA-Expression diverser Zytokine in Epithelzellen nach Stimulierung mit VEGF, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 .....	48
27: Expression diverser Zytokin-mRNA in Epithelzellen nach Stimulierung mit TGF- $\beta$ -Antikörper im Seminalplasma.....	49

## 1. Einleitung

Wie in der Literatur mehrfach beschrieben, suchen etwa 14 % aller Paare in Deutschland wegen eines unerfüllten Kinderwunsches medizinische Betreuung und Hilfe (u.a. Ochsenkühn et al. 1998). Da konservative Behandlungsmethoden sehr oft nicht den gewünschten Erfolg zeigen, bleibt für viele Paare nur die Anwendung assistierter Reproduktionsverfahren, wie die *in vitro* Fertilisation (IVF) oder die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Die Anwendung dieser Verfahren führt aber nur in ungefähr 20% der Embryonentransfers zu einer erfolgreichen Schwangerschaft. Als eine der möglichen Ursachen für dieses unbefriedigende Ergebnis wird ein Implantationsversagen angesehen, das sich vermutlich auf ein nicht rezaptives Endometrium zurückführen lässt (Salamonsen et al. 2000). Der Implantationsprozess wird bisher allerdings nur ansatzweise verstanden. Sind jedoch die Adhäsion und die Invasion der Blastozyste in das Endometrium gestört, führt dies letztendlich zum Untergang des Embryos. Eine besondere Bedeutung bei der endometrialen Regulation der Implantationsvorgänge scheint den Zytokinen zuzukommen. Endometriale Zytokine werden von allen Zelltypen des Endometriums exprimiert und zwar größtenteils mit einem Maximum im sog. Implantationsfenster. Dieses Implantationsfenster umschreibt eine kurze Phase, in der die Rezeptivität des Endometriums für die Implantation des Embryos gegeben ist. In dieser Zeit erlaubt ein empfindliches Gleichgewicht von Zytokinen und anderen Mediatoren in den endometrialen Epithel-, Stroma- und Immunzellen den Prozess der Implantation. Dieser wird von folgenden Faktoren beeinflusst und gesteuert:

Das Endometrium bildet die Schleimhaut, die das Cavum uteri auskleidet. Es besteht aus zwei Zellpopulationen, der epithelialen Zellpopulation und dem endometrialen Stroma.

Die epitheliale Zellpopulation besteht aus dem Oberflächenepithel und den verschiedenen glandulären epithelialen Zellen, die sich in den tubulösen Drüsen des Stratum basale und des Stratum functionale befinden.

Das endometriale Stroma besteht aus retikulärem Bindegewebe, das besonders viel Lymphozyten und Granulozyten während der Lutealphase enthält. Das retikuläre Bindegewebe setzt sich aus einer speziellen Population von Fibroblasten zusammen, die sich schnell in Deziduazellen transformieren können, wenn es zur Anlagerung und Implantation eines Embryos kommt.

Beide Zellpopulationen haben für die Etablierung einer Schwangerschaft spezielle Funktionen. Das Endometrium ist von stark proliferierenden Blutgefäßen durchzogen, die die Versorgung eines erfolgreich eingenisteten Embryos gewährleisten.

Zur erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft muss das Endometrium der Blastozyste günstige Bedingungen für die Implantation bieten. Es muss adäquat proliferiert, transformiert und funktionell unbeeinträchtigt sein. Diese Reifung des Endometriums wird jedoch nicht in jedem Menstruationszyklus erreicht, bei der fertilen Frau in etwa 2/3 der Fälle, bei der subfertilen Frau in deutlich geringerer Häufigkeit. Bis heute gibt es allerdings noch keine allgemein akzeptierten molekularen und zellulären Parameter für die eindeutige Definition der Rezeptivität des Endometriums (Beier et al. 2001).

Neben der Rezeptivität des Endometriums kommt der Beschaffenheit des Ejakulats für die Etablierung einer Schwangerschaft besondere Bedeutung zu. Dieses setzt sich aus Spermien und Seminalplasma zusammen. Das Seminalplasma beinhaltet große Konzentrationen an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Prostaglandinen, wie IL-8, VEGF, G-CSF, GM-CSF, TGF- $\beta$  und PG-E2 (Srivastava et al. 1996, Huleihel et al. 1996, Gutsche et al. 2002). Beim Koitus kommt es zum Einbringen des Ejakulates in den weiblichen Genitaltrakt, wo es unter geeigneten Bedingungen zur Etablierung einer erfolgreichen Schwangerschaft führt. Inwiefern außer den Spermien auch Seminalplasma in den oberen weiblichen Genitaltrakt gelangt, versuchten Leyendecker et al. 1996 und Kunz et al. 1997 durch ihre Experimente mit Technetium-gelabelten Makrosphären, die Spermiengröße besaßen, zu klären. Sie legten die Makrosphären am äußeren Zervix-Mund ab und konnten feststellen, dass diese aufgrund der subendometrialen und myometrialen peristaltischen uterinen Wellenbewegungen in der Lage sind, den Zervixpfropfen zu penetrieren und innerhalb einer Minute bis zu den Tuben vorzudringen. Diese Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass nicht nur Spermien, sondern auch Seminalplasma über die Zervix in das Cavum uteri gelangen. Dort wird das Endometrium sehr wahrscheinlich mit dem Seminalplasma interagieren, um die geeigneten Voraussetzungen für die Implantation der Blastozyste zu schaffen. Diese Implantation wird durch ein ausgewogenes Netzwerk an Mediatoren in Epithel-, Stroma- und Immunzellen erleichtert. Einige dieser Faktoren werden während der Präimplantationsperiode verstärkt exprimiert, wie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 (Tabibzadeh et al. 1994, von Wolff et al. 2002a), IL-1 $\beta$  (Simón et al. 1993, von Wolff et al. 2000) und LIF (Charnock-Jones et al. 1994, von Wolff et al. 2000). IL-6, IL-1 $\beta$  and LIF gehören zu dem noch kaum verstandenen Netzwerk-Komplex endometrialer Zytokine, die durch diverse andere parakrine Faktoren, wie beispielsweise IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  reguliert werden (Tabibzadeh et al. 1989, von Wolff et al.

2002b). Zudem konnte durch in vitro-Experimente in Tierversuchen gezeigt werden, dass Seminalplasma einen Einfluss auf die endometrialen Epithelzellen ausübt. So enthält das Seminalplasma der Maus in hohen Konzentrationen TGF- $\beta$ , das die Ausschüttung anderer pro-inflammatorischer Zytokine einschließlich GM-CSF in vivo und in vitro stimuliert (Tremellen et al. 1998)

Es stellt sich nun die Frage, ob der Einfluss von Seminalplasma auf das rezeptive humane Endometrium nachweisbar und die Auswirkungen auch klinisch messbar sind. Dazu führten bereits 1986 Bellinge et al., wie später auch andere, in kontrollierten klinischen Studien bei IVF-Patienten den Nachweis, dass die endometriale Funktion durch den Kontakt mit Seminalplasma beeinflusst und dadurch die Implantationsrate der Blastozyste verbessert werden kann. Das Endometrium erfährt durch den Kontakt mit den im Seminalplasma enthaltenen Substanzen offensichtlich einige bedeutsame Stimulationen, die dann für die Implantation der Blastozyste eine wichtige Rolle spielen. Allerdings ist der Einfluss des Seminalplasmas auf die Regulierung der endometrialen Funktion im Menschen bislang noch nicht eingehend untersucht worden.

In dieser Arbeit soll die Bedeutung von Seminalplasma und Spermien für die Regulation der endometrialen Funktion eruiert werden. Dabei sollen die Spermien, das Seminalplasma und insbesondere die im Seminalplasma in hohen Konzentrationen vorkommenden Faktoren bezüglich ihrer Wirkung auf das Endometrium und bezüglich ihrer Wirkung auf die Zytokin-Expression im humanen Endometrium analysiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, Möglichkeiten für eine Erhöhung der Implantationsrate und damit auch für eine verbesserte IVF-Behandlung aufzuzeigen.

## 2. Material

### 2.1. Oligonukleotide und Sonden

Die DNA-Sonden wurden von der Fa. BD PharMingen nach eigener Vorgabe synthetisiert.

Sonden- (Template) Set	Ungeschützte Probe (nt)	Geschützte Probe (nt)
<b>Rezeptor-Sonde</b>		
h IL-1R I	389	360
h IL-1R II	349	320
h TNF R p75 (A)	315	287
h TNF R p55	284	255
h IL-6 R $\alpha$	256	228
h gp 130	231	202
h LIF R $\alpha$	210	182
h TGF $\beta$ R II	191	162
h L32	141	113
h GAPDH	124	96
<b>Zytokin-Sonde</b>		
h FAS L	379	351
h TNF $\alpha$	314	286
h IL-1 $\beta$	257	230
h IL-6	211	182
h LIF	190	161
h L32	141	113
h GAPDH	124	96

**Tab. 1:** Sonden für RNase Protection Assay

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Basenpaare
IL-1 $\beta$ Primer up	<b>GGA TAT GGA GCA ACA AGT GG</b>	
IL-1 $\beta$ Primer down	<b>AGT TAC CAG TTG GGG AAC TG</b>	<b>263</b>
IL-6 Primer up	<b>ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC</b>	
IL-6 Primer down	<b>G AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG</b>	<b>628</b>
LIF Primer up	<b>CAG CTC AAT GGC AGT GCC AA</b>	
LIF Primer down	<b>GTT CAC AGC ACA CTT CAA GAC</b>	<b>477</b>
TNF $\alpha$ Primer up	<b>CGA GTG ACA AGC CTG TAG CC</b>	
TNF $\alpha$ Primer down	<b>GTT GAC CTT GGT CTG GTA GG</b>	<b>254</b>
$\beta$ -Actin Primer up	<b>GAT GCA GAA GGA GAT CAC TG</b>	
$\beta$ -Actin Primer down	<b>AGT CAT AGT CCG CCT AGA AG</b>	<b>205</b>

CO-I Primer up	CGT CAC AGC CCA TGC ATT TG	
CO-I Primer down	GGT TAG GTC TAC GGA GGC TC	268

**Tab. 2:** Oligonukleotide

## **2.2. Patienten und Gewebeproben**

### **2.2.1. Patientenauswahlkriterien für die Endometriumzellkultur**

Die Gewinnung des Endometriums aus den verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus im Rahmen von Hysterektomien erfolgte bei prämenopausalen Frauen, die am Vortag der Operation über dieses Projekt aufgeklärt worden waren und ihr Einverständnis zur Gewebeentnahme gegeben hatten.

Voraussetzung für die Auswahl waren regelmäßige Menstruationszyklen. Ausschlusskriterien waren neben Zyklusunregelmäßigkeiten eine weniger als drei Monate zurückliegende hormonelle oder antihormonelle Therapie, das Tragen von Intrauterinpessaren sowie Hinweise oder ein Verdacht auf neoplastische bzw. maligne Prozesse.

Aufgrund dieser Auswahlkriterien lauteten die möglichen Diagnosen, die eine Hysterektomie indizierten:

- symptomatischer Uterus myomatosus
- Hypermenorrhoe
- Dysmenorrhoe
- Descensus uteri

### **2.2.2. Asservierung von Endometriumgewebe und Serum**

Zur Mitwirkung an der Studie erklärten sich die Gynäkologen der Krankenhäuser 3. Orden, Harlaching und Großhadern in München bereit. Die Probenentnahme erfolgte nach Absprache mit dem verantwortlichen Pathologen direkt im Anschluss an die Hysterektomie im Operationssaal unter sterilen Bedingungen. Zuerst wurde ein „Prevical“-Katheter über den Zervixkanal in den Uterus eingeführt; dieser diente bei der Eröffnung des Uterus mit dem Skalpell als Führungsstab. Der Uterus wurde über die Adnexstümpfe und den Fundus uteri sagittal eröffnet. Das Gewebe wurde makroskopisch beurteilt, auf Auffälligkeiten wie Myomknoten oder sonstige Veränderungen abgesehen und die Höhe des aufgebauten glatten, nicht zystischen Endometriums abgeschätzt.

Anschließend wurde vom Fundusbereich des Cavum uteri ca. 75 % des Endometriums mit dem Skalpell kürettiert und in ein steriles, mit 4 ml Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Der Transport bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei Raumtemperatur.

Bei der narkotisierten Patientin wurde entweder aus einer liegenden Kanüle oder durch frische Venenpunktion etwa 10 ml Blut in Serumröhrchen entnommen. Das Blut wurde im Forschungslabor 10 min bei 1300 g zentrifugiert, das Serum in sterile Eppendorf-Cups zu je 1 ml abpipettiert und bei -20 °C schockgefroren. Das Serum wurde bis zur Bestimmung von Östradiol und Progesteron zur genaueren Zyklusdatierung bei -70 °C gelagert.

### 2.2.3. Dokumentation

Aus der Krankenakte wurden folgende Daten entnommen und dokumentiert: Name und Geburtsdatum der Patientin, die gynäkologische Diagnose sowie Zyklusanamnese und Besonderheiten im Zyklusverlauf. Bei der Gewebeentnahme erhielt die bearbeitete Kultur eine fortlaufende Nummer und wurde mit Datum des Entnahmetages festgehalten. Das operative Verfahren, vaginale oder abdominelle Hysterektomie cum oder sine Adnexe, die Entnahme des Uterus in toto bzw. dessen Morcellement, die geschätzte Dauer zwischen der Ligatur der Arteria uterina und der Entnahme des Endometriums sowie die Höhe der aufgebauten Endometriumschleimhaut und deren Einteilung in die drei Kategorien:

1 = flach, bis zu 2 mm hoch

2 = mäßig hoch, bis zu 5 mm hoch

3 = hoch, mehr als 5 mm hoch

wurden ebenfalls vermerkt. Auch andere Auffälligkeiten bei der Inspektion des Uterus wie blutreiches Cavum, große Myomknoten im Cavum, sehr kleines Cavum etc. wurden notiert. Außerdem wurde die Größe des Uterus abgeschätzt.

Insgesamt wurden 33 Patientinnen hysterektomiert. Die Indikation zur Hysterektomie lautete bei allen Patientinnen Uterus myomatosus. Als Zusatzdiagnosen fanden sich bei einigen der Patientinnen Hyper- und Dysmenorrhoe. Die Hysterektomien wurden in der Regel sine Adnexe ausgeführt, nur bei einer Pat. wurden diese auch entfernt. Bei 18 Patientinnen wurde eine abdominelle Hysterektomie durchgeführt, bei 15 Pat. eine vaginale Hysterektomie. Der Uterus wurde in der Regel in toto entfernt, nur bei 4 Patientinnen wurde er beschädigt, bei zweien total zerstückelt. Die Höhe der aufgebauten Endometriumschleimhaut wurde wie folgt klassifiziert: 6 Uteri mit Endometriumshöhe 3, 3 mit Endometriumshöhe 2-3, 17 mit Höhe 2, 1 mit Höhe 1-2 und 6 mit Höhe 1.

Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 44 Jahren, im Bereich von 29 bis 53 Jahren.

Die Einteilung der Proben in die verschiedenen Zyklusphasen erfolgte nach Noyes et al. 1950.

### 2.2.4. Patientenauswahl für die Ejakulatanalyse

Voraussetzung für die Gewinnung von Seminalplasma und Spermien aus den Ejakulaten fertiler Männer war ein normales Spermogramm mit ausreichender Spermienzahl. Das Alter der Patienten lag zwischen 23 und 47 Jahren. Insgesamt wurden 10 Ejakulate für die Versuche aufbereitet und verwendet.

Name und Geburtsdatum des Patienten sowie das vollständige Spermogramm wurden dokumentiert.

## 2.3. Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein und wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Verbrauchsmaterial wurde bei den Firmen Greiner, Labor Schubert, Laborcenter, Roth, Costar und Sarstedt gekauft.

Folgende Firmen lieferten:

**Ambion (Texas, USA)**

Glykoblue

**Amersham LIFE SCIENCE (Braunschweig)**

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

**Becton & Dickinson (Heidelberg)**

RiboQuant RNase Protection Assay Kit; In Vitro Transkriptions-Kit; RiboQuant Template-Set; Matrigel Matrix ohne Phenolrot, monoklonaler Maus anti-CD 56 Antikörper

**Biochrom (Berlin)**

Trypanblau 0,5% (w/v)

**Dako (Hamburg)**

Monoklonales Maus IgG1

**Dynal (Oslo, Norwegen)**

Dynabeads M-450 CD 4, CD 8, CD14, CD 19, CD 31, CD 45, Epithelial enrich; CELlection Pan Mouse IgG Kit

**Fluka (Neu-Ulm)**

Bromphenolblau

**GIBCO BRL Life Technologies / Invitrogen (Karlsruhe)**

Sequencing Mix [6% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1), 7 M. Urea, 1 x TBE], Trizol, 10 x TBE-Puffer, FCS, PBS, MEM-Medium, Trypsin-EDTA (1 x) Lösung

**Lederle (Münster)**

Nystatin® (steriles Pulver)

**Mo Bi Tec (Göttingen)**

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit

**MSD Sharp & Dohme (Haar)**

Zienam® 500

**MWG-Biotech (Ebersberg)**

Verschiedene Oligonukleotide

**Packard (Groningen, Niederlande)**

Opti-Fluor® Szintillationsflüssigkeit

**Pharmacia (Freiburg)**

Percoll (steril)

**R & D – Systems (Minneapolis, USA)**

ELISA-Systeme; Monoklonaler Maus anti-TGF- $\beta$ 1,2,3 Antikörper

**Roche Diagnostics, früher Boehringer (Mannheim)**

PCR Core Kit, First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, DNA Molecular Weight Marker XIV 100 base pair ladder

**Serva (Heidelberg)**

Absoluter unvergällter Ethanol p.a., MOPS

**Sigma (Deisenhofen)**

Acrylamid-Bisacrylamid (19:1) - Lösung, Harnstoff, Tris-gesättigtes Phenol pH 8,0; TEMED, DMEM-HAM's F12 – Medium ohne Phenolrot, Collagenase Typ I A, steril; rekombinantes humanes IL-8 und VEGF; humanes natürliches TGF- $\beta$ 1, Chloroform (Reinheit 90%), Isopropanol, Mineralöl, 18 M $\Omega$  DNase-, RNase-freies Wasser; Isoamylalkohol, Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA), EDTA, Progesteron, 17 $\beta$ -Östradiol, Ammoniumpersulfat, Kodak BioMax MS-1-Film, Ethidiumbromid, Formamid, Agarose Type V, Natriumacetat, Diethylpyrocarbonat, Xylen-Cyanol, Gentianviolett

**Stefan Gück (Berlin)**

IVF-Medium ohne Phenolrot

**Des Weiteren wurden verwendet:**

„Prevalcal“-Katheter von Nourypharma (Oberschleißheim), 40  $\mu$ m Nylon-Zellsieb von B&D (Franklin Lakes, NJ USA), 180  $\mu$ m Nylon-Filter Typ NY8H von Millipore (Eschborn), 24 well Zellkulturplatten Multiwell™ von B&D (NJ USA), Millicell® CM 0,4  $\mu$ m Zellkulturplatten Einsätze, 12 mm Durchmesser von Millipore (Eschborn); „Magnetic particle concentrator“ MPC-M von Dynal (Hamburg); Probenmischer „Sample mixer“ von Dynal (Hamburg); Filterpapier 35 x 43 cm Modell 583 Geltdrockner von BioRad (München); UVette von Eppendorf (Hamburg); SequiGen GT Gelkammer von BioRad (München); Vortex Genie 2-Gerät von Bender & Hobein (Zürich, Schweiz); 1 ml sterile Insulinspritze 40 I.U. Plastipak von Becton & Dickinson (Heidelberg); Microlance 3 Kanüle 25GA1 0,5 x 25 Nr. 18 von BD (Heidelberg); UVette 220-1600nm RNase-/DNA-/Proteinfrei 50 - 2000 $\mu$ l von Eppendorf (Hamburg); TRIO-Thermoblock von Biometra (Göttingen); ELISA Reader Titertek plus MS2 Reader von ICN Biochemicals (Meckenheim); BioPhotometer von Eppendorf (Hamburg); Speed Vac Concentrator von Bachofer (Reutlingen); Mastercycler 5330 von Eppendorf (Hamburg); LKB (Wallac) 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter; Digital Colour Printer CP-D1E von Mitsubishi (Ratingen); Gel Doc 100 von BioRad (München); Auswertprogramm Quantity One von BioRad (München); Molecular Analyst-Programm Version 1.5 von BioRad (München)

## **3. Methoden**

### **3.1. Zellisolierung**

Es wurden zwei verschiedene Zellisolierungen durchgeführt. Zum einen wurden aus dem Endometrium Epithel- und Stromazellen isoliert, zum anderen wurden aus dem Ejakulat Spermien und Seminalplasma gewonnen. Die genaue Isolierung ist nachfolgend beschrieben. Für die Zellkultur aus den gewonnenen Endometriumzellen wurde als Medium stets steril filtrierte und auf pH 6,9 eingestellte DMEM/HAM's F-12 Medium mit 0,4% Nystatin® (200.000 I.E./l), 0,2% Zienam® (Imipenem und Cilastatin) und 0,12% NaHCO<sub>3</sub> (Natriumbicarbonat) verwendet. Der prozentuale Anteil an FCS variierte und wird daher gesondert angegeben.

#### **3.1.1. Endometriale Epithel- und Stromazellen**

Das entnommene Endometriumgewebe wurde sofort nach der Kürettage des Uterus in 4 ml steriles DMEM/HAM's F-12 Medium mit 10% FCS gegeben. Aus einer Gewebeprobe konnten ca. 12 - 20 Wells epithelialer Zellen für die Zellkultur in ausreichender Zelldichte und genügend Stromazellen gewonnen werden. Die Proben wurden so schnell wie möglich nach der Entnahme ins Labor transportiert. Die Aufarbeitung des endometrialen Gewebes sowie die Kultivierung der Epithel- und Stromazellen wurde in Anlehnung an die Beschreibung von Classen-Linke et al. (1997) durchgeführt.

##### **3.1.1.1. Aufarbeitung des Endometriumgewebes**

Das entnommene Gewebe wurde unter der sterilen Werkbank mit laminarer Strömung aufgearbeitet. Der Inhalt des Transportgefäßes, Endometrium in 4 ml Medium, wurde in eine sterile Petrischale aus Glas überführt und das Transportgefäß mit 2 ml Medium mit 10% FCS gespült und ebenfalls in die Petrischale gegeben. Das Gewebe wurde mit zwei Skalpellens in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und der Suspension Collagenase mit einer Aktivität von 400 U/ml zugefügt, so dass die Endkonzentration 0,15% betrug. Die Suspension wurde vorsichtig in eine 50 ml Zellkulturflasche überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Suspension nur den Boden der Zellkulturflasche bedeckte und nicht über die ganze Flasche verteilt wurde. Es schloss sich eine eineinhalbstündige Inkubation im Wasserbad bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 20/min zur enzymatischen Andauung an. Nach dieser Zeit wurde der Flascheninhalt mit einer 2 ml-Pipette ca. 50-mal resuspendiert, um noch vorhandene größere Gewebestücke zu zerkleinern und den Inhalt zu homogenisieren.

##### **3.1.1.2. Isolierung der Epithel- und Stromazellen**

Die angedaute Suspension wurde tropfenweise durch einen sterilen Filter mit 180 µm Porengröße filtrierte. Der Filter wurde mit 10 ml Medium mit 10% FCS gespült. Das Filtrat beinhaltete die epithelialen Drüsenschläuche, Stromazellen, Leukozyten und Erythrozyten. Der Inhalt des Filters, der noch größere unverdaute Gewebestücke, Myometrium und Schleim enthielt, wurde verworfen. Das Filtrat wurde tropfenweise auf einen 40 µm Filter pipettiert.

Bei diesem Filtrationsschritt blieben die epithelialen Drüsenschläuche im Filter zurück, während Stromazellen, Leukozyten und Erythrozyten den Filter passierten. Der Filter wurde wiederum mit 10 ml Medium mit 10% FCS gespült, damit nur noch Drüsenschläuche im Filter verblieben. Der Filter mit den verbliebenen epithelialen Drüsenschläuchen wurde umgedreht, der gesamte Inhalt mit 10 ml Medium mit 10% FCS in eine neue Petrischale gespült und der Filter nochmals mit 10 ml Medium mit 10% FCS gewaschen. Die Epithelzellen wurden in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und die Petrischale nochmals mit Medium mit 10% FCS gespült, um möglichst viele Epithelzellen zu gewinnen. Das vorher gewonnene Filtrat mit den Stromazellen wurde ebenfalls in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Stroma- und die Epithelzellsuspensionen wurden 10 min bei 600 Upm (70g) zentrifugiert (Heraeus Omnifuge 2.ORS, Hanau). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in je 10 ml Medium mit 10% FCS gelöst und nochmals zentrifugiert, um die restliche Collagenase zu entfernen. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Das Stromazellpellet wurde je nach Größe in 1 oder 2 ml Medium mit 10% FCS aufgenommen und bis zur weiteren Reinigung (3.1.1.3.) im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Epithelzellen wurden direkt in die Zellkultur eingesetzt (3.2.3.2.).

### 3.1.1.3. Aufreinigung der Stromazellen

In zwei bzw. vier 1,5 ml Eppendorf-Cups wurden je 12,5 µl gut gemischte, mit Antikörpern beladene Dynabeads (siehe 3.4.1.), pipettiert. Als Antikörper wurden CD14, CD31, CD45, CD56 und Epithelial enrich-Antikörper verwendet, um alle Leukozyten, natürlichen Killerzellen und noch vorhandene Epithelzellen möglichst vollständig zu entfernen. Die Cups wurden in die Magnetschiebeleiste gestellt und der Überstand verworfen. Die Antikörper wurden mit je 500 µl PBS gewaschen. Pro Cup wurden je 500 µl der Stromazellsuspension zugegeben. Die Cups wurden auf dem Rotor 1 h bei 4°C im Kühlraum gedreht, um eine möglichst effektive Aufreinigung zu erreichen und dabei die Aktivierung der Leukozyten zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Cups in die Magnetschiebeleiste gestellt und die Prozedur mit dem Überstand wiederholt, um alle Dynabeads zu entfernen. Der Überstand wurde in eine 50 ml Zellkulturflasche pipettiert, die bereits 8 – 9 ml Medium mit 10% FCS enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 1 h erfolgte ein Mediumwechsel, um einen Großteil der Erythrozyten zu entfernen. Die Stromazellen waren zu diesem Zeitpunkt bereits adhären. Für den Mediumwechsel wurde Medium mit 10% FCS, 10<sup>-9</sup> M. E2 und 10<sup>-7</sup> M. Progesteron verwendet.

### **3.1.2. Seminalplasma und Spermien**

Die erhaltenen Ejakulate wurden 30 min. bei 37°C im Brutschrank liquifiziert. Die Präparation der Spermien wurde in Anlehnung an die Arbeit von Richter et al. (1999) durchgeführt.

#### 3.1.2.1. Präparation der Spermien und swim up-Technik

Die Spermien wurden zuerst über einen Dichtegradienten gereinigt. Der isotonische Gradient setzte sich aus MEM-Medium und Percoll 40% (v/v) zusammen. Er diente zur Vermeidung der Selektion der Spermien und zur Entfernung von adhären Partikeln von der

Spermienoberfläche. Die verflüssigten Ejakulate wurden mit demselben Volumen MEM-Medium verdünnt. Je 2 ml des Gradienten wurden mit demgleichen Volumen der Verdünnung überschichtet und 20 min bei 400 g zentrifugiert (Hettich Rotixa/RP, Tuttlingen). Die Pellets wurden zweimal mit je 10 ml MEM-Medium, das 1 mg/ml BSA enthielt, gewaschen und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Es folgte die swim up-Technik. Dazu wurde das Pellet mit 1 ml IVF-Medium vorsichtig überschichtet ohne das Pellet aufzuwirbeln. Die Probe wurde kurz anzentrifugiert (1 min bei 2000 Upm) und das Röhrchen für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> schräg in den Brutschrank gestellt. Mobile Spermien schwammen in dieser Zeit an die Oberfläche. Nach 1 h wurden 500 µl von der Oberfläche steril in ein Eppendorf-Cup pipettiert und für weitere Versuche verwendet.

### 3.1.2.2. Aufreinigung der Spermien

Die isolierten Spermien wurden mit Dynabeads (s. 3.4.1.), die mit Antikörpern gegen CD 4, CD 8, CD 14, CD 19, CD 45 und CD 56 beladen waren, aufgereinigt. CD 4 und CD 8 werden von verschiedenen Untergruppen der T-Lymphozyten exprimiert, CD 14 von Monozyten, CD 19 von B-Lymphozyten, CD 45 von allen Leukozyten und CD 56 von natürlichen Killerzellen. Da im Ejakulat immer eine geringe Anzahl Leukozyten vorhanden sind, war es erforderlich möglichst alle kontaminierenden Zellen von den Spermien zu entfernen. Es wurden je 5 µl der verschiedenen Dynabeads und 10 µl CD 56-Beads verwendet. Die Beads wurden mit 1 ml PBS mit 0,1% BSA gewaschen. Pro Eppendorf-Gefäß wurden 500 µl mittels swim up-Technik isolierte Spermien pipettiert. Der Ansatz wurde 1 h bei RT auf dem Rotor bewegt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und nochmals die Spermienzahl bestimmt.

### 3.1.2.3. Isolierung von Seminalplasma

Die verflüssigten Ejakulate wurden für 10 min bei 400 g (Hettich Rotixa/RP, Tuttlingen) und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 10 min bei 16.000 g zentrifugiert (Eppendorf 5415 D, Hamburg). Der Überstand wurde abpipettiert, unter dem Lichtmikroskop auf Zellfreiheit geprüft und bei -20 °C eingefroren. Für den Kokulturversuch mit Epithelzellen wurden 6 Seminalplasmen gepoolt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Des Weiteren wurde Seminalplasma 10 min bei 95 °C inaktiviert (Thermocycler 60 von Bio-Med) und dieses hitze-denaturierte Seminalplasma zusammen mit den Epithelzellen kultiviert.

## **3.2. Zellkultur**

### **3.2.1. Endometriumkultur**

#### 3.2.1.1 Beschichten der Einsätze mit Matrigel für die Epithelzellkultur

Um eine vorzeitige Gelierung des phenolrotfreien Matrigels zu verhindern, wurde stets mit 4°C kalten Instrumenten und Medien gearbeitet. Das Matrigel wurde auf Eis gelagert. In die

Vertiefungen der vorgekühlten 24-Well-Zellkulturplatte wurden mit einer sterilen Pinzette die ebenfalls gekühlten Zellkultureinsätze gelegt. Das 4 °C kalte Matrigel wurde 1:4 mit kaltem Medium ohne FCS verdünnt und je 100 µl der Verdünnung in kreisförmigen Bewegungen in die Einsätze pipettiert, um die Membran eben und luftblasenfrei zu bedecken. Die Einsätze zeichnen sich durch eine durchsichtige permeable Membran aus, die den freien Stoffaustausch gewährleistet. Zudem ist es möglich das Wachstum der Zellen im Mikroskop zu beurteilen. Die Ausgelierung des Matrigels erfolgte im Brutschrank bei 37 °C für 1 h. Das Matrigel ist für das polarisierte Wachstum der Epithelzellen erforderlich und bestens geeignet (Arnold et al. 2001).

### 3.2.1.2. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und der Anteil lebender Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau bestimmt. Ein Aliquot wurde aus der Stromazell-Suspension entnommen und mit 0,5% Trypanblau 1:2 verdünnt. Unter einem Lichtmikroskop (Leitz Labovert, Wetzlar) erfolgte die Auszählung und Unterscheidung von lebenden bzw. toten Zellen. Tote Zellen färben sich blau, da Trypanblau als saures Anion leicht an Proteine binden und die nicht intakte Zellwand penetrieren kann, lebende Zellen erscheinen nicht gefärbt.

### 3.2.1.3. Allgemeine Zellkulturbedingungen

#### 3.2.1.3.1. Zellkulturmedien

Das verwendete fötale Kälberserum (FCS) wurde vor der Verwendung in der Zellkultur 30 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert, um das vorhandene Komplementsystem und Proteasen zu inaktivieren. Für die Epithel- und Stromazellkultur wurde stets DMEM/HAM's F-12 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 0,2% Zienam® und 0,4% Nystatin®, dem täglich frisch  $10^{-9}$  M  $17\beta$ -Östradiol, kurz E2 und  $10^{-7}$  M Progesteron zugesetzt wurde, verwendet. Täglich wurde das Medium gewechselt und das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Einen Tag vor der Stimulierung der Zellen wurden diese mit Medium, dessen FCS-Konzentration auf 1% FCS gesenkt war, versorgt. Das gleiche Medium erhielten die Zellen am Versuchstag.

#### 3.2.1.3.2. Kultivieren der Epithel- und Stromazellen

Die Größe des Epithelzellpellets wurde abgeschätzt und eine entsprechend große Anzahl Einsätze für die Zellkultur vorbereitet (3.2.1.). Entsprechend der Zahl der Einsätze wurde das Medium für die Epithelzellen vorbereitet: Zahl der Einsätze x 200 µl + 50 µl zusätzliches Medium. Es wurde Medium mit 10% FCS,  $10^{-9}$  M E2, und  $10^{-7}$  M Progesteron verwendet. Das Epithelzellpellet wurde in der berechneten Mediummenge resuspendiert und jeweils 200 µl resuspendierte Epithelzellen in die mit Matrigel beschichteten Einsätze pipettiert. In die umgebenden Wells wurden je 500 µl des angesetzten Mediums pipettiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Da  $17\beta$ -Östradiol und Progesteron nicht stabil sind, wurde das Medium, das sich außerhalb der Einsätze befindet, täglich

abpipettiert und 500 µl frisch angesetztes Medium zugegeben. Die Epithelzellen wurden fast bis zur Konfluenz der Zellen, die max. 6 Tage dauerte, kultiviert. Der Bewuchs der Einsätze lag zwischen 70 und 100%.

Die Stromazellen wurden bis zur Konfluenz in den Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde wie bei den Epithelzellen täglich gewechselt. Die dicht gewachsenen Stromazellen wurden vor Durchführung des Versuchs einmal passagiert, wie unter 3.2.3.3. beschrieben. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Stromazellen abgelöst, gezählt und je  $1 \cdot 10^4$  Zellen in entsprechend viele Wells der 24 Well-Zellkulturplatte ausgestreut.

#### 3.2.1.3.3. Trypsinieren der adhärenen Zellen

Die adhärenen Epithelzellen wurden mit Trypsin von den Einsätzen abgelöst. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die adhärenen Zellen wurden mit 5% Trypsin überschichtet und für 5 – 10 min. im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit dem doppelten Volumen Zellkulturmedium mit 10% FCS gestoppt und die abgelösten Zellen in sterile Eppendorf-Cups überführt und im Kühlraum bei 4°C für 10 min. bei 13.200 Upm (16.000 g) (Heraeus Biofuge A, Hanau) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBS gewaschen und das Pellet in 800 µl Trizol aufgenommen und bei -20 °C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt. Dieselbe Prozedur erfolgte bei den Stromazellen nach erfolgtem Versuch.

Die Ablösung der Stromazellen aus den Zellkulturflaschen erfolgte nach demselben Prinzip, nur dass die Zellen bei 70 g zentrifugiert (Heraeus Omnifuge 2.ORS; Hanau) und das Pellet wieder in Medium für die weitere Kultivierung aufgenommen wurde.

#### 3.2.1.4. Vitalitätsnachweis der Epithel- und Stromazellen

Bei Epithel- und Stromazellen wurde stichprobenartig die Vitalität mit einem LIVE/DEAD® Kit getestet. Der Test basiert auf der gleichzeitigen Markierung von lebenden und toten Zellen mittels zweier Fluoreszenzfarbstoffe. Mit diesen werden zwei Parameter der Zellvitalität, die intrazelluläre Esterase-Aktivität und die Permeabilität der Zellmembran gemessen. Lebende Zellen katalysieren aufgrund der Esterase die Umwandlung von Calcein AM in das grün fluoreszierende polyanionische Calcein, während der zweite Farbstoff, Ethidium Homodimer I die intakte Zellmembran nicht penetrieren kann. Bei zerstörter Zellmembran bindet dieser an die Nukleinsäuren und fluoresziert rot. Der Nachweis der Fluoreszenzen erfolgt im Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan®, Wetzlar).

Die abgelösten Zellen wurden mit HBSS-Lösung vorsichtig gewaschen. Die beiden Komponenten des Kits wurden nach Herstellerangaben 1:4 in 2 ml Hank's-Lösung gelöst, d.h. 1 µl Calcein AM (4mM) und 4µl Ethidium Homodimer I (2 mM), und jeder Zellansatz mit 100 – 150 µl dieser Färbelösung für 30 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in HBSS-Lösung gewaschen und sofort im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

#### 3.2.1.5. Kokultur der Epithel- und Stromazellen

Die Kulturen der Epithel- und Stromazellen wurden am Vortag des Versuchs mit Zellkulturmedium mit 1% FCS und Hormonen versorgt. Am Versuchstag erhielten die Zellen dasselbe Medium.

#### 3.2.1.5.1. Kokultur der Epithelzellen und Stromazellen mit Seminalplasma

Mit den Epithel- und Stromazellen wurden eine Konzentrationsabhängigkeit und ein Zeitversuch mit Seminalplasma durchgeführt. Die Konzentrationsabhängigkeit wurde mit 0,1%, 1% und 10% Seminalplasma, das zum Zellkulturmedium mit 1% FCS gegeben wurde, durchgeführt. Der Versuch wurde nach einer dreistündigen Inkubationszeit im Brutschrank beendet, wie unter 3.2.3.3. beschrieben. Der Zeitversuch wurde nur mit 10% Seminalplasma im Medium durchgeführt und der Versuch nach 1, 3, 6 und 24 h Inkubation gestoppt. Als Kontrolle dienten Epithel- und Stromazellen, die nur Medium ohne Seminalplasma erhielten.

#### 3.2.1.5.2. Kokultur der Epithelzellen mit verschiedenen Zytokinen

Die Epithelzellen wurden mit den Zytokinen TGF- $\beta$ 1, IL-8 und VEGF in ähnlichen Konzentrationen, wie sie in 10% des verwendeten Seminalplasma-Pools vorlagen, stimuliert. Die konkreten Zytokin-Konzentrationen waren 1,5 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 2 ng/ml IL-8 bzw. 0,77  $\mu$ g/ml VEGF. Dazu wurden die entsprechenden Zytokine in das Zellkulturmedium mit 1% FCS gegeben und die Epithelzellen 3 h damit inkubiert. Der Versuch wurde, wie unter 3.2.3.3. beschrieben, beendet. Seminalplasma wurde mit blockierendem, monoklonalen TGF- $\beta$ 1/2/3-Ak, der in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml und somit im Überschuss vorlag, in das Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden mit dem inhibierten TGF- $\beta$ 1 3 h inkubiert. Als Kontrolle wurden die Epithelzellen mit Seminalplasma, das mit monoklonalem IgG-1 in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml versetzt worden war, 3 h inkubiert. Die Versuche wurden wie unter 3.2.3.3. beschrieben, beendet.

### 3.2.2. Kultur der Spermien

Die Spermien wurden in Zellkultureinsätzen, die in die Wells der 24 - Well-Zellkulturplatte eingesetzt wurden, kultiviert.

#### 3.2.2.1. Bestimmung der Spermienzahl

Vor der genauen Bestimmung der Spermienkonzentration muss die Spermiedichte im Nativpräparat abgeschätzt werden. Es werden 50  $\mu$ l liquifiziertes Ejakulat auf einen Objektträger pipettiert und das Präparat unter dem Mikroskop beurteilt. Je nach Spermienzahl pro Blickfeld wird die Probe mit WHO-Puffer (50 g NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml 37 %-iges Formaldehyd und 1,0 ml gesättigte Gentianviolett-Lösung ad 1 l A.dest., gut mischen und filtrieren) verdünnt. Die Auszählung erfolgt in der Neubauer-Zählkammer. Es werden je 25 Quadrate ausgezählt und die Spermienzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet. Das Ergebnis wird in Millionen Spermien/ml angegeben.

### 3.2.2.2. Kultivierung der Spermien

Es werden 100 µl der in IVF-Medium aufgereinigten Spermien in die Zellkultureinsätze pipettiert und diese mit 300 µl IVF-Medium aufgefüllt. Dies entspricht einer Spermiedichte von 2-3 Millionen/ml. Da die Membran der Einsätze permeabel ist, können sowohl Medium als auch Sekretionsprodukte der Spermien diese Membran penetrieren. Die Spermien wurden täglich unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität überprüft und das Medium, wenn nötig, alle 2 – 3 Tage gewechselt. Die Kulturüberstände wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße abpipettiert und bei –20 °C gelagert. Aus ihnen wurden im ELISA die Zytokine IL-1β, IL-6 und VEGF bestimmt.

## **3.3. Nukleinsäuretechniken**

Wenn nicht anders angegeben, wurden molekurbiochemische Methoden so ausgeführt wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben. Deswegen wird die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen nicht detailliert angegeben, es sei denn sie wurden abweichend hergestellt. Da RNA sehr empfindlich ist, müssen alle verwendeten Chemikalien RNase-frei sein. Die benutzten Glasgefäße werden vor Gebrauch 4–6 h bei 210 °C ausgeglüht und Plastikgefäße autoklaviert. Es wird mit Handschuhen gearbeitet.

### **3.3.1. RNA-Isolierung**

Das Pellet der abgelösten Zellen wird in 800 µl TRIzol® (Phenol und Guanidinium isothiocyanat) aufgenommen und bei –20 °C gelagert. Guanidiniumisothiocyanat hemmt die RNasen der Zellen. Die Proben werden mit einer Insulinspritze homogenisiert und 10 min. bei RT inkubiert. Je 20 Vol. % des Chloroform-Isoamylalkohol (50:1) - Gemisches gibt man zu den Proben und mischt diese 15 sec kräftig. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 16.000 g. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, wird vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert, in das man 1,6 µl Glyko-Blue, entsprechend einer Konzentration von 50 µg/ml, vorgelegt hat. Glyko-Blue ist ein Glykogen, das die Ausfällung der RNA erleichtert und deren Ausbeute erhöht. Die Probe wird vorgetext, d.h gründlich gemischt. Man gibt 400 µl Isopropanol dazu, vortext die Probe und lässt sie ü.N. bei 4°C inkubieren. Die Probe wird 10 min. bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das blaue Pellet mit 800 µl 75%-igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abpipettiert und der Niederschlag 20 min bei RT getrocknet. Das Pellet wird in 60 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei –20 °C gelagert.

### **3.3.2. Quantifizierung der RNA**

60 µl der isolierten RNA werden in einer Quarzküvette, UVette, photometrisch vermessen. Die Messung erfolgt im BioPhotometer von Eppendorf. Es wird die Absorption bei den Wellenlängen  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 280 \text{ nm}$  und  $\lambda = 320 \text{ nm}$  gemessen.

Die Messung bei  $\lambda = 320 \text{ nm}$  dient zur Feststellung der Absorption der Küvette. Parallel dazu wird eine Referenzküvette mit RNase-freiem Wasser vermessen. Die Konzentration der eingesetzten RNA-Menge wird nach folgender Formel berechnet:

$$[(A_{260\text{nm}} - A_{320\text{nm}})_{\text{Probe}} - (A_{260\text{nm}} - A_{320\text{nm}})_{\text{Referenzküvette}}] \cdot 40 \mu\text{g} \cdot 60 (\text{Verdünnungsfaktor}) =$$

$\mu\text{g RNA/ml Lösung}$

Die Reinheit der RNA kann aus dem Quotienten  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , der über 1,6 liegen sollte, abgeschätzt werden.

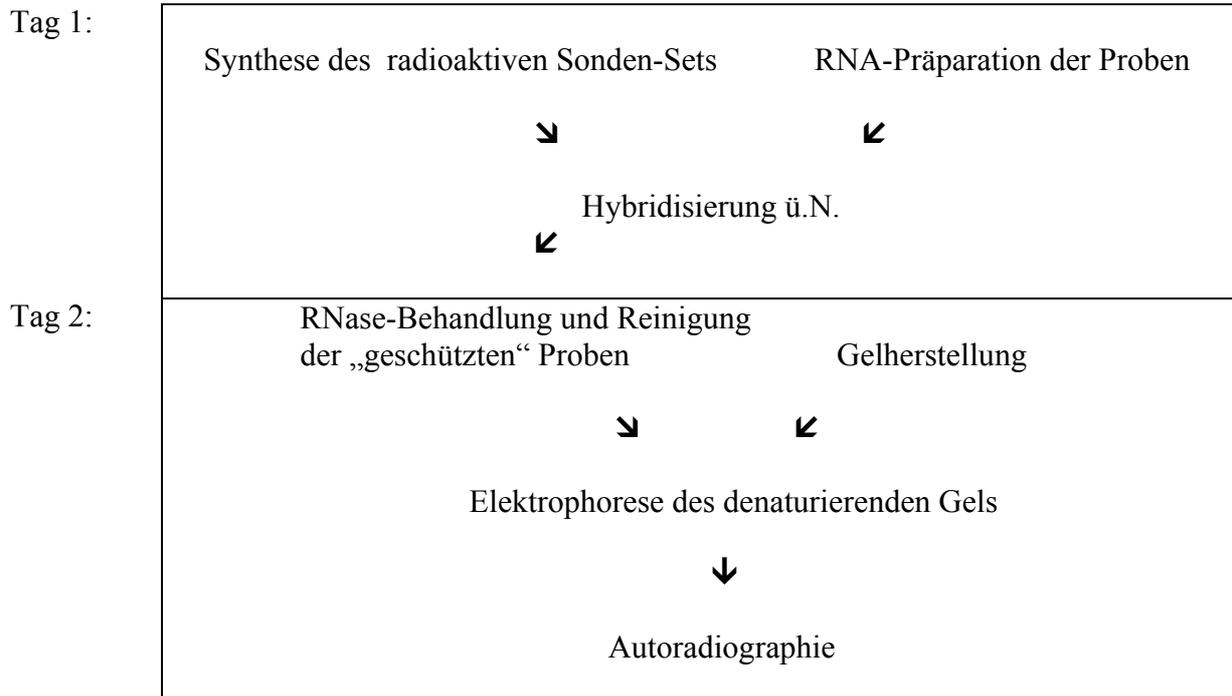
### 3.3.3. Überprüfung der RNA auf Unversehrtheit

Die isolierte RNA wird durch Gelelektrophorese in einem RNA-Gel, das neben Agarose MOPS-Puffer und Formamid enthält, auf ihre Intaktheit überprüft. Die Herstellung des Gels und dessen Lösungen sind in Sambrook et al. (1989) nachzulesen. Die Probe wird vor dem Auftragen auf das Gel folgendermaßen vorbereitet: Es werden  $5 \mu\text{l}$  deionisiertes Formamid,  $2 \mu\text{l}$  Formaldehyd,  $2 \mu\text{l}$  MOPS-Puffer-Stammlösung pH 8 und  $1 \mu\text{l}$  Ethidiumbromid in ein Eppendorf-Cup pipettiert, gemischt und mit  $10 \mu\text{l}$  RNA-Lösung versetzt. Der Ansatz wird vorgetext, kurz anzentrifugiert,  $10 \text{ min}$  bei  $65^\circ\text{C}$  im Thermocycler inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nachdem die Probe abgekühlt ist, wird  $2 \mu\text{l}$  RNA-Loading-Puffer zugefügt, die Probe gemischt, kurz anzentrifugiert und in die Slots des RNA-Gels aufgetragen. Die Auftrennung der negativ geladenen RNA in Richtung Anode erfolgt bei  $100 \text{ Volt}$ . Auf dem Gel sollten die 28 S- und die 18 S-rRNA-Banden deutlich zu sehen sein. Abbauprodukte erkennt man an einem niedermolekularen Schmier.

### 3.3.4. RNase Protection Assay (RPA)

Der Ribonuklease Protection Assay, RPA, wurde nach Anleitung von B&D PharMingen (San Diego, CA USA) ausgeführt. Es ist eine hoch sensitive und spezifische Methode um mehrere mRNA Spezies zu detektieren und zu quantifizieren. Dabei werden DNA-Sonden von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, wie der T7-Polymerase, mit großer Ausbeute und Genauigkeit in hoch aktive RNA-Sonden umgeschrieben. Die käuflichen DNA-Sonden-Sets wurden, wie unter 2.1. aufgeführt, von B&D PharMingen nach eigenen Vorstellungen synthetisiert. Die Sonden-Sets enthalten mehrere DNA-Sonden. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge und Sequenz und jede repräsentiert ein anderes Molekül. Bei der Synthese der RNA-Sonden wird von der T7-Polymerase radioaktives UTP eingebaut. Es schließt sich eine Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden mit der Proben-RNA über Nacht an. Danach folgt eine Verdauung der freien, nicht hybridisierten, einzelsträngigen RNA durch RNasen. Die verbleibenden vor dem RNase-Verdau geschützten Proben werden aufgereinigt und auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Quantifizierung der Proben erfolgt durch Autoradiographie. Die Menge jeder mRNA-Spezies in der Originalprobe kann anhand der entsprechenden Intensität und Größe des geschützten Probenfragments bestimmt werden.

Der Überblick soll das Prinzip des RPA verdeutlichen:



Durchführung des RPA:

Alle benötigten Reagenzien sind im In Vitro-Transkriptions-Kit und im RPA-Kit enthalten. Alle Proben werden bei 16.000 g zentrifugiert.

### 1. Synthese der radioaktiven Sonden

Es werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup 1 µl RNasin (40 U/µl), 1 µl Nukleotid-Mix (je 2,75 mM G,A,C und 61 µM U), 2 µl DTT (100 mM), 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 1 µl des Sonden-Sets, 10 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP pipettiert, gemischt und 1 µl T7 RNA-Polymerase (20 U/µl) zugegeben. Die Probe wird 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl RNase-freie DNase (1 U/µl) gestoppt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Ausfällung der RNA werden in das Gefäß 26 µl 20 mM EDTA, 25 µl Tris-gesättigtes Phenol, 25 µl CIA (50:1) und 2 µl Hefe-tRNA (2 mg/ml) pipettiert, vorgetext und 5 min bei RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, wird in eines Eppendorf-Cup überführt. Es werden 50 µl CIA (50:1) hinzugefügt, vorgetext und 2 min bei RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird nochmals in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Es werden 50 µl 4 M. Ammoniumacetat und 250 µl absoluter, eiskalter EtOH dazupipettiert, vorgetext und 1 h bei -20 °C inkubiert. Die Probe wird 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Der Niederschlag wird mit 150 µl 90%-igem, eiskalten EtOH gewaschen und 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 10 – 20 min bei RT getrocknet. Das Pellet wird in 50 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und die Probe im Szintillationszähler gemessen. Dazu wird 1 µl der Probe in 10 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und gemessen. Das Ergebnis sollte etwa  $1 \cdot 10^6$  cpm/µl betragen.

## 2. RNA-Präparation und Hybridisierung der Proben

Die in RNase-freiem Wasser aufgenommenen RNA-Proben werden tiefgefroren in die Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator) gestellt und mind. 30 min getrocknet. Die Pellets werden in 8  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung resuspendiert. 2  $\mu\text{l}$  der auf  $1,5 \cdot 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$  verdünnten Sonde werden zu jeder Probe pipettiert und der Inhalt mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Proben werden 3 min bei 90°C inkubiert und ohne Abkühlung ü.N. bei 56°C inkubiert. In dieser Zeit bindet die komplementäre Sonde an die einzelsträngige RNA der Probe.

## 3. RNase-Behandlung

Je 100  $\mu\text{l}$  des RNase-Gemisches (125  $\mu\text{l}$  RNase Puffer (1x) und 0,3  $\mu\text{l}$  RNase A (80 ng/ $\mu\text{l}$ ) / T1-Mix (250 U/ $\mu\text{l}$ ) für eine Probe) werden zu den Proben pipettiert und diese 40 min bei 30°C inkubiert. 18  $\mu\text{l}$  des Proteinase K-Gemisches (19,5  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Puffer (1x), 1,5  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) und 1,5  $\mu\text{l}$  Hefe-tRNA (2 ng/ml) für eine Probe) werden in neue Eppendorf-Gefäße vorgelegt und je 100  $\mu\text{l}$  der Proben ohne Öl dazupipettiert. Die Proben werden 15 min bei 37°C inkubiert. Zu den Proben werden zur Ausfällung der hybridisierten RNA 65  $\mu\text{l}$  Tris-gesättigtes Phenol und 65  $\mu\text{l}$  CIA (50:1) pipettiert. Nach dem Vortexen werden diese 5 min bei RT zentrifugiert. Je 100  $\mu\text{l}$  der oberen, wässrigen Phase werden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es werden 120  $\mu\text{l}$  4 M. Ammoniumacetat, das mit 0,6  $\mu\text{l}$  Glykoblue versetzt war, und 650  $\mu\text{l}$  absoluter, eiskalter EtOH zugegeben und mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben bei 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Proben mit 150  $\mu\text{l}$  90%-igem EtOH gewaschen und 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abpipettiert und die Proben 10 – 20 min bei RT getrocknet. Die trockenen Proben werden in 5  $\mu\text{l}$  Loading-Puffer (1x) resuspendiert, 3 min bei 95 °C inkubiert, 5 min auf Eis gestellt und bis zum Beladen des Gels bei RT stehen gelassen.

## 4. Gelelektrophorese

Das denaturierende Polyacrylamid-Gel (48 g Harnstoff, 10 ml TBE-Puffer (10x) und 11,88 ml 40%-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1) ad 100 ml A. dest.) wird in der Sequi-Gen GT-Kammer zum Polymerisieren gegossen. Die Polymerisation des Gels wird durch Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  10%-igem PER und 100  $\mu\text{l}$  TEMED gestartet. Die Proben werden auf das fertige Gel aufgetragen. Als Marker wird die verwendete Sonde, die auf 1000 cpm/ $\mu\text{l}$  mit A. dest. verdünnt und in 5  $\mu\text{l}$  Loading-Puffer aufgenommen wurde, aufgetragen. Das Gel lässt man mind. 1 h in 1x TBE-Puffer und bei 50 W laufen, bis die Proben ausreichend weit im Gel gewandert sind. Anschließend wird das Gel vorsichtig auf das Filterpapier gelegt und 1 h im Gelrockner bei 80 °C getrocknet. Das trockene Gel wird in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer wird auf das Gel ein Röntgenfilm gelegt und die Kassette bei -70 °C für 2 – 3 Tage inkubiert. Die Filme werden über die Entwicklermaschine entwickelt.

### 3.3.5. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung der Reagenzien des First Strand cDNA Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es wurden für die Synthese etwa 1 µg Gesamt-RNA der Proben, die in max. 8,2 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde, eingesetzt. Die Probe wurde mit 2 µl Reaktionspuffer (10 x, enthält 100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3), 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP), 2 µl Oligo-p(dT)<sub>15</sub>-Primer (0,8 µg/µl), 1 µl RNase Inhibitor (50 U/µl) und 0,8 µl AMV Reverse Transkriptase gemischt und 10 min bei 25°C in der PCR-Maschine inkubiert. Diese Inkubation dient der Bindung des Primers an die RNA. Es schließt sich eine einstündige Inkubation der Probe bei 42°C an, in der die cDNA synthetisiert wird. Anschließend wird die Probe zur Denaturierung der Reversen Transkriptase 5 min bei 99°C inkubiert. Bis zur Durchführung der PCR wird die cDNA bei -20 °C eingefroren.

### 3.3.6. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR, dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dies erfolgt durch die zyklische Abfolge von Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei werden die DNA-Doppelstränge zunächst durch Hitze denaturiert. Die entstandenen Einzelstränge werden mit zwei Oligonukleotid-Primern, die zu den 3'-Enden des zu amplifizierenden Fragments komplementär sind und als Starter für die DNA-Synthese funktionieren, bei niedriger Temperatur hybridisiert. Die Elongation des Zielfragments wird von der Taq-DNA-Polymerase bei 72°C katalysiert. Diese drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritte werden als Zyklus bezeichnet. Die PCR basiert auf mehrfacher Wiederholung dieses Zyklus und resultiert in einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten Fragments.

Es wurden die Reagenzien des PCR Core Kits verwendet. In der PCR-Reaktion werden 2 µl cDNA, 1x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3), je 200 µM dNTP-Mischung (dATP, dCTP, dTTP und dGTP), je 50 pmol der Oligonukleotid-Primer up und down und 2,5 U Taq Polymerase zusammen inkubiert. Die Amplifizierung erfolgte in der PCR-Maschine mit unten angegebenen Parametern.

Für die zu amplifizierenden Sequenzen wurde die Annealing-Temperatur ermittelt und die Anzahl der Zyklen aus dem linearen Abschnitt der Amplifizierungskurve bestimmt. Die Annealing-Temperaturen sind für alle Primer in Tabelle 3 aufgelistet:

Primer	Annealing-Temperatur	Zykluszahl	Basenpaare
IL-1β	58 °C	34	263
IL-6	58 °C	34	628
LIF	58 °C	35	477
TNFα	58 °C	35	254
CO- I	51 °C	28	268
β-Actin	60 °C	40	205

**Tab. 3:** PCR-Bedingungen für die verwendeten Primer

Für die Zyklen wurden folgende Parameter gewählt:

1 min 92°C

1 min Annealing-Temperatur

1 min 72°C (Elongation)

Bei den Epithel- und Stromazellkulturen wurde IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$ , LIF und Cytochrom C Oxidase Untereinheit I, kurz CO-I. untersucht, bei den Spermien IL-1 $\beta$  und  $\beta$ -Actin.

### **3.3.7. Dokumentation der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%-igen Agarose-Gel, das 0,075  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde die Sub Cell GT-Kammer und 1x konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Je 10  $\mu$ l der Proben wurden mit je 1  $\mu$ l DNA-Loading-Puffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 50 W. Die Dokumentation der PCR-Banden in dem Gel erfolgte über das Gel Doc 1000 Video Gel-Dokumentationssystem. Die Größe und der DNA-Gehalt der Proben wurden anhand des mitgeführten Standards bestimmt.

## **3.4. Immunologische Methoden**

### **3.4.1. Beladung der Dynabeads**

Beads sind magnetische Partikel, die an Magneten anhaften und somit leicht von Zellen getrennt werden können. Es wurden  $2 \cdot 10^7$  Beads und 1  $\mu$ g CD 56-Antikörper zur Bindung an die Beads verwendet. Die unbeladenen Beads (CELLlection Pan Mouse IgG) wurden resuspendiert, an die Magnetschiebeleiste gehalten, der Überstand verworfen und in 1ml Puffer (PBS und 0,1% BSA) gewaschen. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Beads in 50  $\mu$ l Puffer aufgenommen. Auf die resuspendierten Beads wurde 1  $\mu$ g Ak pipettiert und noch 500  $\mu$ l Puffer zugegeben. Die Probe wurde 30 min bei RT auf dem Rotor bewegt. Dann wurde sie an die Magnetschiebeleiste gehalten, der Überstand verworfen und insgesamt dreimal mit je 1 ml Puffer gewaschen. Die Probe wurde im Ausgangsvolumen von Beads und Antikörper mit Puffer aufgenommen.

### **3.4.2. ELISA**

Der ELISA wurde zur Bestimmung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in Zellkulturüberständen und im Seminalplasma verwendet. Die Untersuchungen wurden mit industriell verfügbaren Kits nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Das Prinzip der Enzym-Immunoassays nach der Sandwich-Technik beruht auf der Wirkung der Antigen-Antikörper-Bindung. Die Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte sind mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu testende Antigen beschichtet. Die Proben werden in die Vertiefungen pipettiert, für vorgegebene Zeiten inkubiert und anschließend gewaschen, um nichtgebundenes Antigen zu entfernen. Die Probe wird mit einem zweiten

antigenspezifischen und enzymgebundenen Antikörper, der an ein weiteres Isotop des Antigens bindet, inkubiert. Danach wird sie gewaschen, um den nicht gebundenen zweiten Antikörper zu entfernen. Zur Probe wird ein Substrat, das enzymatisch in ein farbiges Reaktionsprodukt umgewandelt wird, zugegeben. Nach Abstoppen der Enzymreaktion wird die Farbreaktion photometrisch im ELISA Reader gemessen. Die Farbintensität der Probe ist abhängig von der Antigenkonzentration in der Probe. Die Auswertung der Extinktionswerte erfolgt anhand der Standardkurve des betreffenden ELISA.

Spermienkulturüberstände wurden im ELISA für IL-1 $\beta$ , IL-6 und VEGF untersucht, das verwendete gepoolte Seminalplasma auf IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-3, IL-4, IL-6, löslicher IL-6R, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , freies TGF- $\beta$ 1, freies TGF- $\beta$ 2, G-CSF, GM-CSF und VEGF.

### **3.5. Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit erfolgte mit dem Statistischen Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows in der Version 11.0.

Die deskriptive Statistik wurde für die Beschreibung der Ergebnisse mit Hilfe der Programme Excel 2000 für Windows (Histogramme mit Standardabweichungen) erstellt und in SPSS überprüft.

Da die graphische Überprüfung der Ergebnisse innerhalb der gebildeten Gruppen zeigte, dass keine Normalverteilung vorlag, wurde für die Beurteilung der Signifikanz als nichtparametrischer Test der Friedman-Test zum Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben gewählt.

Für die Beurteilung der Signifikanz zwischen den gebildeten Gruppen, die den verschiedenen Zyklusphasen entsprechen, wurde als nichtparametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dieser wird zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben angewandt. Ebenso konnte der Kruskal-Wallis-H-Test zur Beurteilung mehrerer unabhängiger Stichproben, wie den verschiedenen Gruppen, verwendet werden. Beide Tests bildeten dieselben Signifikanz-Werte.

Die Signifikanzen wurden mit Sternen über der jeweiligen Probe angegeben. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  und \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## **4. Ergebnisse**

Für die Untersuchung des Einflusses des Ejakulates auf die endometrialen Zellen ist es sehr wichtig, dessen Bestandteile genau zu charakterisieren. Diese exakte Analyse wurde an den Ejakulatbestandteilen, den Spermien und dem Seminalplasma, unabhängig voneinander durchgeführt. Des Weiteren wurden die endometrialen Epithel- und Stromazellen mit Seminalplasma zusammen kultiviert und die Auswirkungen auf die Zytokin-Expression in diesen Zellen gemessen. Weiterhin wurden die Epithelzellen mit verschiedenen Zytokinen stimuliert und deren Effekt auf das Endometrium ermittelt.

### **4.1. Spermien**

Die Spermien wurden hinsichtlich ihrer RNA-Expression und Protein-Sekretion untersucht. Für die RNA-Expression wurden die Spermien, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgereinigt und eingefroren; für den Nachweis der Protein-Sekretion wurden diese in IVF-Medium für 2-3 Tage kultiviert.

#### **4.1.1. Nachweis der RNA-Sekretion**

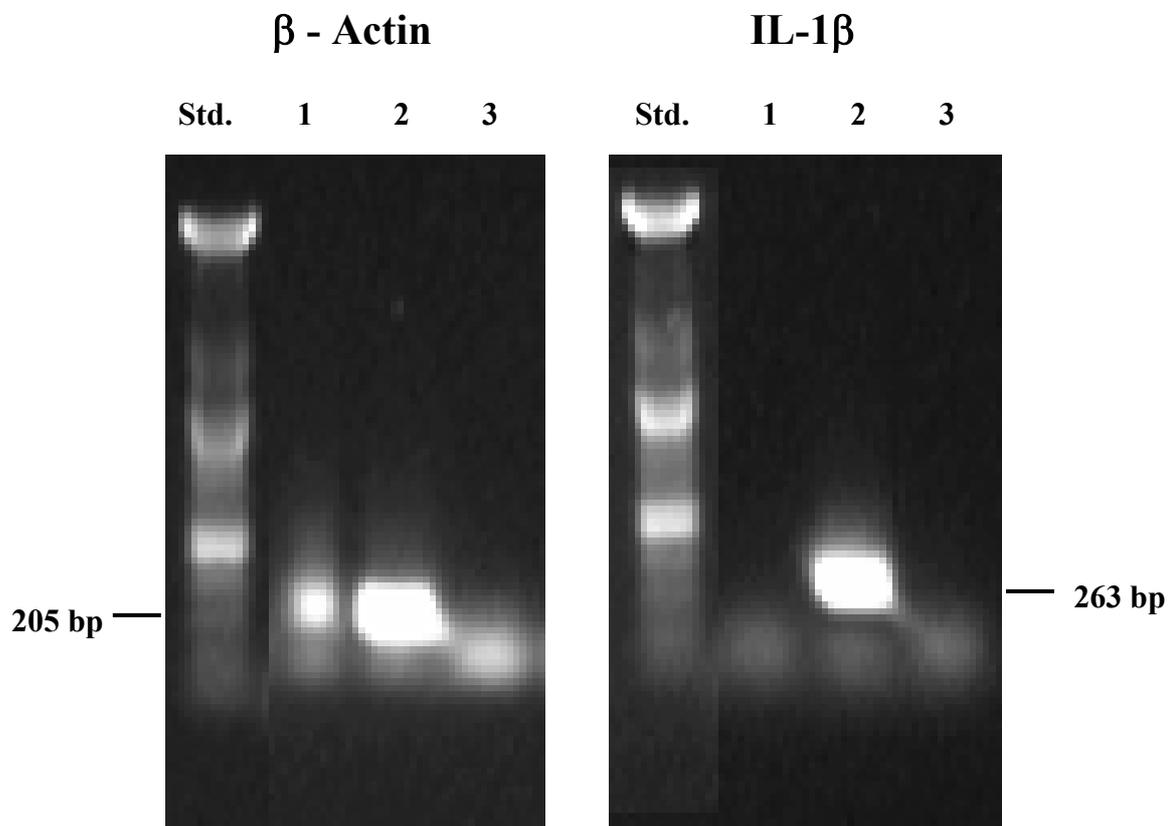
Der Nachweis der von Spermien produzierten RNA erfolgte mittels RNase Protection Assay und RT-PCR.

##### **4.1.1.1. Nachweis der RNA im RPA**

Der Nachweis der von Spermien gebildeten mRNA erfolgte im RPA mit der Zytokin-Sonde, wie sie in Material und Methoden beschrieben wurde. Es wurden für die RNA-Isolierung 2-3 Millionen Spermien verwendet und 0,8 - 1,2 µg der isolierten RNA im RPA eingesetzt. Als Vergleich wurde auch RNA aus dem Ejakulat verwendet. Bei den Spermien konnte lediglich die Produktion geringer Mengen an GAPDH, nicht aber von Zytokinen nachgewiesen werden. Im Ejakulat war eine im Vergleich zu den Spermien gesteigerte mRNA-Produktion sowohl an GAPDH als auch an Zytokinen nachweisbar, die sich aber vermutlich auf vorhandene Leukozyten zurückführen lässt. Im Vergleich zu nicht aufgereinigten Spermien verringerte sich die vorhandene RNA-Menge von Spermien, die mittels swim up-Technik aufgereinigt worden waren, erheblich. Erfolgte die noch gründlichere Aufreinigung mit den Beads, sank die RNA-Konzentration nochmals ab.

#### 4.1.1.2. Bestätigung mittels RT-PCR

Die im RPA ermittelten Ergebnisse wurden in der RT-PCR bestätigt. Dabei wurden genauso viele Spermien eingesetzt wie beim RPA. In die cDNA-Synthese wurden je 1 µg isolierte RNA eingesetzt. Als Kontrolle wurde RNA aus Buffy Coat verwendet. In der PCR konnte gezeigt werden, dass Spermien  $\beta$ -Actin produzieren, jedoch keine Zytokine. Die PCR wird exemplarisch für  $\beta$ -Actin und IL-1 $\beta$  gezeigt.



**Abb. 1:** Nachweis der RNA-Expression in Spermien für die Faktoren  $\beta$ -Actin und IL-1 $\beta$ . Std: 100 bp-Marker; 1: aufgereinigte Spermien; 2: positive Kontrolle; 3: negative Kontrolle (Wasser); In Spermien konnte  $\beta$ -Actin, aber kein IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Die Größe der PCR-Banden beträgt für  $\beta$ -Actin 205 bp und für IL-1 $\beta$  263 bp.

#### **4.1.2. Nachweis der Protein-Sekretion**

Im ELISA wurden Überstände der Spermien, die 2–3 Tage in Kultur gehalten worden waren, auf das Vorhandensein verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren untersucht. Es wurden die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und VEGF gemessen. In den Spermienkulturüberständen konnte die Sekretion der Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-6 nicht nachgewiesen werden. In den Kulturüberständen von Spermien, die nur mittels swim up-Technik aufgereinigt worden waren, konnte ein zeitabhängiger Anstieg der VEGF-Sekretion, bis zu 18 pg VEGF/100.000 Spermien nachgewiesen werden. Dieser konnte allerdings bei den Spermien, die einer gründlicheren Aufreinigung mit Dynabeads unterzogen worden waren, nicht bestätigt werden.

## **4.2. Seminalplasma**

Das Seminalplasma wurde wie unter 3.1.2.3. beschrieben aufbereitet. Das Seminalplasma von 6 gesunden Spendern mit normalen Spermioogrammen wurde gepoolt und auf seine Inhaltsstoffe untersucht. Der Seminalplasma-Pool wurde in allen weiteren Versuchen, wie unter 4.3. beschrieben, verwendet.

#### **4.2.1. Konzentrationsbestimmung der Zytokine und Wachstumsfaktoren**

Die Konzentration der Zytokine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in dem für die Kokultur verwendeten Seminalplasma-Pool wurde mit verschiedenen kommerziell erhältlichen ELISAs bestimmt. Die ermittelten Messwerte sind in der Tabelle zusammengefasst. Als Vergleich sind die Normalwerte im Serum angegeben.

Im Vergleich zu den Serumwerten waren folgende Zytokine und Wachstumsfaktoren im Seminalplasma deutlich erhöht:

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, freies TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2, sowie G-CSF, GM-CSF und VEGF

Faktor	Konzentration des SP-Pool [pg/ml]	Referenzbereich im Serum [pg/ml]
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>19</b>	<b>0-2</b>
IL-1RA	198	0-3140
IL-2	13	0-20
IL-2R	123	120-3.812
IL-3	0	0-31
IL-4	0	0-53
<b>IL-6</b>	<b>118</b>	<b>0-51</b>
sIL-6R	5.045	11.590-44.834
<b>IL-8</b>	<b>1.456</b>	<b>0-32</b>
IL-10	2	0-1
TNF $\alpha$	24	0-286
<b>freies TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>383</b>	<b>30-50</b>
<b>gebundenes TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>173.500</b>	<b>34.700-63.900</b>
<b>freies TGF-<math>\beta</math>2</b>	<b>148</b>	<b>0-20</b>
<b>G-CSF</b>	<b>250</b>	<b>9-51</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>5,6</b>	<b>0-2,2</b>
<b>VEGF</b>	<b>772.000</b>	<b>62-707</b>

**Tab. 4:** Konzentrationen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren im verwendeten SP-Pool. Im Vergleich zu Serumnormalwerten erhöhte Werte sind fett gedruckt.

Für die Stimulation der epithelialen Endometriumzellen mit den rekombinanten Zytokinen wurden nur die Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in mehr als 10fach höheren Konzentrationen als im Serum vorlagen, nämlich IL-8, TGF- $\beta$ 1 und VEGF eingesetzt.

#### 4.2.2. Nachweis der Inhibierung von TGF- $\beta$ 1 durch seinen spezifischen Antikörper

Der verwendete Seminalplasma-Pool wurde wie unter 3.2.1.5.2. beschrieben mit dem im Überschuss vorliegenden spezifischen monoklonalen anti-TGF- $\beta$ 1,2,3-Antikörper inkubiert und in der Konzentration in den ELISA eingesetzt, in der er auch für das Kokultur-Experiment verwendet wurde. Nach der Inkubation des Seminalplasmas mit dem spezifischen Antikörper konnte kein freies TGF- $\beta$ 1 mehr im ELISA nachgewiesen werden, während der unbehandelte Seminalplasma-Pool die bereits bekannte Konzentration bestätigte.

### **4.3. Endometriale Epithel- und Stromazellen**

Die endometrialen Epithel- und Stromazellen wurden wie in „Material und Methoden“ beschrieben, aufbereitet und in die Zellkultur eingesetzt.

#### **4.3.1. Vitalitätsnachweis der Endometriumzellen**

Der Vitalitätsnachweis erfolgte stichprobenartig an fast konfluenten Endometriumzellen, wie unter 3.2.1.4. beschrieben. Zur Färbung der Zellen wurde der LIVE/DEAD-Kit benutzt.

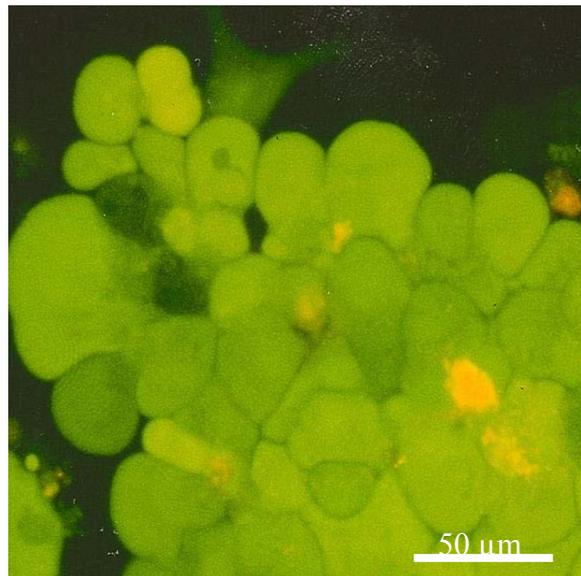
##### **4.3.1.1. Vitalitätsnachweis der Epithelzellen**

Die Epithelzellen wurden im LIVE & DEAD-Kit angefärbt und die Fluoreszenzfärbung unter dem Mikroskop betrachtet.

##### **Abb. 2:**

Drüschlauch einer Epithelzell-Kultur; lebende Zellen erscheinen grün, tote Zellen rot

Größe des Balkens: 50  $\mu\text{m}$



Deutlich zu erkennen sind aus den Drüschläuchen aussprossende Epithelzellen mit einer Vitalität im Bereich von 90 und 95%.

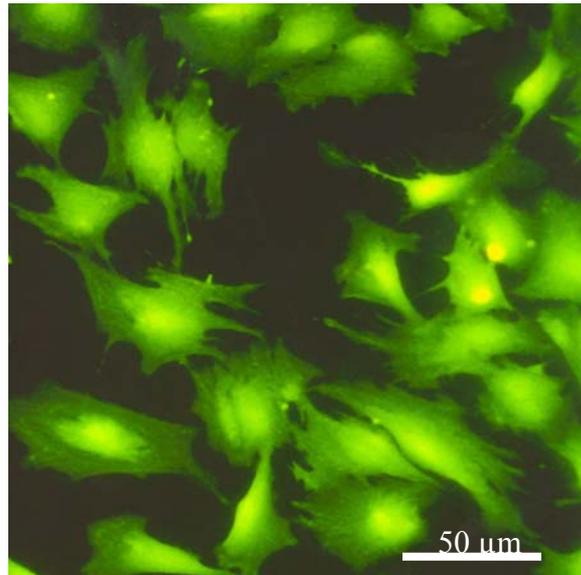
##### **4.3.1.2. Vitalitätsnachweis der Stromazellen**

Die Stromazellen wurden ebenfalls mit dem LIVE & DEAD-Kit angefärbt und die Fluoreszenzfärbung unter dem Mikroskop beurteilt. Die Vitalität der Zellen liegt zwischen 90 und 95%.

**Abb. 3:**

Einzelne endometriale Stromazellen;  
lebende Zellen erscheinen grün, tote  
rot

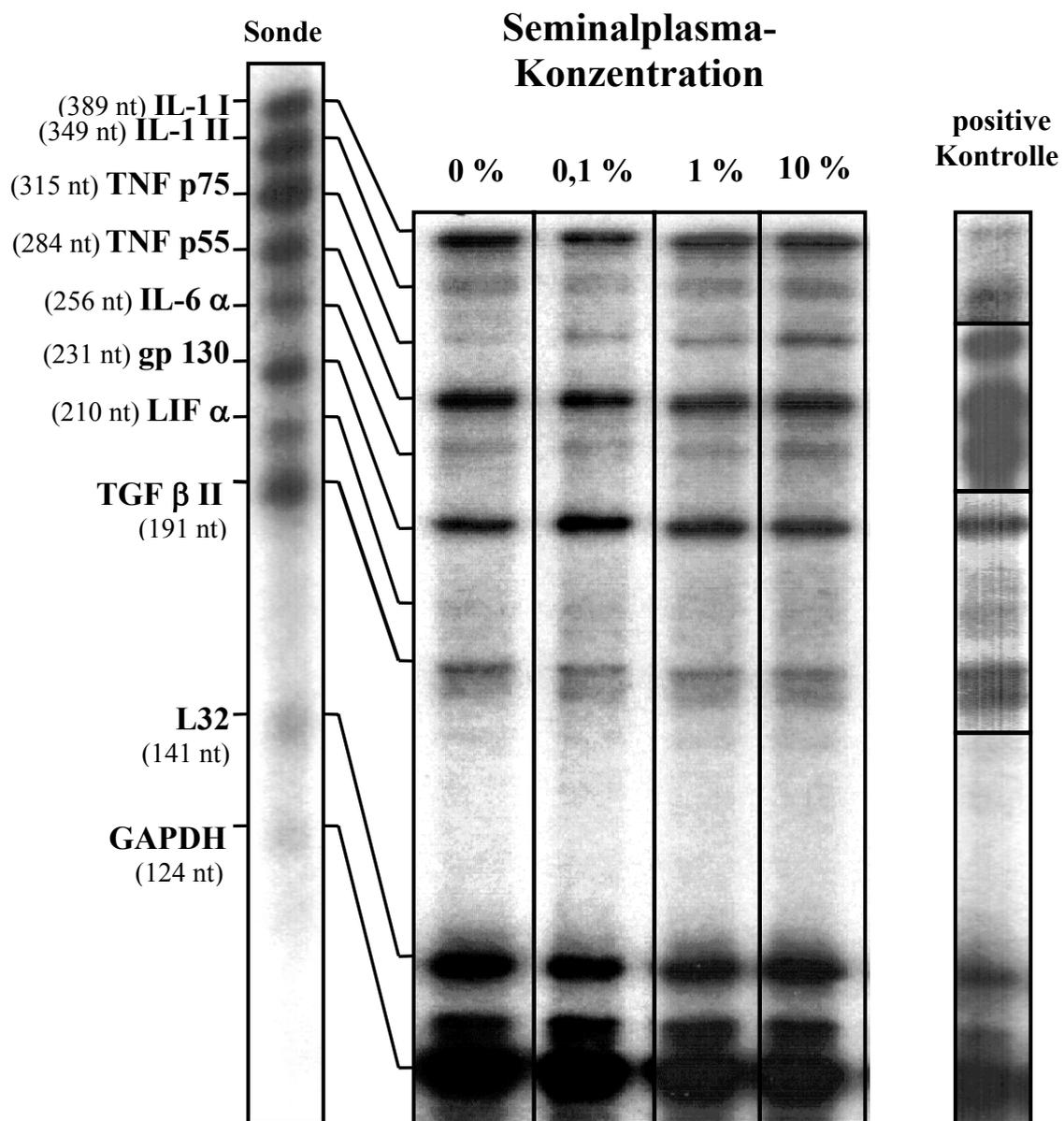
Größe des Balkens: 50  $\mu\text{m}$

**4.3.2. Expression der Zytokin-Rezeptoren unter Stimulation mit Seminalplasma**

Die Epithel- und Stromazellen wurden auf das Vorhandensein von Zytokin-Rezeptoren untersucht. Dazu wurde im RPA die Rezeptoren-Sonde benutzt, wie sie in „Material und Methoden“ beschrieben wurde.

**4.3.2.1. Expression der Zytokin-Rezeptoren in Epithelzellen**

In Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass diese eine Vielzahl an Rezeptoren exprimieren, nämlich IL-1 Rezeptor I und II, TNF Rezeptor p55 und p75 (A), die  $\alpha$ -Kette des IL-6 Rezeptors, gp130 und TGF- $\beta$  Rezeptor II. Die Expression der LIF Rezeptor  $\alpha$ -Kette konnte nicht gefunden werden. Unter Stimulation mit Seminalplasma kam es zu keiner Änderung bezüglich der mRNA-Expression der Rezeptoren. Das Vorhandensein der Rezeptoren zeigt, dass die Epithelzellen normalerweise auf IL-1, IL-6 und seine Rezeptorkette gp 130. TNF $\alpha$  und TGF- $\beta$  ansprechen können. Der Anschaulichkeit halber ist der RPA einer Epithelzellkultur wiedergegeben, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Seminalplasma, 0%, 0,1%, 1% und 10%, stimuliert wurde.



**Abb. 4:** Darstellung der Expression der Rezeptor-mRNA in Epithelzellen in Abhängigkeit von der Seminalplasma-Konzentration. Es wurde mit 0%, 0,1%, 1% und 10% Seminalplasma stimuliert.

Es ist klar ersichtlich, dass die mRNA-Expression der Rezeptoren unabhängig von der Stimulation mit Seminalplasma ist. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bleibt die Expression konstant.

#### 4.3.2.2. Expression der Zytokin-Rezeptoren unter Stimulation mit Seminalplasma in Stromazellen

In Stromazellen konnte die Expression dergleichen Rezeptoren wie bei den Epithelzellen nachgewiesen werden, allerdings war die Expression deutlich schwächer. Folgende Rezeptor-mRNA wurde gefunden: IL-1 R I und II, TNF R p55 und p75 (A), IL-6 R  $\alpha$ , gp 130 und TGF $\beta$  R II. Der LIF-Rezeptor konnte nicht nachgewiesen werden.

#### **4.3.3. Untersuchung der Regulation der Expression pro-inflammatorischer Zytokine unter Stimulation mit Seminalplasma**

Die Untersuchungen wurden jeweils an Epithel- und Stromazellen durchgeführt. Der besseren Übersicht halber werden die Ergebnisse für die Epithel- und die Stromazellen gesondert beschrieben.

##### 4.3.3.1. Durchführung der Versuche an Epithelzellen

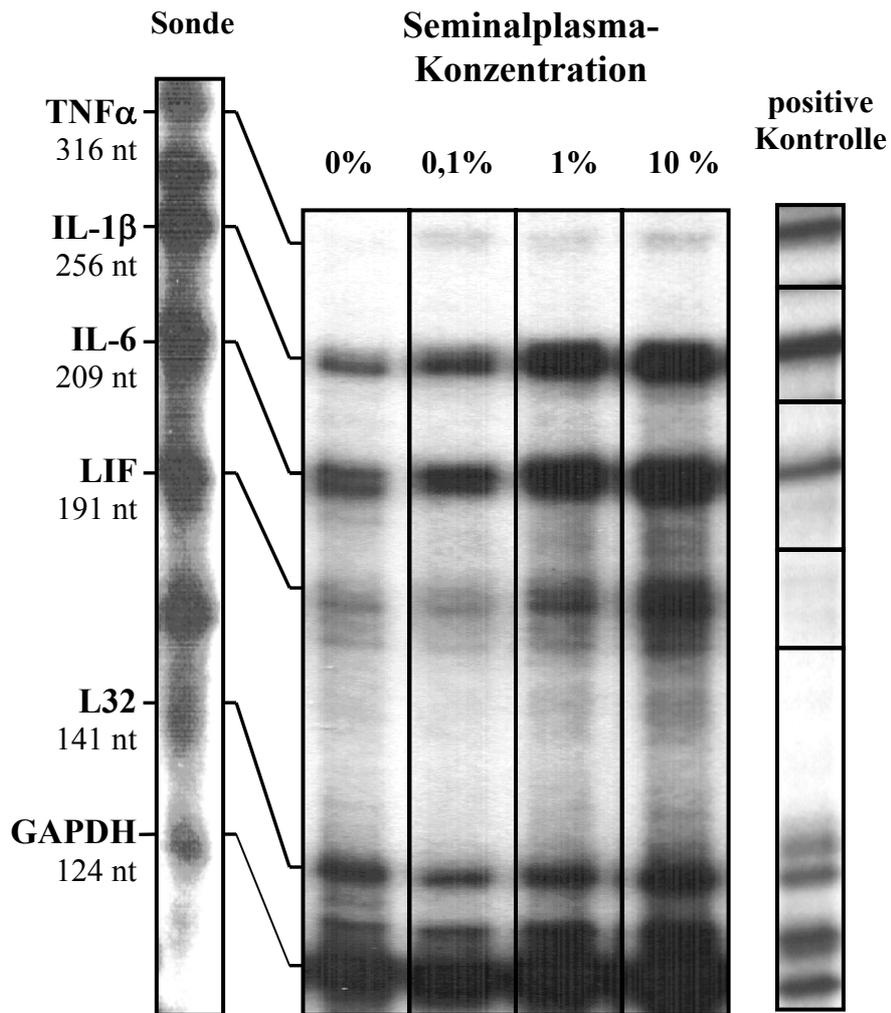
Die Epithelzellen wurden 3 – 5 Tage kultiviert und waren am Versuchstag nahezu konfluent. Es wurden an den Epithelzellen verschiedene Stimulationsversuche mit Seminalplasma durchgeführt, wie die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit sowie der Effekt der Stimulation mit denaturiertem Seminalplasma. Die Versuche sind nachfolgend detailliert beschrieben.

##### 4.3.3.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma

Die fast konfluenten Epithelzellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Seminalplasma, 0,1%, 1% und 10% SP im Medium, für 3 h inkubiert. Als Kontrolle diente die unstimulierte Kultur, 0% SP. Das Ergebnis dieser Stimulation ist in dem Diagramm zusammengefasst. Es ist deutlich erkennbar, dass die Stimulation mit 10% Seminalplasma den größten Effekt auf die Expression der mRNA der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF hat. Die Stimulation mit 1%-igem SP-Anteil zeigte einen deutlich geringeren Effekt, während die Stimulation mit 0,1% SP

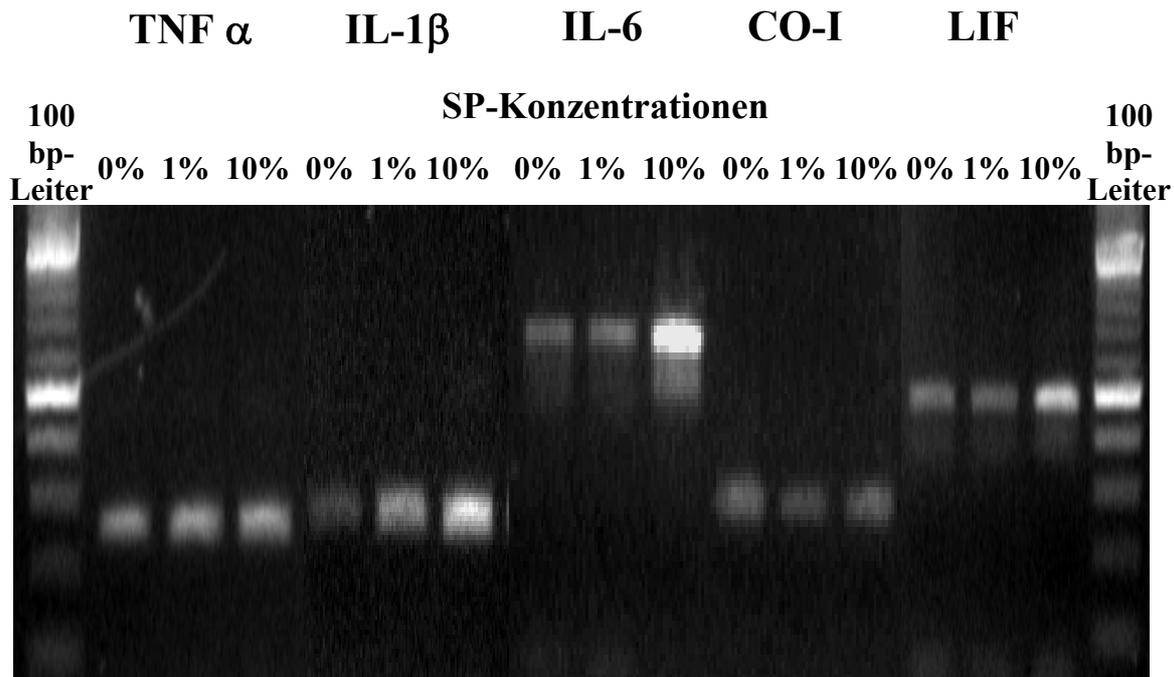
nahezu keine Auswirkungen hatte. Keinen Einfluss hatte die Stimulation mit Seminalplasma auf die Expression der TNF $\alpha$  - mRNA.

Zur Veranschaulichung ist auch der RNase Protection Assay dargestellt:



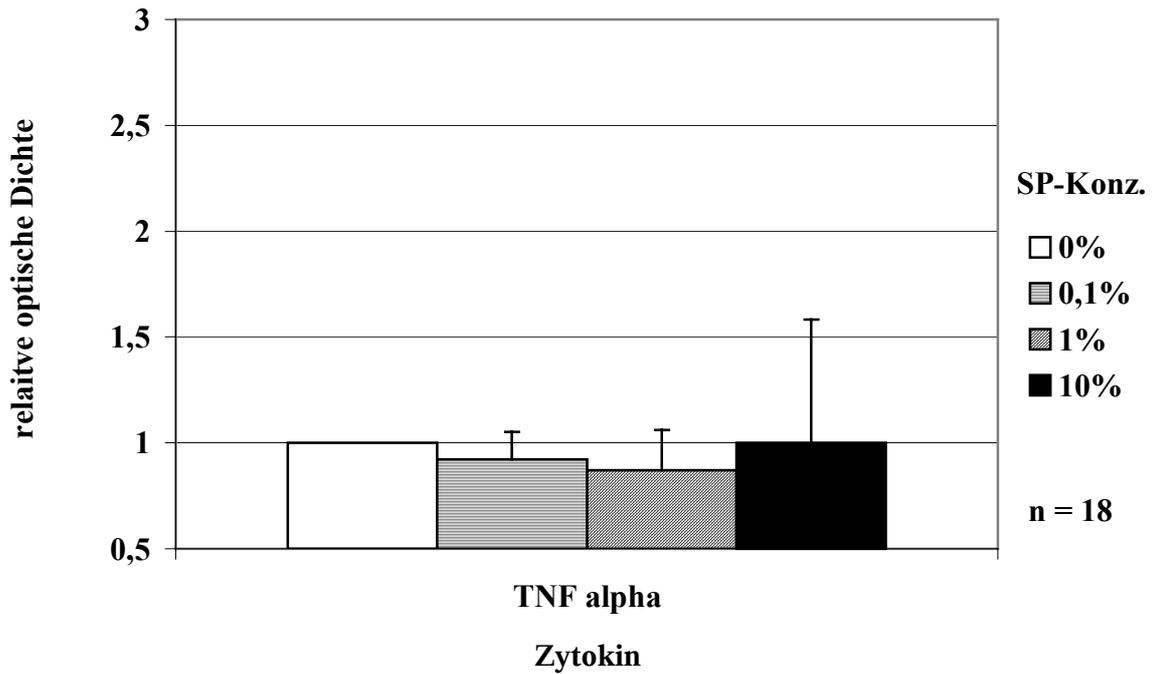
**Abb. 5:** Darstellung der Zytokin-Expression in Epithelzellen in Abhängigkeit von der Seminalplasma-Konzentration. Der Effekt der Zunahme der mRNA-Expression der Zytokine mit zunehmender SP-Konzentration ist klar ersichtlich.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die Zytokine wurden in derselben Reihenfolge aufgetragen wie sie auf dem RPA zu sehen ist. Anstelle des konstant exprimierten Gens GAPDH wurde für die PCR das housekeeping gene Cytochrom-Oxidase Untereinheit I, CO-I verwendet. CO-I dient dem Nachweis, dass alle Proben den gleichen mRNA-Gehalt aufweisen und somit vergleichbar sind.

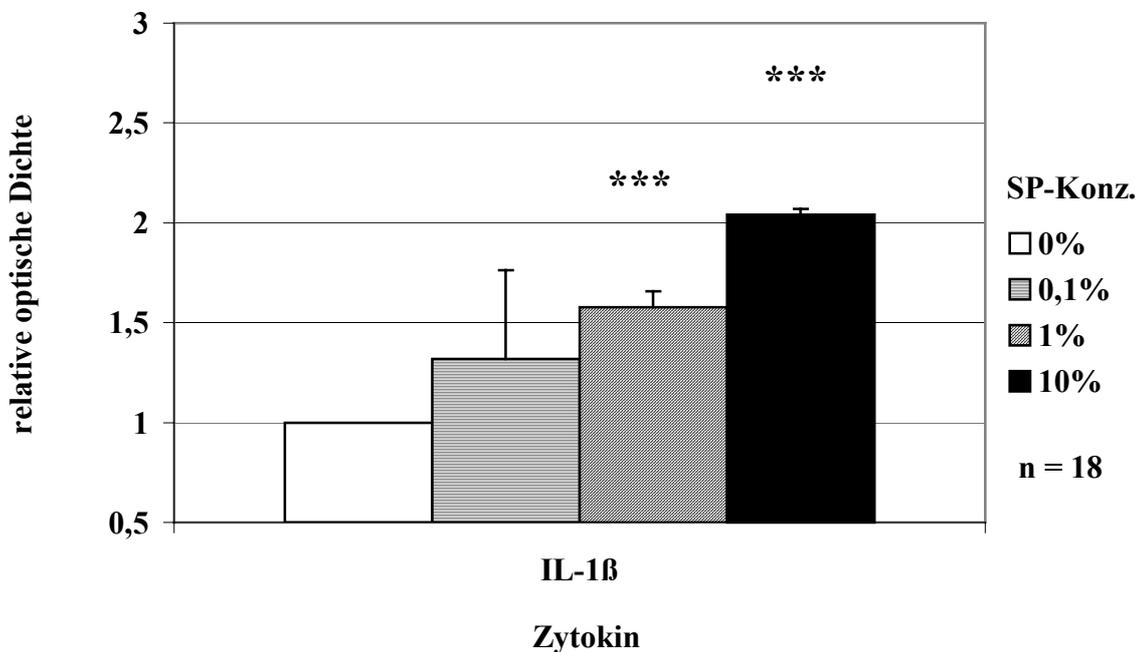


**Abb. 6:** Nachweis der Expression der mRNA für TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen nach Stimulierung mit 1% und 10% Seminalplasma für 3 h. Der 0% SP-Wert entspricht der unstimulierten Kontrolle. Die Expression der mRNA von CO-I zeigt, dass alle Proben auf die gleiche mRNA-Menge eingestellt und damit vergleichbar sind. Die Größen der einzelnen PCR-Banden sind folgendermaßen: TNF $\alpha$  254bp, IL-1 $\beta$  263bp, IL-6 628bp, CO-I 268bp und LIF 477bp.

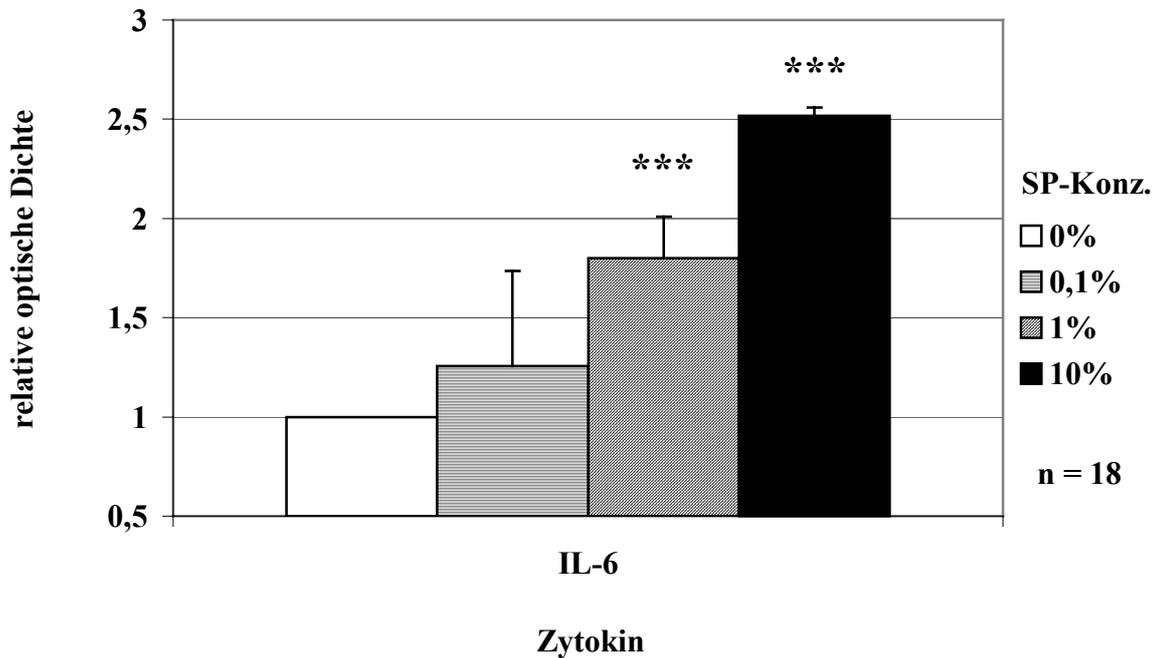
Die semiquantitativen Auswertungen der Zytokin-Expression erfolgen für jedes einzelne Zytokin gesondert. Die Reihenfolge der Zytokine entspricht derjenigen auf dem RPA. Bei den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF sind die Signifikanzen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle jeweils über der SP-Konz. als Stern angegeben: \*\*\* =  $p < 0,001$



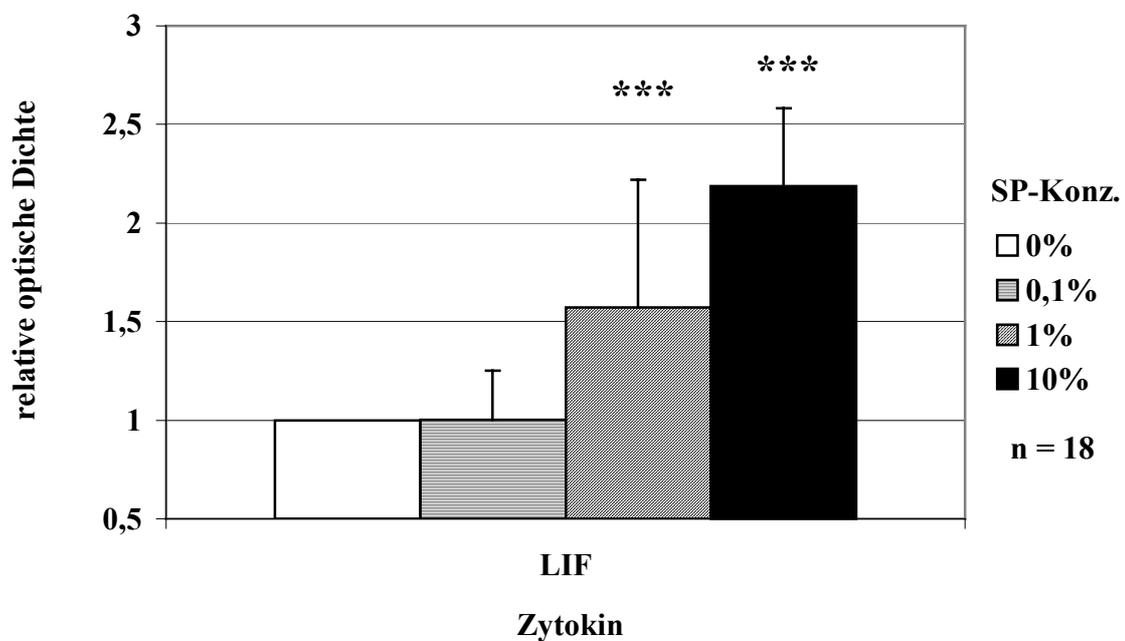
**Abb. 7:** Expression der  $\text{TNF}\alpha$  - mRNA nach Stimulation der Epithelzellen für 3 h mit steigenden Seminalplasma-Konzentrationen von 0%, 0,1% 1% und 10%. Es sind außer bei der Kontrolle (0% SP) immer die Standardabweichungen als Balken angegeben.



**Abb. 8:** Expression der  $\text{IL-1}\beta$  - mRNA nach Stimulation der Epithelzellen für 3 h mit steigenden Seminalplasma-Konzentrationen von 0%, 0,1% 1% und 10%. Es sind außer bei der Kontrolle (0% SP) immer die Standardabweichungen als Balken angegeben. \*\*\*:  $p < 0,001$

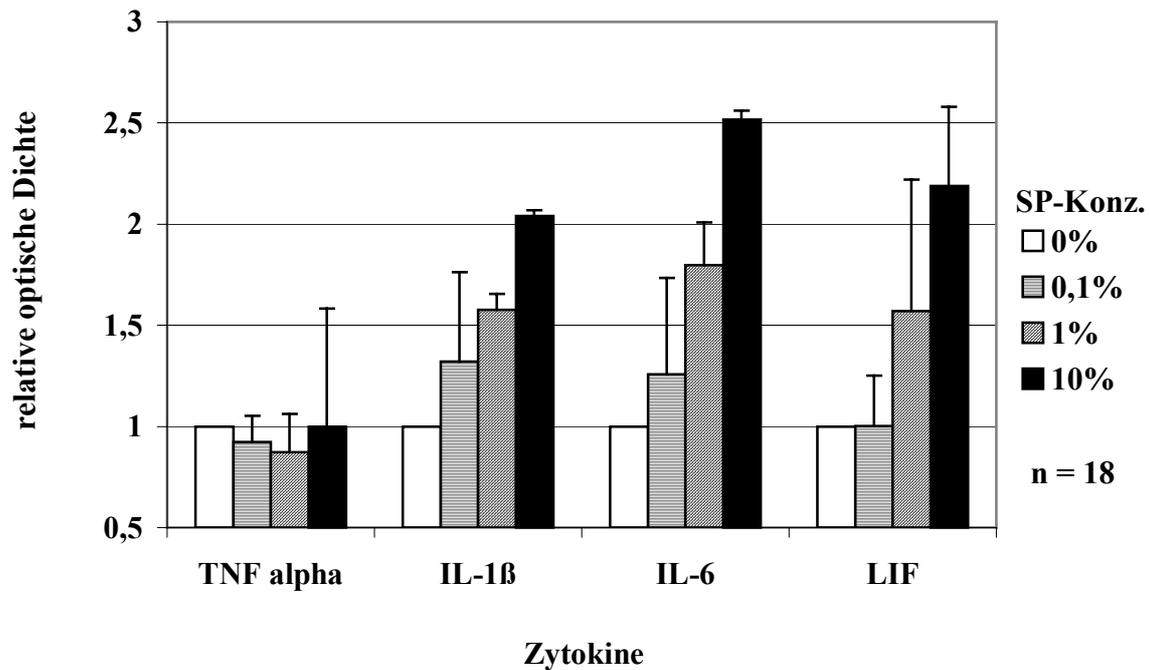


**Abb. 9:** Expression der IL-6 - mRNA nach Stimulation der Epithelzellen für 3 h mit steigenden Seminalplasma-Konzentrationen von 0%, 0,1% 1% und 10%. Es sind außer bei der Kontrolle (0% SP) immer die Standardabweichungen als Balken angegeben. \*\*\*:  $p < 0,001$



**Abb. 10:** Expression der LIF - mRNA nach Stimulation der Epithelzellen für 3h mit steigenden Seminalplasma-Konzentrationen von 0%, 0,1% 1% und 10%. Es sind außer bei der Kontrolle (0% SP) immer die Standardabweichungen als Balken angegeben. \*\*\*:  $p < 0,001$

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse nochmals zusammengefasst. Wie deutlich zu sehen ist, zeigt die dreistündige Inkubation der Epithelzellen mit Seminalplasma einen Effekt auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Dieser Effekt ist bei Stimulierung mit 10% Seminalplasma am größten. Deshalb wurden die Epithelzellen in allen folgenden Versuchen immer mit 10% Seminalplasma stimuliert.

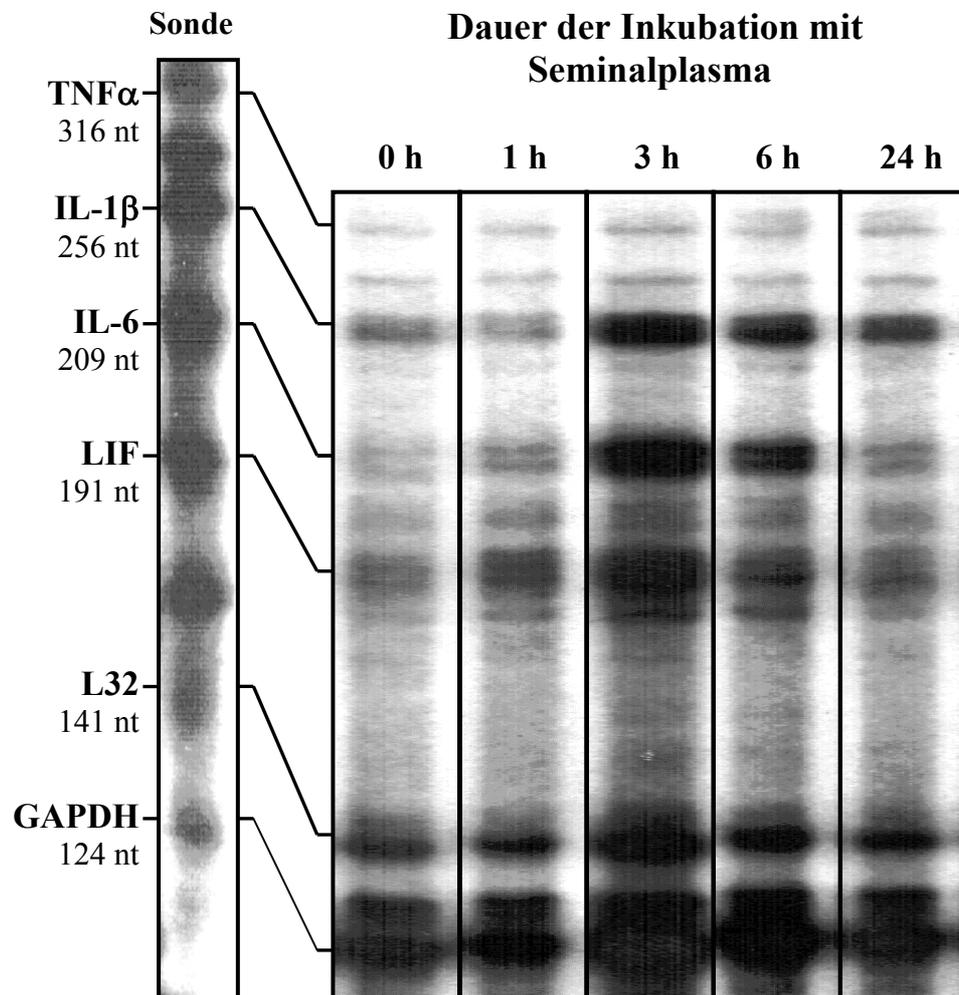


**Abb. 11:** Expression der TNF $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ -, IL-6- und LIF - mRNA in Epithelzellen nach Stimulation der Epithelzellen für 3 h mit steigenden Seminalplasma-Konzentrationen von 0%, 0,1% 1% und 10%. Es sind außer bei der Kontrolle (0% SP) immer die Standardabweichungen als Balken angegeben

#### 4.3.3.1.2. Zeitabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma

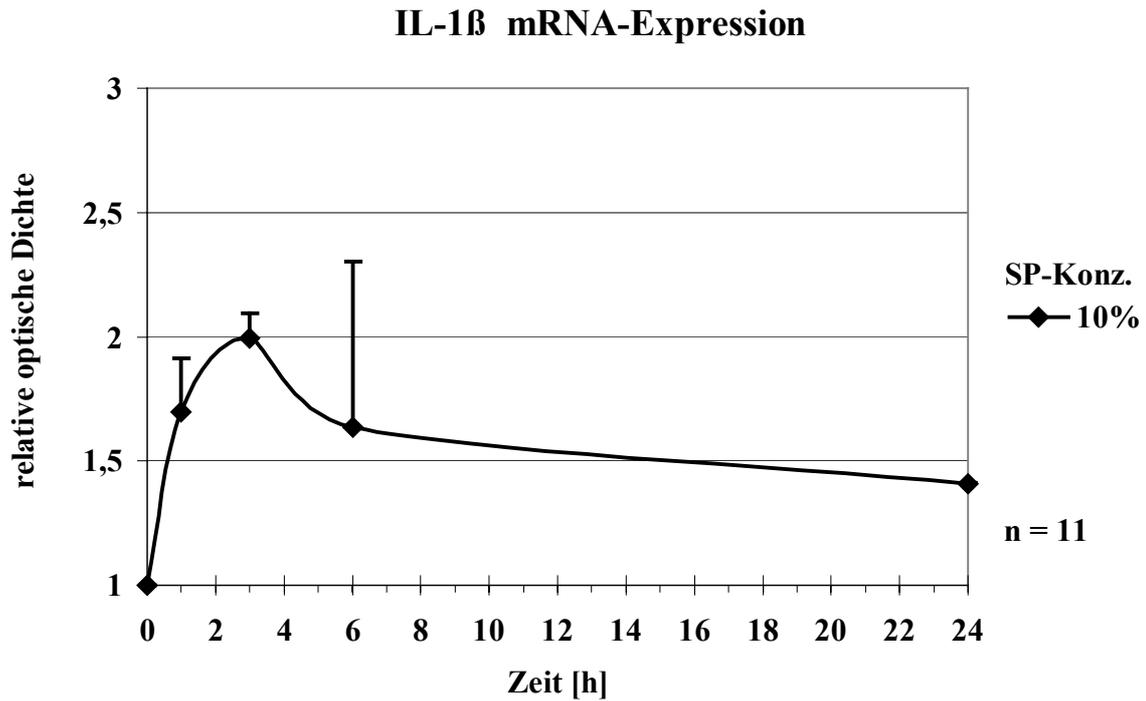
Um den optimalen Effekt der RNA-Expression der Epithelzellen durch die Stimulation mit Seminalplasma zu ermitteln, wurden die Epithelzellen unterschiedlich lange mit 10% Seminalplasma inkubiert. Die Exposition wurde nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h beendet. Nach einstündiger Exposition der Epithelzellen zeigte sich ein geringfügiger Anstieg der mRNA-Expression. Das Maximum der Zytokin-Expression lag bei einer Inkubationszeit von 3 h. Nach 6 h erfolgte eine leichte Abnahme der Expression, die jedoch immer noch auf einem hohen Niveau lag. Nach 24 h Inkubation war nur noch eine geringe mRNA-Expression nachweisbar.

Zur Veranschaulichung ist der RPA dargestellt:

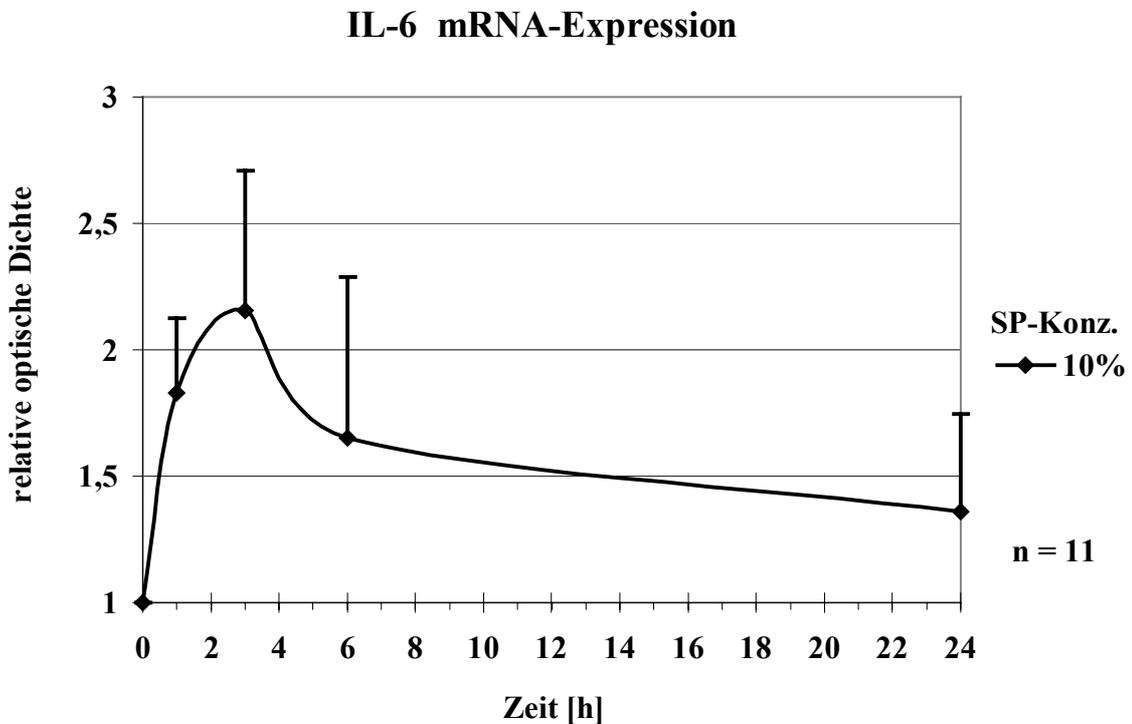


**Abb. 12:** Darstellung der Zytokin-Expression in Epithelzellen nach Stimulierung mit 10% Seminalplasma in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition. Die Expositionszeiten betragen 1 h, 3 h, 6 h und 24 h. Der 0 h-Wert entspricht der unstimulierten Kontrolle.

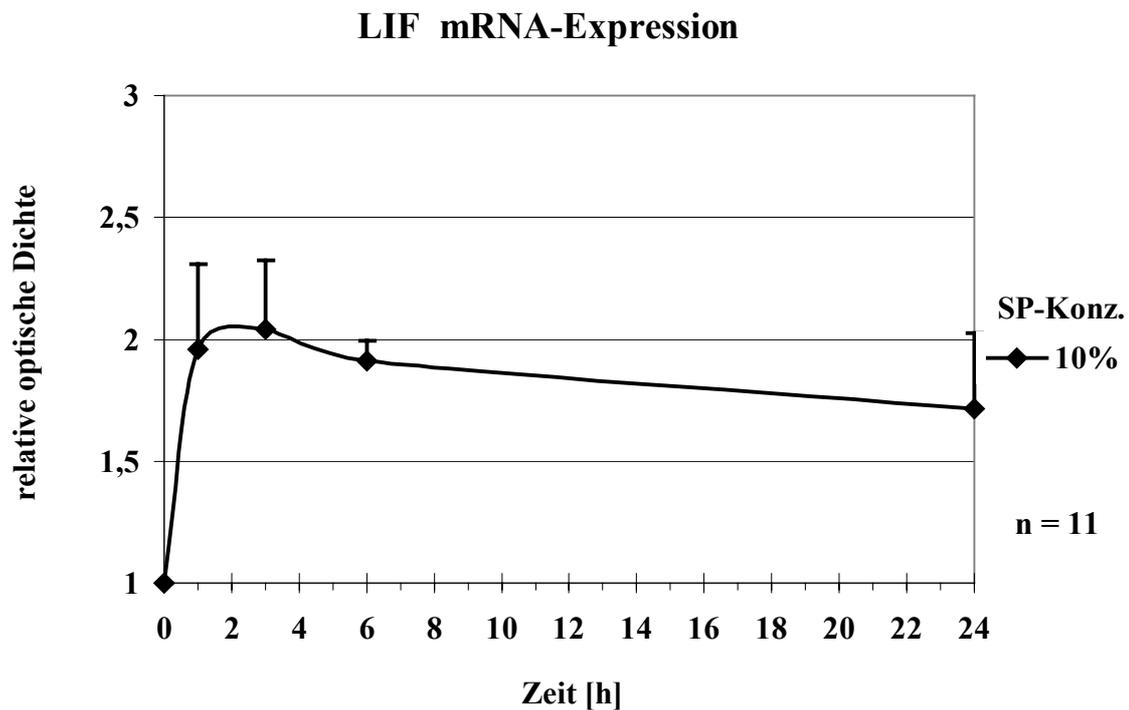
Die Versuche wurden an 11 Epithelzellkulturen durchgeführt. Die semiquantitativen Auswertungen der mRNA-Expression erfolgen für jedes Zytokin einzeln. Bei allen Zytokinen ist die Verlaufskurve identisch und das Maximum der Expression bei 3 h deutlich zu erkennen.



**Abb. 13:** Expression der IL-1 $\beta$ - mRNA in Epithelzellen in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition mit 10% Seminalplasma. Die Versuche wurden nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h beendet. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.



**Abb. 14:** Expression der IL-6 - mRNA in Epithelzellen in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition mit 10% Seminalplasma. Die Versuche wurden nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h beendet. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.



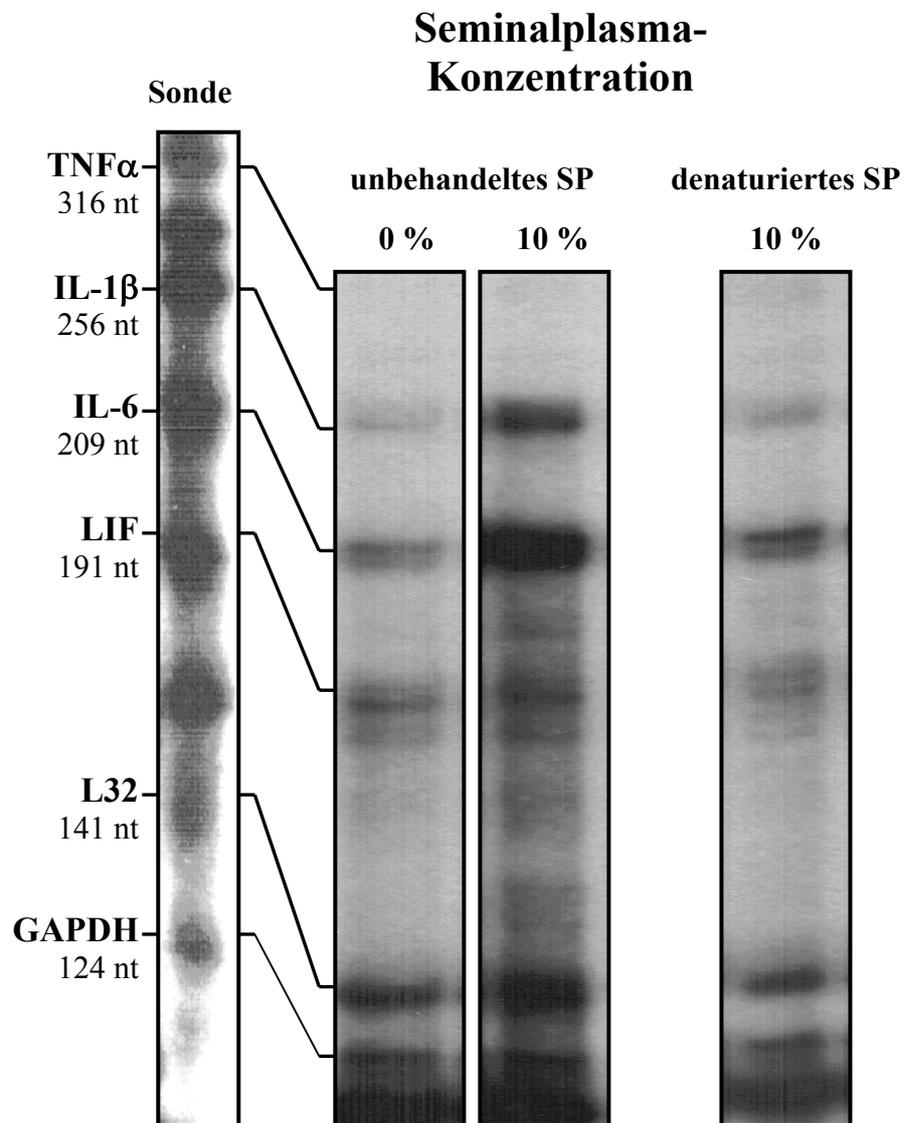
**Abb. 15:** Expression der LIF - mRNA in Epithelzellen in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition mit 10% Seminalplasma. Die Versuche wurden nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h beendet. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.

Wie in den Abbildungen 13 bis 15 zu erkennen ist, ist der zeitabhängige Verlauf der Zytokin-Expression bei allen Zytokinen ähnlich. Der höchste Wert wird bei allen Zytokinen nach dreistündiger Inkubation der Epithelzellen mit Seminalplasma erreicht. Deshalb werden die Epithelzellen in allen weiteren Versuchen für 3 h mit 10% Seminalplasma inkubiert.

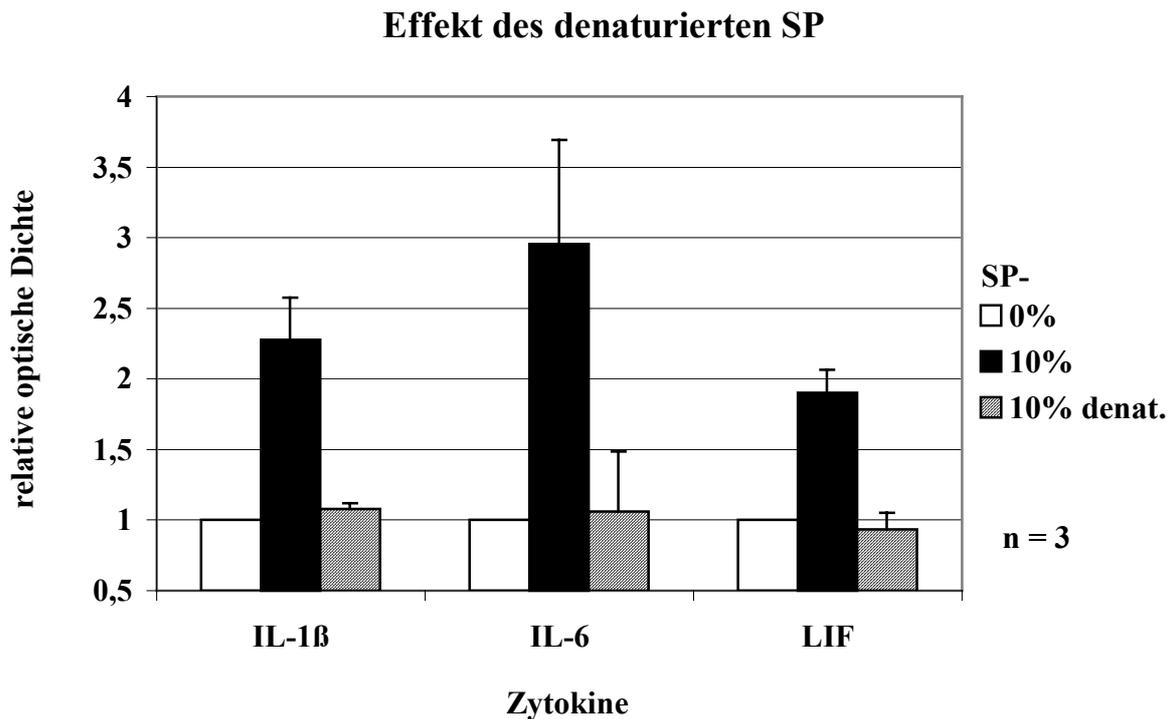
#### 4.3.3.1.3. Effekt der Stimulation mit denaturiertem Seminalplasma

Um festzustellen, ob das Denaturieren von Proteinen und Peptiden durch Erhitzen eine Wirkung auf die RNA-Expression der Epithelzellen hat, wurden diese mit jeweils 10% nicht denaturiertem und denaturiertem Seminalplasma zusammen kultiviert. Wie aus dem Graphen deutlich ersichtlich, ist der Effekt des Seminalplasmas durch seine Denaturierung vollständig reversibel. Dies lässt den Schluss zu, dass hauptsächlich Proteine und Peptide für den Effekt des Seminalplasmas auf die Epithelzellen verantwortlich sind.

Zur Veranschaulichung ist der RPA dargestellt:



**Abb. 16:** Darstellung der Zytokin-Expression in Epithelzellen nach Stimulierung mit je 10% nicht denaturiertem und denaturiertem Seminalplasma nach 3 h Inkubationszeit. Die vollständige Reversibilität des Effektes von unbehandeltem SP durch denaturiertes SP ist klar ersichtlich. Der 0% SP-Wert entspricht der unstimulierten Kontrolle.



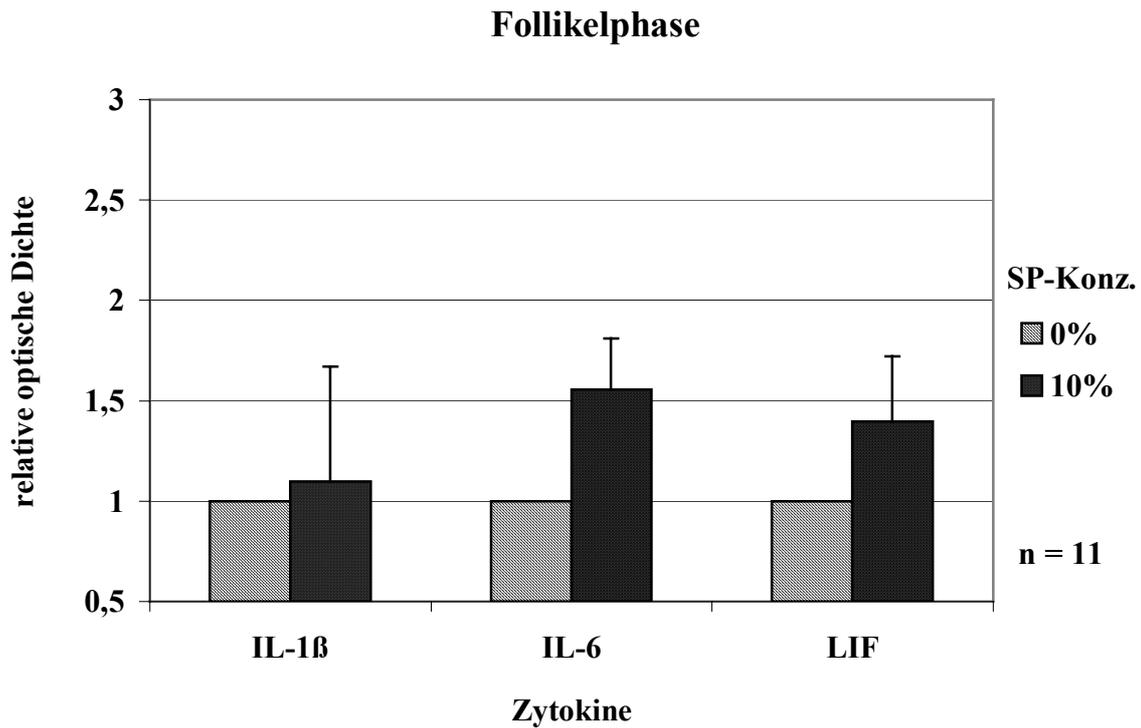
**Abb. 17:** Stimulierung der Epithelzellen mit je 10% nicht denaturiertem und denaturiertem Seminalplasma für 3 h. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur (0% SP). Die mRNA-Expression für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF ist dargestellt. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.

#### 4.3.3.1.4. Vergleich der Expression in verschiedenen Zyklusphasen

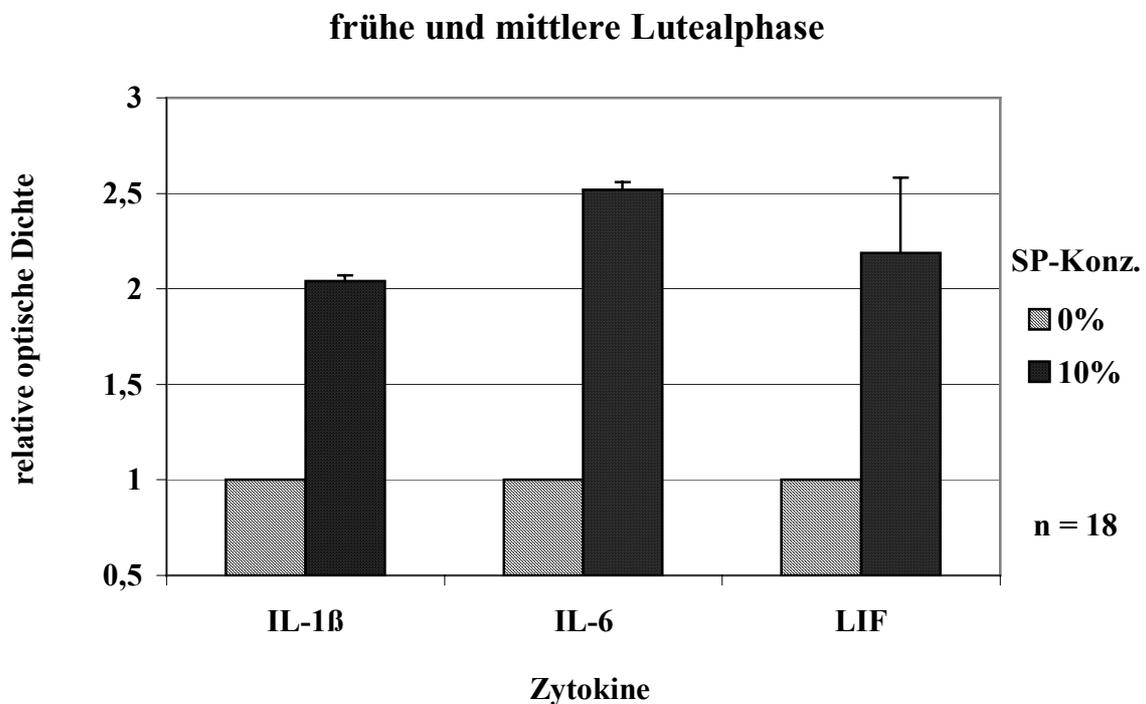
Die 33 kultivierten Epithelzellkulturen konnten aufgrund der Zyklusangaben der Patientinnen und aufgrund der Bestimmung der Hormone 17 $\beta$ -Östradiol und Progesteron in zwei Gruppen unterschieden werden. Dazu wurde jeweils der genaue Zyklustag berechnet. Die Einteilung in Follikel- bzw. Lutealphase erfolgte unter Berücksichtigung der Zyklusdauer und einer angenommenen konstanten Dauer der Lutealphase von 14 Tagen. Progesteronwerte, die über 2,5 ng/ml lagen, führten zur Einteilung in die frühe und mittlere Lutealphase. Alle anderen Progesteronwerte wurden der Follikel- und späten Lutealphase zugeordnet, je nach Angabe über den Zyklus. Somit ergab sich folgende Einteilung:

Gesamtzahl	Follikelphase	frühe und mittlere Lutealphase	späte Lutealphase
33 Uteri	15 Uteri	18 Uteri	4 Uteri

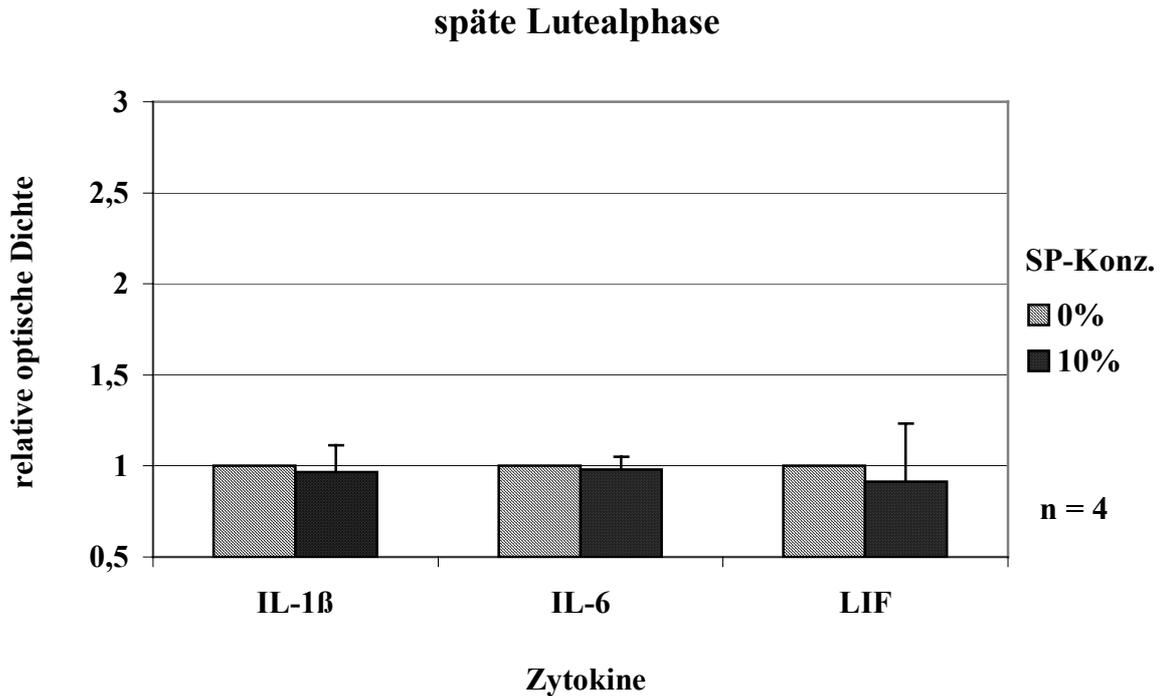
Es wurden folgende Daten ermittelt:



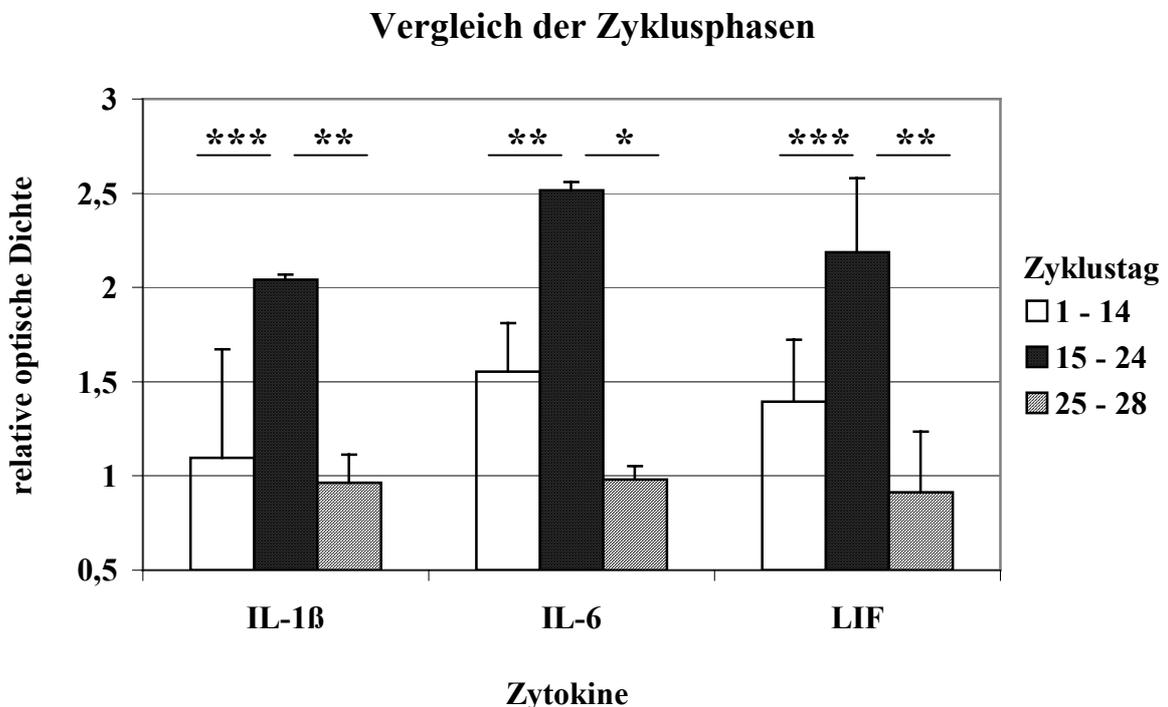
**Abb. 18:** mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen aus der Follikelphase nach Stimulierung mit 10% Seminalplasma für 3 h. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.



**Abb. 19:** mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen aus der frühen und mittleren Lutealphase nach Stimulierung mit 10% Seminalplasma für 3 h. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.



**Abb. 20:** mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen aus der späten Lutealphase nach Stimulierung mit 10% Seminalplasma für 3 h. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.



**Abb. 21:** mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen in den verschiedenen Zyklusphasen nach Stimulierung mit 10% Seminalplasma für 3 h. Tag 1 – 14 entspricht der Follikelphase, Tag 15 – 24 der frühen und mittleren Lutealphase und Tag 25 – 28 der späten Lutealphase. Es sind jeweils die Standardabweichungen als Balken angegeben.  
\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$

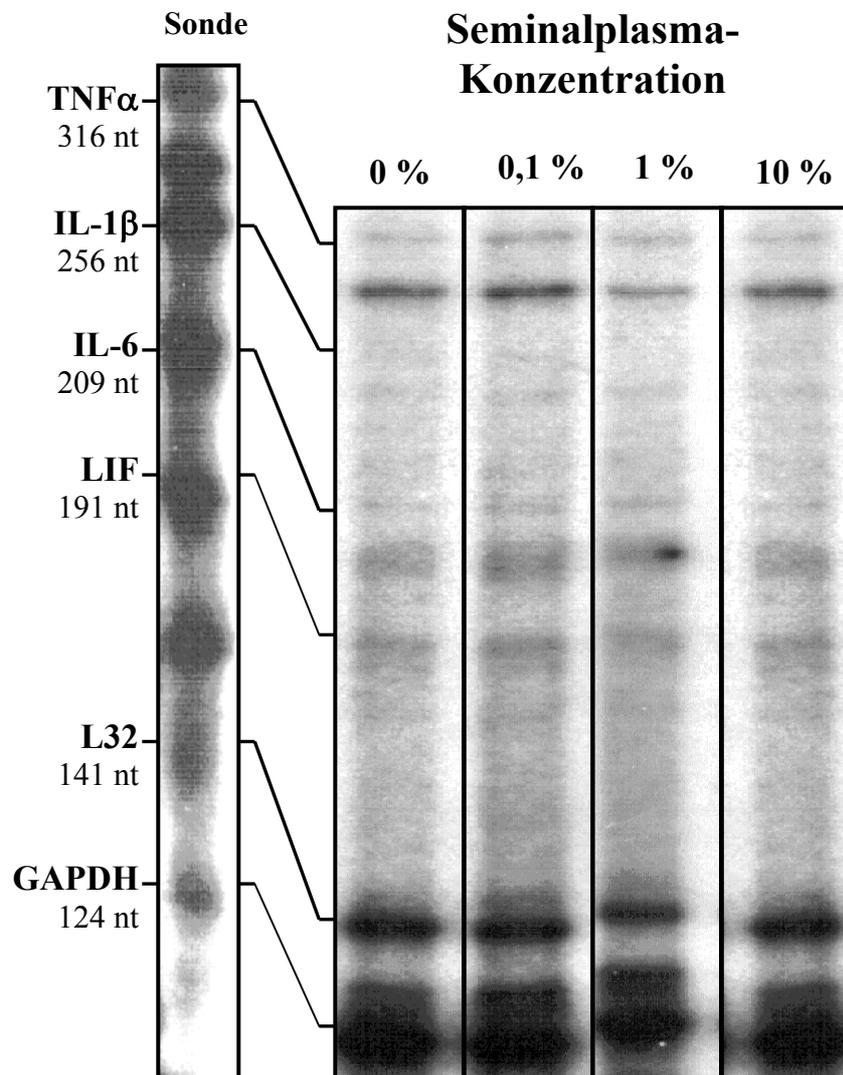
In Abbildung 21 sind die einzelnen Zyklusphasen im Vergleich dargestellt. Zyklustag 1 – 14 umfasst die Follikelphase, Zyklustag 15 bis 24 die frühe und mittlere Lutealphase und Zyklustag 25 bis 28 die späte Lutealphase. Der Unterschied in der Stimulierbarkeit der endometrialen Epithelzellen in den verschiedenen Zyklusphasen ist gut zu sehen. Für LIF, IL-1 $\beta$  und IL-6 ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen Follikelphase sowie früher und mittlerer Lutealphase, wobei dieser Unterschied für LIF und IL-1 $\beta$  noch deutlicher ist. Beim Vergleich der frühen und mittleren Lutealphase mit der späten Lutealphase ist nur für IL-1 $\beta$  und LIF ein hoch signifikanter Unterschied vorhanden. Für IL-6 findet sich beim Vergleich der frühen und mittleren mit der späten Lutealphase nur ein signifikanter Unterschied. Somit ist die Stimulierbarkeit der Epithelzellen mit 10% Seminalplasma in der frühen und mittleren Lutealphase eindeutig am größten. Dies hat zur Folge, dass auch die Zytokin-Expression in den Epithelzellen in dieser Zeit am besten stimuliert werden kann.

#### 4.3.3.2. Durchführung der Versuche in Stromazellen

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden  $1 \cdot 10^4$  Stromazellen am Vortag des Versuchs in 24 Well-Platten ausgestreut. Am Versuchstag wurden die fast konfluenten Zellen mit Seminalplasma stimuliert.

##### 4.3.3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma

Die nahezu konfluenten Stromazellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Seminalplasma, 0,1%, 1% und 10% SP im Medium, für 3 h inkubiert. Als Kontrolle diente die unstimulierte Kultur. Der Effekt dieser Stimulation ist nur im RNase Protection Assay dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Stromazellen durch Seminalplasma nicht stimuliert werden können.



**Abb. 22:** Darstellung der mRNA-Expression der Zytokine in Stromazellen nach 3 h Inkubation mit steigenden Seminalplasma-Konzentrationen von 0,1%, 1% und 10%. 0% SP entspricht der unstimulierten Kontrolle.

Wie im RPA deutlich zu erkennen ist, bleibt die Zytokin-Expression von der Stimulierung mit Seminalplasma unbeeinflusst.

#### 4.3.3.2.2. Zeitabhängigkeit der Stimulation mit Seminalplasma

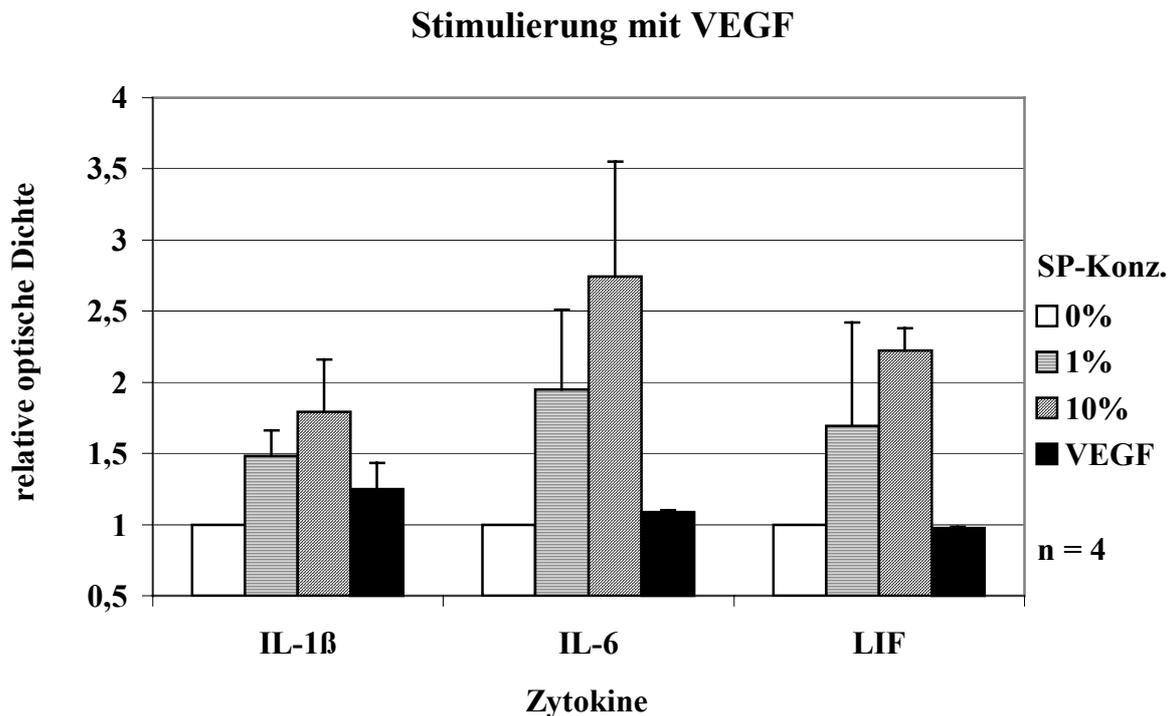
Die Stromazellen wurden für 1 h, 3 h, 6 h und 24 h mit 10% Seminalplasma inkubiert, um einen möglichen Effekt des Seminalplasmas auf die mRNA-Synthese der Zellen nachzuweisen. Aber auch bei diesen Versuchen konnte keine mRNA-Expression der Zytokine nachgewiesen werden.

#### **4.3.4. Untersuchung der Regulation der Expression pro-inflammatorischer Zytokine unter Stimulation mit rekombinanten Zytokinen in Epithelzellen**

Die Epithelzellen wurden mit derjenigen Konzentration des rekombinanten Zytokins stimuliert, wie diese in 10% des verwendeten Seminalplasma-Pools nahezu vorlag. Parallel dazu erfolgte die Stimulation der Epithelzellen mit 10% SP, um die Messergebnisse vergleichen zu können. Zur Abschätzung der Wirksamkeit der Stimulierung mit dem jeweiligen Zytokin wurde auch noch die Stimulierung mit 1% SP aufgetragen. Eine Stimulierung mit 0,1% SP wurde nicht vorgenommen, da sich mit 0,1% SP kein Effekt auf die Epithelzellen nachweisen ließ, siehe 4.3.3.1.1.

##### 4.3.4.1. Stimulierung mit VEGF

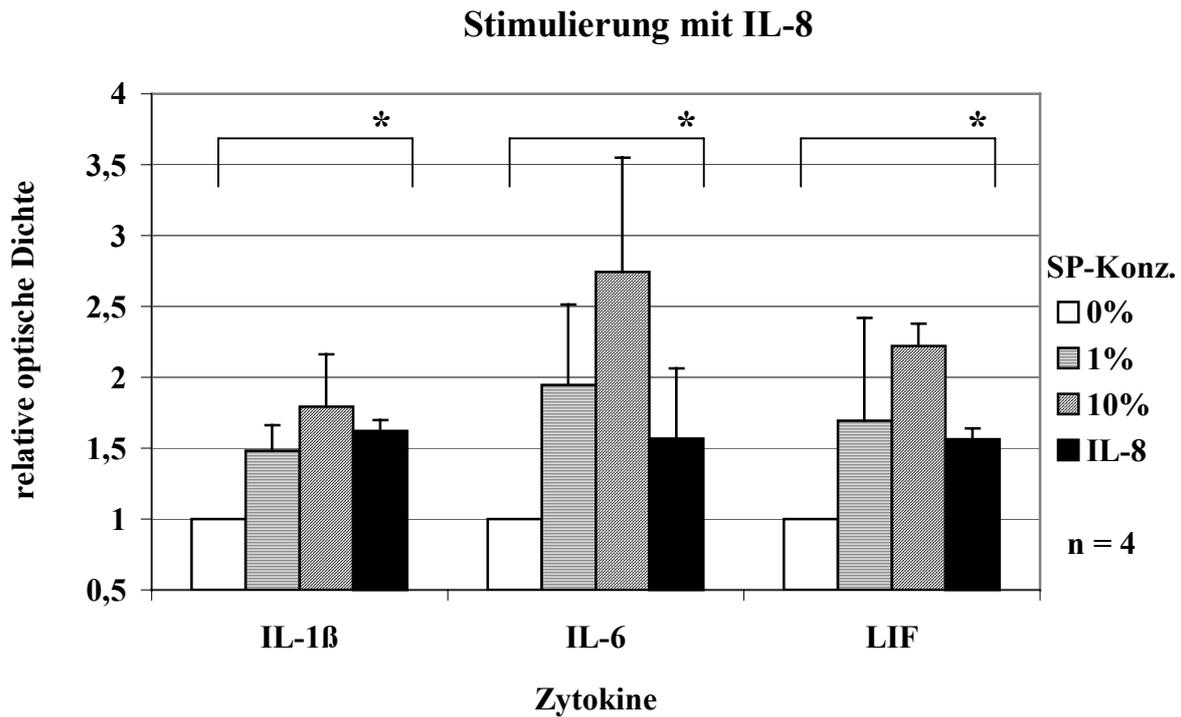
VEGF liegt im Seminalplasma in sehr hohen Konzentrationen vor, nämlich in 1000fach höherer Konzentration als im Serum. Die Epithelzellen wurden im Versuch mit dieser Konzentration an rekombinatem VEGF stimuliert, wie sie in 10% SP vorlag. Die Stimulierung mit VEGF resultiert in einem nur 31%-igen Anstieg der IL-1 $\beta$ - mRNA-Expression im Vergleich zur Stimulierung mit 10% SP. Auch im Vergleich zur Stimulierung mit nur 1% SP ist der Anstieg deutlich geringer. Die Expression der IL-6 - und LIF - mRNA konnte durch VEGF nicht induziert werden. Das Ergebnis der Stimulation mit VEGF ist in dem Diagramm zusammengefasst und zeigt keine Signifikanz.



**Abb. 23:** mRNA- Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen nach Stimulierung mit rekombinantem VEGF für 3 h im Vergleich zu 1% und 10%. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur. Die Standardabweichungen sind jeweils als Balken angegeben.

#### 4.3.4.2. Stimulierung mit IL-8

IL-8 liegt im Seminalplasma in 50fach höherer Konzentration als im Serum vor. Deswegen wurde dieses Zytokin als potentieller Kandidat für die Auslösung der Zytokin-Expression untersucht. Die Epithelzellen wurden in der Konzentration des rekombinanten IL-8 stimuliert, die seiner Konzentration in 10% Seminalplasma annähernd entspricht. Zusätzlich wurden die Epithelzellen mit 1% SP stimuliert, um den Effekt von IL-8 abschätzen zu können. Das Ergebnis der Stimulation ist in Abbildung 24 dargestellt. Wie klar zu sehen ist, bewirkt IL-8 als alleiniger Stimulus einen Anstieg der IL-1 $\beta$ - und LIF-mRNA-Expression, während die Expression der IL-6 - mRNA kaum angeregt wird. Der Anstieg beträgt im Vergleich zu 10% SP bei der Expression von IL-1 $\beta$  78%, bei IL-6 nur 33% und bei LIF 46%. Der Unterschied zwischen den unstimulierten und den mit IL-8 stimulierten Zellen ist signifikant.

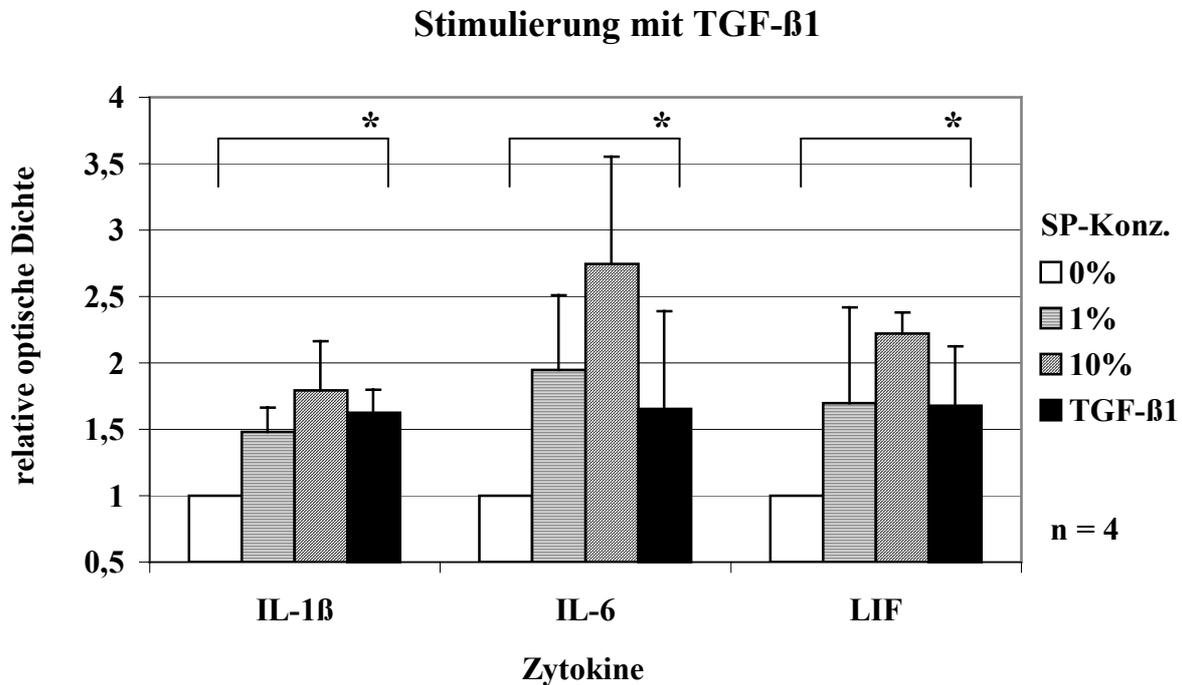


**Abb. 24:** mRNA- Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen nach Stimulierung mit rekombinantem IL-8 für 3 h im Vergleich zu 1% und 10% SP. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur. Die Standardabweichungen sind jeweils als Balken angegeben.  
 \* :  $p < 0,05$

#### 4.3.4.3. Stimulierung mit TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 liegt im Seminalplasma in 10fach höherer Konzentration als im Serum vor. Dieses Zytokin wurde ebenfalls als potentieller Kandidat für die Auslösung der Zytokin-Expression in den Epithelzellen untersucht. Die Epithelzellen wurden in derjenigen Konzentration des natürlichen TGF- $\beta$ 1 stimuliert, die seiner Konzentration in 10% Seminalplasma annähernd entspricht. Zum Vergleich und zur Abschätzung der Wirksamkeit des isolierten TGF- $\beta$ 1 wurde auch die Expression der Epithelzellen nach Stimulierung mit 1% SP untersucht. TGF- $\beta$ 1 als alleiniger Stimulus bewirkt einen Anstieg der IL-1 $\beta$ - und LIF- mRNA-Expression, während die Expression der IL-6 - mRNA kaum angeregt wird. Im Vergleich zu 10% SP beträgt der Anstieg bei der Expression von IL-1 $\beta$  79%, bei IL-6 nur 38% und bei LIF 56%. Der Anstieg der Zytokin-Expression durch TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ist für alle Zytokine signifikant. Somit ist TGF- $\beta$ 1 für sich alleine ein wirksamer Stimulus für die Epithelzellen.

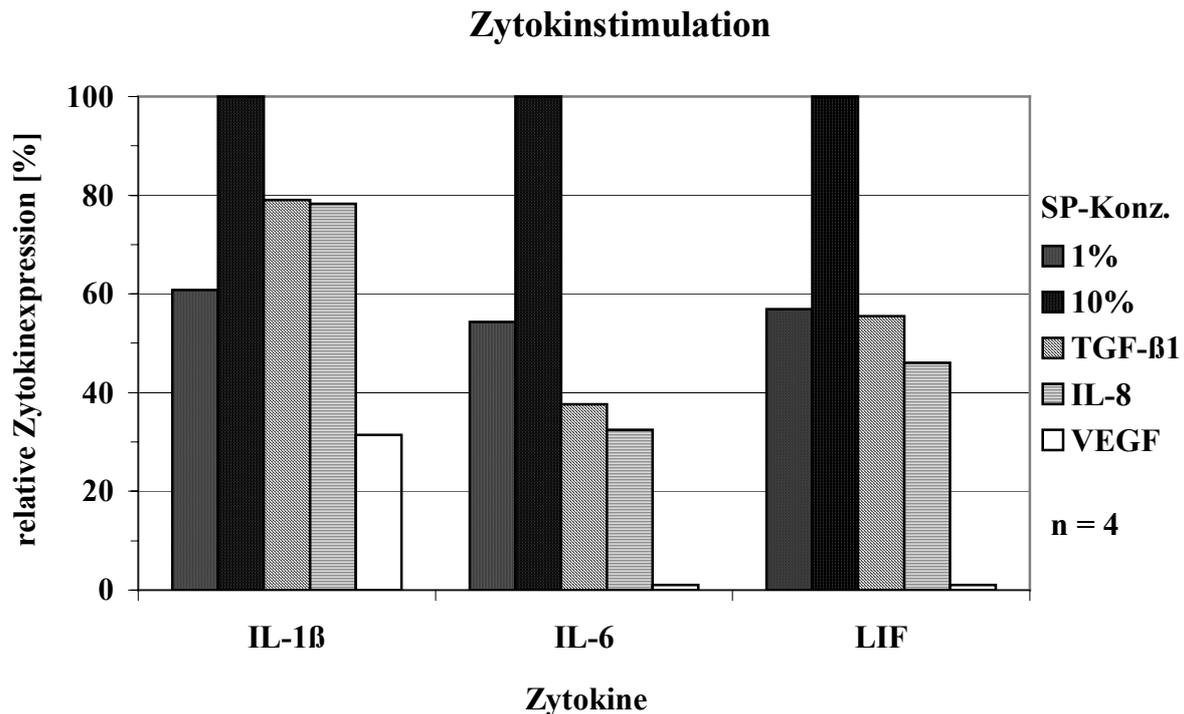
Das Ergebnis der Stimulation ist in dem folgenden Diagramm dargestellt.



**Abb. 25:** mRNA- Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen nach Stimulierung mit natürlichem TGF- $\beta$ 1 für 3 h im Vergleich zu 1% und 10% SP. Als Kontrolle dient die unstimulierte Kultur. Die Standardabweichungen sind jeweils als Balken angegeben.  
 \* : p < 0,05

#### 4.3.4.4. Gesamtschau

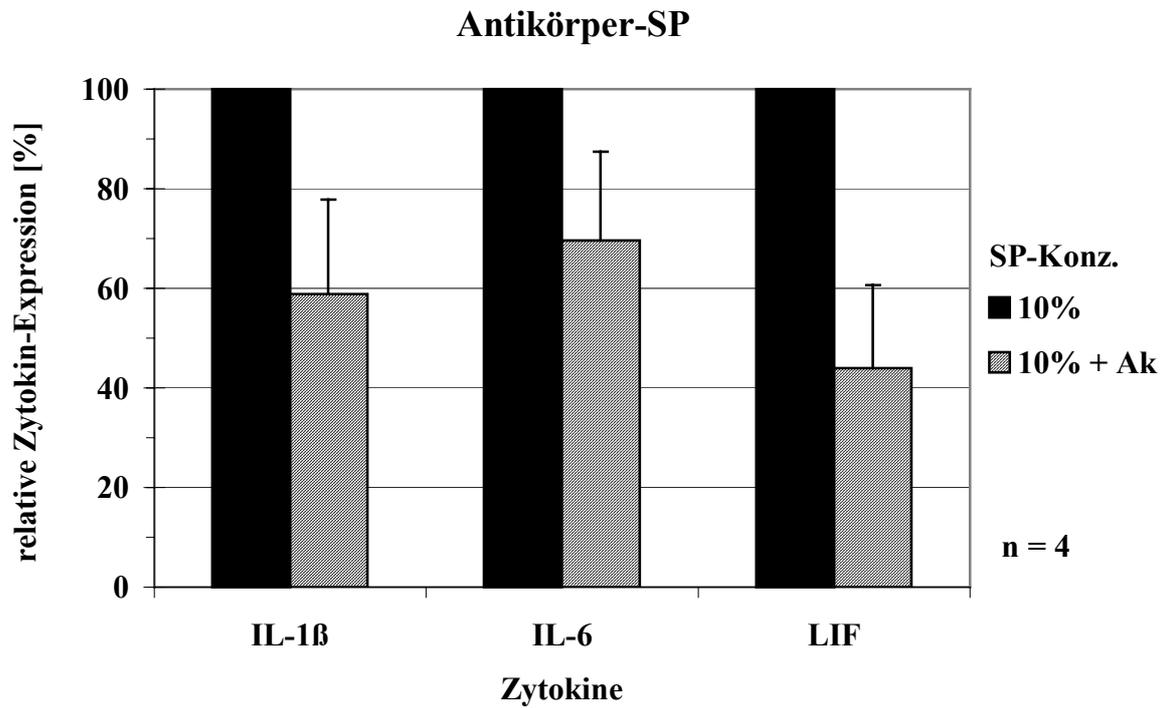
Die Ergebnisse der Stimulation mit den einzelnen Zytokinen VEGF, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 sind der Übersicht halber nochmals in dem folgenden Diagramm (Abb. 26), das in Prozent den relativen Anstieg der Zytokin-Expression im Vergleich zu 10% SP angibt, zusammengefasst. Es ist klar zu sehen, dass IL-8 und TGF- $\beta$ 1 einen großen Effekt auf die Expression der mRNA von IL-1 $\beta$  und LIF haben, während die Expression der IL-6 - mRNA nahezu unbeeinflusst bleibt. Die Auswirkung der Stimulation mit IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von IL-1 $\beta$  ist größer als durch die Stimulation mit nur 1% SP, bei LIF ist sie genauso groß und für IL-6 ist sie deutlich geringer. Bei Stimulation mit dem rekombinanten VEGF konnte nur für die Expression von IL-1 $\beta$  ein geringfügiger Effekt festgestellt, auf die Expression der beiden anderen Zytokine IL-6 und LIF konnte kein Effekt nachgewiesen werden.



**Abb. 26:** mRNA- Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen nach Stimulierung mit den Zytokinen TGF- $\beta$ 1, IL-8 und VEGF sowie 1% und 10% SP für 3 h.

#### 4.3.4.5. Stimulierung mit TGF- $\beta$ 1,2,3-Antikörper im Seminalplasma

Um nachzuweisen, dass der Effekt durch die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 auch wirklich auf dieses Zytokin zurückzuführen ist, wurde das Seminalplasma im Überschuss mit TGF- $\beta$ 1,2,3-Antikörper versetzt. Mit diesem behandelten Seminalplasma wurden die Epithelzellen in der bekannten 10% SP-Konzentration für 3 h inkubiert. Es wurde im ELISA nachgewiesen, dass das behandelte Seminalplasma kein detektierbares freies TGF- $\beta$ 1 mehr enthält, siehe 4.2.2. Das Ergebnis dieser Stimulation ist in dem nachfolgenden Diagramm, Abb. 27, dargestellt. Es ist zu sehen, dass das behandelte Seminalplasma einen geringeren Effekt auf die Expression der Zytokine hat als das unbehandelte. Für IL-1 $\beta$  konnte im Vergleich zum unbehandelten Seminalplasma nur 59% der mRNA-Expression erreicht werden, für IL-6 70% und für LIF 44%. Als Kontrolle wurde das Seminalplasma mit 5  $\mu$ g/ml monoklonalem Maus-IgG1 versetzt und die Epithelzellen damit stimuliert. Es ergab sich im Vergleich zur Stimulation mit 10% SP keine wesentliche Veränderung. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das TGF- $\beta$ 1,2,3-Antikörper selbst einen Effekt auf die Epithelzellen hat.



**Abb. 27:** mRNA- Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF in Epithelzellen nach Stimulierung mit TGF- $\beta$ 1,2,3-Antikörper in 10% SP für 3 h im Vergleich zu 10% SP ohne den spezifischen Ak. Die Standardabweichungen sind jeweils als Balken angegeben.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Endometriale Dysregulation als Ursache der Infertilität**

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von Seminalplasma und Spermien für die Regulation der endometrialen Funktion zu ermitteln. Dies ist deswegen von Interesse, da etwa 14% aller Paare aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches medizinische Betreuung und Hilfe suchen (Ochsenkühn et al. 1998). Davon lässt sich etwa die Hälfte der Fälle, wie Huleihel et al. 1999 beschrieben haben, auf eine männliche Infertilität zurückführen. Da sehr oft konservative Behandlungsmethoden nicht den gewünschten Erfolg herbeiführen, bleibt für viele Paare nur die Anwendung assistierter Reproduktionsverfahren, wie die *in vitro* Fertilisation (IVF) oder die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Die Anwendung dieser Verfahren führt nur in etwa 20% der transferierten Embryonen zu einer erfolgreichen Schwangerschaft. Als Ursache für dieses unbefriedigende Ergebnis wird ein Implantationsversagen angesehen, das sich vermutlich auf ein inadäquat reguliertes, d.h. nicht rezeptives Endometrium zurückführen lässt (Salamonsen et al. 2002). Infolgedessen sind die Adhäsion und Invasion der Blastozyste gestört und dies führt letztendlich zum Untergang des Embryos.

Die Rezeptivität des Endometriums ist nur während einer kurzen Phase, dem sog. Implantationsfenster, gegeben. Der Zeitraum des Implantationsfensters wird bezüglich des Beginns und bezüglich der Dauer in der Literatur unterschiedlich angegeben. Der Beginn des Zeitraumes wird auf den Zyklustag mit dem LH-Peak, kurz LH, bezogen. Die Dauer umfasst maximal 10 Tage und wird von Sherwin et al. 2002 ab LH +5 oder +6 bis ca. LH +10/+13 angegeben, während Psychoyos et al. 1994 es von LH +5 bis +7 datieren oder wie Svalander et al. 1994 ab LH +7. Die Dauer wird auf 5 Tage festgelegt (Rogers et al. 1989) oder auf 7 Tage (Formigli et al. 1989). Lessey et al. 2000 und Merviel et al. 2001 legen es auf 4 Tage fest, von LH +6 bis +10 und Beier et al. 1998 beschreiben ein rezeptives uterines Milieu, das über 9 – 10 Tage stabil ist, beginnend ab LH +1 oder +2. Von Sunder et al. 2000 und Tabibzadeh 2002b wird es von LH +5 bis +10 angegeben.

In diesem Zeitraum erlaubt ein empfindliches Gleichgewicht von Zytokinen und anderen Mediatoren in endometrialen Epithel-, Stroma- und Immunzellen den bisher nur ansatzweise verstandenen Prozess der Implantation. Während der Implantationsperiode kommt es zu einer erhöhten endometrialen Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , angiogenetisch wirksamer oder immunmodulierender Zytokine wie VEGF, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF und LIF sowie dem Adhäsionsmolekül  $\beta$ 3-Integrin und dessen Ligand Osteopontin.

Für IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF konnte bisher eine Korrelation einer supprimierten Expression mit Implantationsstörungen nachgewiesen werden (Stewart et al. 1992; Simón et al. 1998; von Wolff et al. 2000).

## 5.2. Allgemeines zur Implantation

Die Implantation ist für die Einnistung des Embryos ein essentieller Vorgang. Sie hat einen inflammatorischen Charakter, an dem Prostaglandine und Zytokine beteiligt sind. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ödembildung und zum Leukozyten-Einstrom. Dabei sind viele Zytokine beteiligt, wie LIF und andere gp130-gebundene Zytokine, z.B. IL-6, IL-11, Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin 1 (CT-1) und ciliary neurotropic factor CNTF, das IL-1-System und die TGF- $\beta$ -Familie (Kelly et al. 2001). Allgemein lässt sich zur Wirkung der verschiedenen Zytokine, wie IL-1 u.a. sagen, dass diese vor allem parakrin die Modulation der Östrogen- und Progesteron-vermittelten Kontrolle endometrialer Funktionen bewirken. Durch ihre lokale Produktion und parakrine Wirkung beeinflussen sie auf entscheidende Weise die Differenzierung einzelner Gewebekompartimente (Beier et al. 2001).

Die Implantation ist aber auch von einigen anderen Faktoren abhängig. Erstens von der Morphologie der endometrialen epithelialen Zellen, zweitens von der Auslösung zweier Zytokin-Wellen, wobei die erste v.a. M-CSF, RANTES u.a. beinhaltet, die darauf folgende LIF, IL-1 u.a.. Letztere Welle induziert lokal molekulare Veränderungen in der Expression von Adhäsion- und Antiadhäsions-Molekülen. Drittens kommt es zur Bindung der Blastozyste an die Epithelzellen, die am Tag LH +6 bis +7 erfolgt, und schließlich zur Passage der Epithelschranke, der sog. Invasion (Dominguez et al. 2002).

## 5.3. Die Bedeutung der untersuchten Zytokine für das Endometrium

Zytokine werden im Endometrium von lymphoiden, endometrialen Stroma- und Epithelzellen exprimiert (Hunt et al. 1992, Tabibzadeh et al. 1992). Die Bedeutung der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF für das Endometrium wird im Folgenden einzeln ausführlich beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die endometriale Expression dieser Zytokine durch den Kontakt mit Seminalplasma signifikant anstieg.

- 1) Das IL-1-System umfasst die Untergruppen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie die dazugehörigen Rezeptoren IL-1 Ra, IL-1 R tI und tII (tI und tII: Typ I und Typ II). Bigonnesse et al. 2001 beschrieben zwei Haupt-Rezeptoren, IL-1R tI und tII; nur der IL-1R tI, der

wichtig für die Signaltransduktion ist und auf T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert ist, konnte im Endometrium mit einem dreiphasigen Erscheinungsprofil nachgewiesen werden. Dies wird von Lindhard et al. 2002 bestätigt. Sie zeigten, dass nur der IL-1 R tI im Endometrium aktiv ist, im Oberflächenepithel lokalisiert ist und mittluteal am stärksten exprimiert. Der IL-1R t II ist ein Inhibitor von IL-1 und wird am schwächsten am LH +7-Tag exprimiert (Bigonnesse et al. 2001). Im Implantationsfenster, ab LH +5 konnte eine reduzierte Expression festgestellt werden (Boucher et al. 2001). In dieser Arbeit wurde die Expression des IL-1 R tI bestätigt, konnte allerdings nicht durch die Stimulation mit Seminalplasma gesteigert werden. Der IL-1R steigt mittluteal im Endometrium an und seine mRNA ist im luminalen Epithel von LH +1 bis +8 nachweisbar (Lindhard et al. 2002).

Die IL-1-Interleukine unterstützen, wie Das et al. 2002 nachgewiesen haben, den Schwangerschaftserfolg und sind wichtig für die Embryo-Implantation, zudem wird IL-1 über IL-6 induziert. Sowohl IL-1 als auch IL-6 sind in erhöhten Mengen für die Embryo-Anlagerung an das Endometrium und die Embryo-Invasion erforderlich. Für das Endometrium von besonderer Bedeutung ist das Interleukin IL-1 $\beta$ . Bereits 1990 konnten Kauma et al. die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in der sekretorischen Phase ab Tag 23, d.i. LH +9 im für eine Schwangerschaft rezeptiven Endometrium und in Trophoblast-Zellen nachweisen. von Wolff et al. 2000 stellten fest, dass IL-1 $\beta$  in allen Zyklusphasen exprimiert ist, in der proliferativen Phase etwas stärker als in der frühen sekretorischen Phase. Rund um das Implantationsfenster kommt es zu einem Anstieg der mRNA. Bergqvist et al. 2001 konnten zeigen, dass IL-1 $\beta$  in Makrophagen, Epithel- und Stromazellen exprimiert wird, im Epithel vor allem in der späten sekretorischen Phase. Außerdem sind Makrophagen selbst in der Lage besonders IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  zu produzieren. Des Weiteren führten Tabibzadeh et al. 1989 den Nachweis, dass IL-1 $\beta$  die Expression von IL-6 mRNA stimuliert. Fazleabas et al. 2002 sahen in IL-1 $\beta$  einen möglichen Faktor bei der Differenzierung der Stromazellen in Deziduazellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Embryonen kurz vor der Implantation auch mRNA für IL-1 $\beta$ , IL-1 Ra und IL-1 R tI exprimieren. Dabei scheint die Sekretion des embryonischen IL-1 $\beta$  die erste Antwort der Blastozyste an das rezeptive Endometrium zu sein und eine zweite Welle von Zytokinen wie IL-1, LIF u.a. auszulösen (Lindhard et al. 2002). Eine weitere wichtige Funktion von IL-1 und TNF liegt in ihrer Verstärkung der Expression der IL-8 mRNA (Arici et al. 1993) und der TGF- $\beta$ 1 mRNA (Arici et al. 1996). Kelly et al. 2001 konnten zeigen, dass IL-1 häufig synergistisch mit anderen

Zytokinen agiert, beispielsweise induziert es mit  $\text{TNF}\alpha$  die Produktion von IL-8 und PG-E2 und die mRNA-Synthese von LIF. Des Weiteren fanden Simón et al. 2000 eine Induktion der Cyclo-Oxygenase2-Expression im Stroma durch IL-1 $\beta$  induziert und schlossen daraus, dass es um die Zeit der Implantation zu einem durch IL-1 $\beta$  vermittelten parakrinen Effekt in der Kontrolle der Prostaglandin-Synthese kommt. Diese Vermutung wird von Dominguez et al. 2002 bestätigt. Eine weitere wichtige Funktion hat das IL-1-System in der Aktivierung von Integrinen. IL-1 $\beta$ , das von der Blastozyste exprimiert wird, induziert VEGF, welches wiederum die Angiogenese und die Integrin-Expression in den endometrialen Zellen vorantreibt. Auf diese Weise könnte die Implantation unterstützt werden (Sunder et al. 2000). Cork et al. 2002 fanden in den Überständen von Epithelzellkulturen kein detektierbares IL-1 $\beta$ . Dies konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen bestätigt werden.

- 2) IL-6 ist ein Mitglied der großen IL-6-Familie. Zu dieser Familie gehören ebenso die Zytokine IL-11, LIF, OSM und andere, wie CNF und CT-1. Auf diese weiteren Mitglieder der IL-6-Familie wird später eingegangen. IL-6 wird biologisch durch Bindung an seinen IL-6 Rezeptor und den Rezeptor gp130 aktiviert. Sherwin et al. haben 2002 nachgewiesen, dass die gp130-Sekretion bei fertilen Frauen deutlich höher ist als bei infertilen. Der IL-6 Rezeptor ist über den gesamten Zyklus exprimiert und im glandulären Epithel nachweisbar, während die mRNA für gp130 im luminalen und glandulären Epithel lokalisiert und die gp130-Sekretion von LH +6 bis +11, also im Implantationsfenster am höchsten ist. In dieser Arbeit konnte die Expression von IL-6 R und gp130 in Epithelzellen bestätigt werden; beide Rezeptoren konnten durch Seminalplasma nicht stimuliert werden.

Die IL-6 mRNA ist in der proliferativen Phase niedrig exprimiert und steigt progressiv in der sekretorischen Phase des Zyklus an. Sie ist sowohl in Epithel- und Stromazellen sowie in Leukozyten detektierbar. Die Konzentration des IL-6 Proteins war in der proliferativen Phase ebenfalls niedrig und nahm um das 5 – 10fache in der mittleren, dem Implantationsfenster, bis zur späten sekretorischen Phase zu. Die Expression der beiden Rezeptoren IL-6 R und gp130 blieben über den Zyklus konstant (von Wolff et al. 2002a). Salamonsen et al. 2000 fanden IL-6 maximal mittluteal exprimiert – ebenso bei von Wolff et al. 2000 – und konnten den IL-6 Rezeptor über den gesamten Zyklus nachweisen. Diese Ergebnisse divergieren mit denen von Sherwin et al. 2002, wie oben beschrieben. Sherwin et al. 2002 wiesen ebenfalls eine maximale Expression von IL-6

in der Mitte der Lutealphase nach, wobei sie IL-6 hauptsächlich im Stroma lokalisiert vorfinden. Sie vermuten, dass IL-6 und LIF, das auch der IL-6-Familie angehört, mit Endothel-Zellen interagieren und möglicherweise die Blutgefäßbildung im Endometrium regulieren. Auch Cork et al. 2002 konnten die Moleküle IL-6, LIF, IL-11 und deren Rezeptoren im Endometrium nachweisen. Eine Inkubation von stromalen und epithelialen Zellen mit IL-6 bzw. LIF oder IL-11 hatte allerdings keinen Einfluss auf die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$  bzw. auf das Zellwachstum. Zudem wiesen sie nach, dass IL-6 die Proliferation der Stroma-Zellen ausschließlich in der Sekretionsphase inhibiert. Auch gelang ihnen der Nachweis der Rezeptoren IL-6 R, LIF-R und gp130 auf kultivierten Stroma- und Epithelzellen. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Außerdem stellten Cork et al. 2002 fest, dass IL-6 und LIF auf die Matrix-Metalloproteinasen MMP und auf die Zytokinproduktion im Zytotrophoblasten wirken. Bergqvist et al. 2001 fanden heraus, dass IL-6 im Epithel und Stroma die Zell-Proliferation stimuliert und an der Bildung von Adhäsionen beteiligt ist, der Einfluss im Epithel jedoch deutlich größer ist. Die Sekretion von IL-6 wird hormonabhängig reguliert. Als Hauptproduzenten von IL-6, ebenso wie von IL-1 und  $\text{TNF}\alpha$  werden die Makrophagen angesehen. Weitere Ergebnisse über die Wirkung von IL-6 wurden in Tierversuchen ermittelt (Schäfer-Somi 2003): So verlängerte die Anwesenheit von IL-6 die Präimplantationsphase der Embryos von Schafen, Schweinen und Kühen. Dabei ruft IL-6 maternale Reaktionen hervor, die für den Erhalt der Schwangerschaft nötig sind. Zudem ist es an der Plazenta-Bildung beteiligt und kann auch einen Anstieg in der endometrialen Permeabilität hervorrufen.

- 3) Ein weiteres sehr bedeutendes Mitglied der IL-6 Familie ist der Leukaemia Inhibitory Factor LIF. LIF ist ein Zytokin, das embryonale und hämatopoetische Funktionen hat. Von seinen 81 Aminosäuren (AS) sind die letzten 9 AS essentiell für die biologische Aktivität. LIF reguliert das Wachstum und die Differenzierung einer Vielzahl von Zellen, u.a. auch solchen embryonalen Ursprungs, wie z.B. den primären Keimzellen. Die genaue Aktionsweise von LIF bedarf noch der Aufklärung, möglicherweise bereitet es das humane Endometrium auf die Implantation der Blastozyste vor und/oder beeinflusst die Expression der LIF-Rezeptoren auf der Blastozyste. Wenn LIF über den Zeitraum, in dem die Implantation stattfindet, verfügbar ist, resultiert dies in einer dezidualen Antwort, die es dem Embryo ermöglicht sich einzunisten. Weitere Versuche an Mäusen, die homozygot für die LIF-Mutation sind, zeigten ein retardiertes

nachgeburtliches Wachstum und waren kleiner als die Wildtyp-Mäuse. Zudem konnte demonstriert werden, dass LIF essentiell für die Implantation der Blastozyste ist (Stewart et al. 1992). Arici et al. 1995 gelang der Nachweis der LIF-mRNA im Endometrium. In der proliferativen Phase war die Expression niedrig und blieb niedrig bis Tag 19, d.i. LH +5, stieg dann an und erreichte seine maximale Expression zwischen Tag 21 und 26, d.i. LH +7 - +12. In der sekretorischen Phase war die Expression 4-5 - mal höher als in der proliferativen Phase; die Expression konnte in allen Zellen nachgewiesen werden, aber vor allem im glandulären Epithel war sie 2-3 - mal höher als in den anderen Zellen. Eine Stimulierung des Stromas mit PDGF, EGF und TGF- $\beta$ 1 führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der LIF-Expression, die maximal war bei einer Stimulierung mit 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1, im Epithel führte die Stimulierung mit 1ng/ml TGF- $\beta$ 1 zu einem moderaten Anstieg. Diese Ergebnisse in kultivierten Epithelzellen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Charnock-Jones et al. 1994a konnten die mRNA von LIF in der proliferativen Phase nicht nachweisen, fanden aber einen Anstieg um das 6fache in der mittleren und späten sekretorischen Phase. Der Protein-Nachweis gelang nur im glandulären Epithel in der mittleren und späten sekretorischen Phase. Zur Zeit der Implantation produziert das mütterliche Endometrium LIF und die Blastozyste exprimiert die mRNA für die LIF-Rezeptoren. Somit ist die Blastozyste in der Lage auf das mütterliche Signal zu reagieren. Senturk et al. 1998 bestätigten die zyklusabhängige Expression von LIF im humanen Endometrium mit einer maximalen Expression zwischen Tag 19 und 25, d.i. LH +5 bis +11, also dem Implantationsfenster. Diesen signifikanten mittlutealen Anstieg der LIF-mRNA konnten von Wolff et al. 2000 bestätigen. In vitro induzieren verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren die endometriale LIF-Expression. Der LIF-Rezeptor ist über den gesamten Zyklus im endometrialen Gewebe und auf der menschlichen Blastozyste in einer Stadium-abhängigen Weise exprimiert. Zudem wird die Differenzierung des Trophoblasten in Richtung des adhäsiven Phänotyps beeinflusst. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass LIF eine wichtige Rolle für die Implantation spielt (Senturk et al. 1998). Beier et al. 1998 fanden heraus, dass neben LIF noch die Faktoren PDGF-A und M-CSF zeitlich und räumlich unterschiedlich exprimiert werden und dass diese Faktoren letztlich für eine gute Entwicklung des Trophoblasten und Embryos sorgen. Özörnek et al. 1999 schrieben EGF und LIF eine wichtige Rolle für die reproduktive Funktion zu, da beide vom Endometrium, Dezidua und der Follikelflüssigkeit gebildet werden. Smith et al. 1998 bemerkten, dass eine abnormale

Expression der verwandten Zytokine IL-6 und LIF wohl einigen Formen der weiblichen Infertilität zugrunde liegt. Daher halten sie als Therapieform einen direkten Gen-Transfer für geeignet. Tsai et al. 2000 stellten fest, dass die LIF-Expression in fertilen Frauen signifikant höher ist als bei infertilen. Im luminalen Epithel war sie am stärksten nachweisbar, mäßig im glandulären Epithel und kaum im Stroma. Die Expression war maximal in der Lutealphase, am schwächsten in der Follikelphase und peri-ovulatorisch mäßig ausgeprägt. Diese Ergebnisse wurden von Lass et al. 2001 bestätigt und IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , PDGF, TGF- $\beta$  und EGF werden als potente Induktoren der LIF-Synthese angesehen. Eine peri-ovulatorische Expression von LIF im Epithel konnte von Salamonsen et al. 2000 nachgewiesen werden. Dabei hat Progesteron als Regulator eine wichtige Funktion. Sunder et al. 2000 beschrieben hingegen Progesteron als potenten Inhibitor von LIF. Ebenso wies Salamonsen die Expression der Rezeptoren LIF-R $\alpha$  und gp130 im Endometrium nach. Chen et al. 1999 fanden heraus, dass Embryonen während der gesamten Präimplantationsperiode LIF und LIF-Rezeptor exprimieren. Somit hoben sie die Bedeutung von LIF für die Implantation hervor. Die Wichtigkeit von LIF für die Embryo-Implantation bei der Maus wurde von Cai et al. 2000 bestätigt. Der Effekt von LIF ist durch LIF-Antikörper aufhebbar. Eine wichtige Funktion haben dabei die ovariellen Steroide, die solche Zytokine wie LIF und TGF- $\alpha$  induzieren. Diese dienen als lokale Mediatoren in der Signaltransduktion und werden vom Endometrium im Implantationsfenster exprimiert. Lessey stellte 2000 fest, dass LIF von Tag 20 – 24, d.i. LH +6 bis +10, also im Implantationsfenster im Endometrium exprimiert wird, einen positiven Effekt auf die Embryonenqualität und deren Entwicklung ausübt und bei Frauen mit unerklärter Infertilität erniedrigt ist. Zudem steigert LIF die hCG-Produktion. Der Nachweis erfolgte an knock-out-Mäusen. Simón et al. 2000 ermittelten, dass das uterin sezernierte LIF ein Schlüssel-Molekül bei der Implantation des Embryos darstellt. Dabei übt LIF seine Wirkung während der Zell-Differenzierung und der Implantation über die Dimerisierung der Rezeptor-Untereinheiten gp130 und LIF-R $\beta$  aus. LIF wird maximal im Implantationsfenster in der mittlutealen Phase exprimiert. Im Mausmodell war LIF essentiell für das Voranschreiten der Embryo-Anlagerung und die Dezidualisierung des Uterus. Lindhard et al. 2002 kamen zu dem Schluss, dass LIF v.a. in der Sekretionsphase mit einem Maximum zwischen LH +7 und +12 exprimiert wird und eine regulatorische Rolle für den Trophoblasten spielt. Dabei ist die Regulierung der LIF-Expression unabhängig vom Vorhandensein des Trophoblasten, vielmehr wird sie durch mütterliche Steroide, Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Die

Expression des LIF-Rezeptors erfolgt im luminalen Epithel des Endometriums in allen Zyklusphasen. Für die Implantation werden im Uterus-Milieu folgenden Zytokinen eine wichtige Funktion zugeschrieben: IL-1, LIF, M-CSF und MUC-1. Dass LIF beim Menschen die Implantation des Trophoblasten reguliert, beschreibt auch Schäfer-Somi 2003. Arici et al. 1995 und Sawai et al. 1997 stellten fest, dass die LIF-Expression in endometrialen Drüsen und Stroma-Zellen wahrscheinlich durch IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und Östradiol hochreguliert wird. Sherwin et al. 2002 fanden heraus, dass LIF mittluteal v.a. im Epithel maximal exprimiert ist und der lösliche LIF-Rezeptor, sLIF-R, die biologische Aktivität von LIF blockiert. Des Weiteren agieren LIF und IL-6 mit Endothelzellen und regulieren möglicherweise die Blutgefäßbildung im Endometrium. Eine weitere Funktion von LIF besteht in der Proliferation, Differenzierung und dem Zellüberleben der endometrialen Zellen. Dabei wirkt LIF hauptsächlich in der sekretorischen Phase, wo es maximal exprimiert ist. Bei Frauen mit unerklärter Infertilität ist es reduziert (Laird et al. 1997). Eine ähnliche Wirkung auf die Zellen können die anderen Mitglieder der IL-6-Familie, IL-6, OSM, CNF und Cardiotrophin 1 hervorrufen (Salamonsen et al., 2001). Robertson et al. 1992 beschrieben, dass IL-6 und LIF in der Lage sind, Leukozyten anzulocken und damit eine inflammatorische Antwort auszulösen. Weitere Ergebnisse wurden in Tierversuchen ermittelt. So ist endometriales LIF im Schwein in der Interaktion mit den vom Embryo hergestellten Faktoren wichtig für eine erfolgreiche Implantation (Green et al. 1998). Im Schaf erhält LIF die Entwicklung des Embryos in der Kultur aufrecht und ist am höchsten exprimiert zwischen Tag 16 und 20 nach der Konzeption. Dabei wird LIF vermutlich durch Östradiol und Progesteron kontrolliert (Vogiagis et al. 1997).

#### **5.4. Grundlagen der uterinen Seminalplasma- und Spermien-Azension**

Neben der Wichtigkeit der Zytokine für die Etablierung einer Schwangerschaft hat auch der Kontakt des Endometriums mit den Spermien und dem Seminalplasma eine herausragende Bedeutung. Dies ist vor allem bei der Anwendung der IVF- und ICSI-Methode wichtig, da hier keine Interaktion zwischen Endometrium und Ejakulat zustandekommt und auch in aller Regel vom Geschlechtsverkehr abgeraten wird. Durch den fehlenden physiologischen Kontakt zwischen rezeptivem Endometrium und Ejakulat ließe sich möglicherweise die niedrige Implantationsrate intakter Embryonen nach IVF bzw. ICSI erklären. Die Möglichkeit der Beeinflussung der endometrialen Funktion und einer daraus resultierenden Verbesserung der Implantationsrate durch Seminalplasma und Spermien ist jedoch bisher nur ansatzweise

untersucht worden, obwohl die Ergebnisse einzelner prospektiver kontrollierter klinischer Studien einen derartigen Mechanismus stützen (Bellinge et al. 1986; Marconi et al. 1989; Coulam et al. 1995). So fanden Bellinge et al. bei IVF-Patienten eine Implantationsrate von 53% nach Geschlechtsverkehr, die im Vergleich zur Kontrollgruppe (23%) signifikant erhöht war. Marconi et al. wiesen bei ART-Patienten, die während der Behandlung Sexualkontakt hatten eine deutlich höhere Schwangerschaftsrate (81%) nach als bei der Kontrollgruppe (31%). Außerdem meinten sie, dass Spermien dazu beitragen könnten, das Endometrium auf die Implantation vorzubereiten. Schließlich fanden Coulam et al. 1995 in einer klinischen Studie weitere Hinweise, dass Seminalplasma die uterine Höhle erreichen kann. Sie setzten Kapseln, die Seminalplasma enthielten in der Vagina ab und erhielten Implantationsraten von 80%, die verglichen mit der Placebo-Gruppe (67%) erhöht waren. Allerdings schließen diese Ergebnisse nicht notwendigerweise aus, dass das Seminalplasma auf das Endometrium auch über andere Wege, wie beispielsweise den Blutstrom, Einfluss nimmt. Im Gegensatz zu oben erwähnten Studien fanden Tremellen et al. 2000 keine signifikante Verbesserung der Implantations- und daraus folgend der Schwangerschaftsrate durch Geschlechtsverkehr, dafür aber einen positiven Einfluss auf die Lebensfähigkeit des Embryos. Als negativen Aspekt des Geschlechtsverkehrs bezeichnen sie das Einbringen von Infektionen und das Initiieren von uterinen Kontraktionen, als positiven Aspekt zeigen sie in Tierversuchen die Wichtigkeit des Kontaktes mit Seminalplasma für die normale Embryo-Entwicklung und die Implantation.

In diversen Versuchen wurde indirekt nachgewiesen, dass nicht nur Spermien, sondern auch Seminalplasma die uterine Höhle erreichen. Kunz et al. 1996 und 1997 führten den Nachweis einer fortschreitenden uterinen Peristaltik mit steigender Frequenz und Intensität der subendometrialen und myometrialen peristaltischen Wellen ab der proliferativen Phase des Zyklus. Der sog. schnelle Spermientransport durch den weiblichen Genitaltrakt ist vermutlich passiv und wird durch diese uterinen Kontraktionen – die zervikal-fundus gerichteten Kontraktionen nehmen in dieser Zeit ab – bewerkstelligt. Dazu wurde folgender Versuch durchgeführt: Technetium-gelabelte Albumin-Makrosphären, die Spermigröße besaßen, wurden am externen Mund der unteren Zervix eingebracht. Der Aufstieg der Makrosphären erfolgte sofort nach Ablegung am externen Zervix-Mund und weniger als 1 Minute später waren die Makrosphären im intramuralen und isthmischen Teil der Tube zu finden. Quantitativ erhöhte sich der Anteil der aufsteigenden Makrosphären mit Fortschreiten der Follikel-Phase, besonders ab der mittleren follikulären Phase. Während der späten follikulären Phase stiegen die Makrosphären hauptsächlich in die Tube mit dem dominanten Follikel. 1997 präzisierten Kunz et al. die Ergebnisse: Ein Großteil der Makrosphären bleibt in der

frühen Follikelphase am externen Zervix-Mund, einige erreichen die Uterushöhle und nur wenige die Tube. In der mittleren Follikelphase mit steigender Frequenz und Intensität der Uterus-Peristaltik nimmt der Anteil an Makrosphären, die die Uterushöhle und die Tube erreichen, signifikant zu, während in der späten Follikelphase die Makrosphären v.a. die Tube mit maximaler Frequenz und Intensität der Uterus-Peristaltik erreichen. Ebenso stellten Overstreet et al. 1991 fest, dass der schnelle Spermientransport nur wenige Sekunden dauert und etwa 90 Sekunden nach dem Koitus auftritt; die Spermien gelangen dabei direkt in den Eileiter. Der Spermientransport ist abhängig von der Flagellumaktivität des Spermiums, der Dichte der Spermien sowie von Enzymen und anderen Seminalplasma-Komponenten. Abramowicz et al. 1990 zeigten, dass die Wellenbewegung im Uterus und nicht die des Myometriums für den schnellen Spermientransport verantwortlich ist, diese hormonreguliert ist und direkt nach dem Koitus, also in der späten proliferativen Phase oder zum Zeitpunkt der Ovulation auftritt. Dies wurde von Bulletti et al. 2000 bestätigt. Die Uterus-Kontraktionen steigen bis zur Mitte des Zyklus, d.i. peri-ovulatorisch, stetig an, sind dort am größten und fallen stetig ab bis zur späten Lutealphase, in der die höchste Kontraktionsamplitude messbar ist. Die Uterus-Kontraktilität beeinflusst sehr wahrscheinlich den Spermien-Transport, die Ei-Wanderung durch die Tuben, den Embryo-Transport in die Uterus-Höhle und möglicherweise die Embryo-Implantation. Eine Hyperperistaltik, die gegen Zyklusende in eine Dysperistaltik übergeht, führt bei Frauen mit Endometriose zu einer reduzierten uterinen Transport-Kapazität (Leyendecker et al. 1996), die ursächlich für diese Art der weiblichen Infertilität sein dürfte.

### **5.5. Die Zusammensetzung des Ejakulates und dessen Bedeutung**

Das Ejakulat setzt sich bekanntermaßen aus Spermien und Seminalplasma zusammen. Zuerst wird die Bedeutung des Ejakulats diskutiert. Alexander et al. 1987 fanden in normalen Ejakulaten zahlreiche Lymphozyten und Makrophagen, die bei Infertilität des Mannes erhöht waren. Wie Wolff 1995 beschrieben hat, besteht das Ejakulat gewöhnlich aus etwa  $1 \cdot 10^6$  weißen Blutkörperchen pro ml Ejakulat. Die Leukozyten setzen sich aus 50-60% Granulozyten, 20-30% Makrophagen und 2-5% T-Lymphozyten zusammen. Dabei herrschen unterschiedliche Auffassungen bezüglich der Bedeutung der Leukozyten im Ejakulat; teils werden sie mit der männlichen Infertilität oder mit der Beschädigung der Spermien korreliert, teils scheint der Effekt nicht messbar zu sein, da er vom Aktivierungsgrad der Leukozyten und dem Vorhandensein schützender Faktoren im Seminalplasma abhängig ist. Ebenso liegt der Anteil an Rundzellen und unreifen Geschlechtszellen im Ejakulat mit <5% der zellulären

Bestandteile im Normbereich (Wolff et al. 1998). Außerdem beschreibt er eine mögliche Rolle der Leukozyten bei Infertilität, da bei fertilen Männern die Leukozytenzahl eine deutlich niedrigere Konzentration aufwies. Aitken et al. 1995 stellten keinen Zusammenhang zwischen den Leukozyten und Infertilität fest.

Der wichtigste Bestandteil des Ejakulates sind die Spermien. Die Spermien wurden hinsichtlich ihres mRNA-Gehaltes untersucht und die Frage der möglichen Sekretion von Transkriptionsprodukten erörtert. Dabei wiesen Richter et al. 1999 in den Spermien mRNA nach. Es blieb jedoch unklar, ob die mRNA-Transkripte Produkte aktiver Synthese in den ejakulierten Spermien sind oder ob sie zu einem früheren Zeitpunkt in der Spermatogenese produziert und dann in RNP's, d.i. ribonukleäre Protein-Partikel, gelagert werden. Wild et al. 2000 bestätigten das Vorhandensein von mRNA in Spermien und fanden bei abnormalen Spermien sogar einen erhöhten RNA-Gehalt. Auch Miller 2000 gelang der Nachweis der mRNA einiger Moleküle wie  $\beta$ -Actin, HSP, Protaminen und Phosphodiesterase-Untergruppen in den ejakulierten Spermien. In den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Spermien, die für den Versuch gründlich aufgereinigt worden waren, gelang nur der Nachweis von  $\beta$ -Actin mittels RT-PCR, jedoch nicht der anderer Faktoren, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz dazu konnten Chiang et al. 1994 in Spermien weder  $\beta$ -Actin noch CD 4-mRNA nachweisen. Eine weitere wichtige Fragestellung ist die, ob die Sekretionsprodukte von Spermien einen Einfluss auf die Regulation des Endometriums nehmen können. Dazu wurden von Huleihel et al. 2002a und 2002b verschiedene Experimente durchgeführt. Die Spermien wurden nur mittels swim up-Technik gereinigt und IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in den Zellkulturüberständen in einem Bioassay gemessen. Dabei ermittelten sie pro 100.000 inkubierten Spermien etwa 30 pg IL-1 $\beta$  und geringe Mengen an IL-1 $\alpha$  und IL-6. Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. Zwar konnte in Spermien, die nur mittels swim up-Technik aufgereinigt worden waren, VEGF in niedrigen Konzentrationen (18 pg/100.000 Spermien) nachgewiesen werden, jedoch war die Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-6 nicht detektierbar. Wurden die Spermien der gründlicheren doppelten Aufreinigung durch swim up-Technik und Dichte-Gradienten-Zentrifugation unterzogen, war kein VEGF im Zellkulturüberstand mehr nachweisbar. Da in Spermien keine Zytokin-mRNA nachweisbar gewesen ist und Spermien weder messbare Konzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und VEGF produzieren noch sezernieren, ist der Schluss zulässig, dass Spermien damit selbst auch kaum, außer als Transportvehikel für das Seminalplasma, das Endometrium parakrin stimulieren können.

### **5.6. Die Zusammensetzung des Seminalplasmas**

Das Seminalplasma besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften (Wolff 1995). Schon 1987 stellten Alexander et al. fest, dass Seminalplasma die Proliferation der Lymphozyten inhibiert und generell immunsuppressiv wirkt. In hohen Konzentrationen dagegen wirkt es lymphozytotoxisch. Thaler bestätigte 1989, dass das Seminalplasma die T- und B-Zell-Proliferation, die phagozytotische Aktivität von Neutrophilen und Makrophagen sowie die Aktivität der Killer-Zellen unterdrückt. Für diese Wirkung ist vermutlich TGF- $\beta$  und Prostaglandin-E verantwortlich (Tremellen et al. 2000). Kelly et al. 1995 stellten fest, dass die immunsuppressive Wirkung des Seminalplasmas durch PG-E, TGF- $\beta$  und eventuell auch IL-8 vermittelt wird. Zudem war eine Verschiebung von der Th1- zur Th2-Antwort der T-Zellen zu beobachten. Denison et al. 1999 beschrieben im SP weitere immunsuppressive Substanzen, wie TNF $\alpha$ -R(p55), TGF- $\beta$ , Spermien, PG-E<sub>2</sub>, 19-OH-PGE, Rezeptoren für die Fc-Region des  $\gamma$ -Globulins u.a. Zudem fanden sie heraus, dass Seminalplasma die IL-8 Freisetzung erhöht. Kelly et al. 1997b nannten vier Hauptfunktionen des Seminalplasmas: Es dient als Vehikel für den Spermientransport, als koagulierendes System, um den rapiden Spermienverlust in der Vagina zu verhindern, als Energie- und Bewegungsstimulans für die Spermien und als ein hoch gepuffertes Medium, das den Spermien ermöglicht, den sauren pH der Vagina zu überwinden. Zudem präsentieren die Spermien viele Antigene, die auch auf dem Trophoblasten nachweisbar sind (Thaler 1989), so dass die frühzeitige Konfrontation des Endometriums mit den Spermiantigenen als Vorbereitung für die Schwangerschaft angesehen werden kann. Robertson et al. 2001 postulierten eine wichtige Rolle des Seminalplasmas für den Erfolg der Implantation. Das Seminalplasma sorgt für das Überleben der Spermien, den Transport und den Verbleib im weiblichen Genitaltrakt v.a. durch seine Faktoren TGF- $\beta$  und PG-E. Außerdem kann es sowohl immunsuppressiv als auch „immunmodulierend“ wirken, d.h. es besitzt die Fähigkeit eine Immuntoleranz hervorzurufen und einen Wechsel von der Th1- zu Th2-Antwort der T-Zellen.

### **5.7. Die Bedeutung einiger in großen Mengen vorkommenden Faktoren im Seminalplasma**

Im folgenden wird auf die im Seminalplasma reichlich vorhandenen Zytokine und Wachstumsfaktoren VEGF, IL-8 und TGF- $\beta$  eingegangen.

- 1) Der Wachstumsfaktor VEGF ist ein Dimer und ein Heparin-bindendes Glykoprotein. Houck et al. 1991 gelang der Nachweis von vier Isoformen von VEGF, nämlich

VEGF 121, 165, 189 und 206. Die beiden Isoformen VEGF 121 und 165 werden sezerniert, während VEGF 189 und 206 hauptsächlich zellgebunden vorkommen. Im Endometrium kann die Expression der sekretorischen Isoformen durch Östradiol im Stroma stimuliert werden. Die Hauptfunktion dürfte dabei in der Regeneration des Endometrium nach der Blutung sein (Huang et al. 1998). Krüssel et al. 1999 wiesen im Endometrium drei VEGF-Rezeptoren, Flt 1, KDR und sflt nach. Flt 1 und KDR waren über den gesamten Zyklus in etwa konstanter Expression präsent, während sflt in der mittleren und späten Proliferationsphase am höchsten exprimiert war. Sugino et al. 2002 fanden heraus, dass VEGF in der mittleren Sekretionsphase im glandulären Epithel und im Stroma am höchsten exprimiert ist, ebenso wie in den Deziduazellen in der frühen Schwangerschaft. Sie folgerten daraus, dass VEGF eventuell für eine Verlängerung der Lebensspanne der endometrialen Zellen, die in eine erfolgreiche Schwangerschaft involviert werden, sorgt. Obermair et al. 1999 zeigten, dass Spermien die beiden VEGF-Rezeptoren Flt 1 und KDR tragen. Als mögliche Ziele von VEGF werden damit die Spermien selbst angesehen und auch der Trophoblast. Wie Charnock-Jones et al. 1994b nachgewiesen haben, spielt VEGF für das Wachstum und die Differenzierung des Zytotrophoblasten, der den flt 1-Rezeptor trägt, bei der Implantation eine wichtige Rolle. Eine VEGF-Konzentration von 2 – 100 ng/ml ist offensichtlich optimal für die Etablierung einer Schwangerschaft. Seminales VEGF erhöht bei IVF-Patienten (ICSI) vermutlich die Chance auf eine Schwangerschaft, da VEGF ein potenter Stimulator des vaskulären Endothels ist (Obermair et al. 1999).

- 2) IL-8 ist ein ebenfalls in hohen Konzentrationen vorkommendes inflammatorisches Zytokin im Seminalplasma. Seine Wirkungen auf das Endometrium und sein Vorkommen werden wie folgt beschrieben. Arici et al. 1998a wiesen nach, dass IL-8 nur in den epithelialen Drüsen des Endometriums exprimiert wird. In der Lutealphase die IL-8 – Expression stetig ansteigend, in der frühen bis mittleren proliferativen und der späten sekretorischen Phase ist sie am höchsten. Als Funktion von IL-8 wird angenommen, dass es vermutlich die Rekrutierung von Neutrophilen und Lymphozyten in das Endometrium moduliert. Außerdem sollte ein Einfluss von IL-8 auf Spermien und die Blastozyste sowie eine parakrine Aktion auf das Endometrium in Betracht gezogen werden. Zudem steigert IL-8 die Proliferation der Stroma-Zellen und hat damit einen direkten proliferativen Effekt auf das Endometrium. Weiterhin könnte IL-8 ein geeignetes Milieu für die Implantation herstellen, ausgeführt am Beispiel von IL-8 in

der Peritonealflüssigkeit und dessen Folgen (Arici et al. 1998b). Simón et al. 2001 fanden heraus, dass IL-8 nach Östrogenstimulation durch Progesteron hochreguliert wird am Tag 18-21, d.i. LH +4 bis +7 und damit auch Auswirkungen auf die Implantation hat. Critchley et al. 2001 wiesen nach, dass IL-8 wichtig für die neutrophile Chemotaxis ist. Außerdem bestätigten sie den direkten Effekt auf die endometriale Zellproliferation. IL-8, ein angiogenetisches Molekül, wird durch den Progesteron-Abfall im späten sekretorischen Endometrium hochreguliert und ist dort perivaskulär angeordnet. Gazvani et al. 2002 fanden heraus, dass IL-8 in dosisabhängiger Art und Weise das Wachstum, das Überleben und die DNA-Synthese endometrialer Zellen stimuliert. Durch die Produktion von IL-8 im Endometrium wird die Proliferation stromaler Zellen induziert. Ebenso konnten Caballero-Campo et al. 2002 zeigen, dass IL-8 im luminalen und glandulären Epithel sowie im Endothel exprimiert wird. Während der rezeptiven Phase, Tag 18-21, d.i. LH +4 bis +7, wird es durch Progesteron hochreguliert. Zudem erhöht IL-8 die FasL-Expression in endometrialen Epithel- und Stroma-Zellen. Dies bewirkt eine Verhinderung der Apoptose und zwar nicht über eine Erhöhung der mRNA, sondern durch ein Absenken der Apoptose-Rate in den Zellen (Selam et al. 2002). Außerdem wird die Expression von IL-8 durch PG-E2, das in hohen Konzentrationen im Seminalplasma vorkommt (Critchley et al. 2001), gefördert (Tremellen et al. 1997). Wie Koumantakis et al. 1998 gezeigt haben, ist IL-8 im Seminalplasma in hohen Konzentrationen messbar. Es ist bei Infektionen vermehrt nachweisbar, allerdings unabhängig vom Spermogramm. Dies trifft auch für die Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-6 zu, die in deutlich niedrigeren Konzentrationen im Seminalplasma vorhanden sind. Diese Befunde konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Gruschwitz et al. 1996, Huleihel et al. 1996, Dousset et al. 1997, Denison et al. 1999, Eggert-Kruse et al. 2001, Maegawa et al. 2002). Srivastava et al. 1996 wiesen auch hohe Konzentrationen von IL-8 im Seminalplasma nach. IL-8 im Seminalplasma hat die Funktion vor Infektionen zu schützen oder die Proliferation der Bakterien im unteren Genitaltrakt zu vermindern und auch die Spermien durch ihre eigenen Produkte, eventuell mit IL-2 und IL-1 $\beta$  zu zerstören. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IL-8 im Vergleich zu den anderen Zytokinen als einziges Zytokin in hoher Konzentration vorliegt.

- 3) TGF- $\beta$  zählt zur großen Familie der TGF- $\beta$ -Glykoproteine, die eine bedeutende Funktion in der Signalübertragung innehaben; zudem haben sie eine kritische Rolle bei

der Regulation des Wachstums und der Funktion in nahezu allen Zelltypen. Man unterscheidet insgesamt fünf Isoformen, wobei vor allem drei davon im Säuger bedeutend sind: TGF- $\beta$ 1, 2 und 3. Diese drei Isoformen sind zu 75% in ihren Aminosäuren homolog und besitzen einen ähnlichen Strukturaufbau, unterscheiden sich jedoch funktionell. TGF- $\beta$  kann endokrine, parakrine und autokrine Effekte hervorrufen. Dies geschieht beispielsweise über die „Cleavage“-Rate von Zytokinen oder über die Expression der Rezeptoren. Relevant für die erheblichen Effekte von TGF- $\beta$  im Ejakulat ist seine Kapazität, die Proliferation und Funktion der T-Lymphozyten, die Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen, die Differenzierung dendritischer Zellen und die Phänotypverschiebung von der Th1- zur Th2-Antwort zu beeinflussen. Dabei spielt TGF- $\beta$  eine doppelte Rolle in den inflammatorischen Antworten. Zuerst agiert es als pro-inflammatorisches Agens, indem es ruhende Makrophagen rekrutiert und aktiviert, später unterdrückt es die Aktivität der Makrophagen (Ashcroft 1999). Die Verschiebung zum Th2- bzw. Th3-Phänotyp der T-Lymphozyten wird durch endogenes und exogenes TGF- $\beta$  induziert, sobald das Endometrium in Kontakt mit dem Antigen, d.h. Spermien im Ejakulat, kommt. Dabei dient TGF- $\beta$  als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für die Th3-Zellen, die suppressive Zytokine sezernieren und somit zur Immuntoleranz beitragen (Robertson et al. 2002). Es sind aber auch noch weitere Funktionen von TGF- $\beta$  bekannt. So beschreibt Tabibzadeh 2002a und 2002b einen wichtigen Effekt von TGF- $\beta$ , der sich auf seine Eigenschaft als pro-fibrogen-bildendes Zytokin zurückführen lässt. Es erhöht die Synthese von Kollagen und verhindert dadurch die Destabilisierung der extrazellulären Matrix; dies ist für die Homöostase derselben von großer Bedeutung ist. Dabei greift TGF- $\beta$  über die Suppression der Matrix-Metalloproteinasen, MMP, in die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix ein, die während der Implantation durch die MMPs diskret aufgelöst wird. Im Endometrium konnte TGF- $\beta$  in den Stroma- und Dezidua-Zellen und innerhalb der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass TGF- $\beta$  die Implantation über die Regulierung der MMPs unterstützt. TGF- $\beta$  kommt im Seminalplasma in hohen Konzentrationen vor. Dabei ist TGF- $\beta$ 1 in etwa zehnmal höher konzentriert als TGF- $\beta$ 2 (Nocera et al. 1995, Chu et al. 1996). Man unterscheidet auch freies, d.i. aktives und gebundenes TGF- $\beta$ . Nur ca. 10% des gebundenen TGF- $\beta$ 1 liegt in freier Form vor, das restliche TGF- $\beta$  liegt vor allem in einer Form mit hohem Molekulargewicht, z.B. an  $\alpha$ 2-Makroglobulin,

210kD-Protein-Komplexe in Thrombozyten oder eventuell auch an Fibronectin gebunden vor (Nocera et al. 1995). Srivastava et al. 1996 zeigten, dass TGF- $\beta$  ein kraftvolles Immunsuppressivum sowohl bei der Maus als auch beim Menschen ist und nur im Seminalplasma nachweisbar ist. Die von Nocera et al. 1995 gefundenen Konzentrationen an TGF- $\beta$ 1 konnten sie bestätigen, allerdings fanden sie für TGF- $\beta$ 2 deutlich niedrigere Werte. Zudem konnten sie TGF- $\beta$  in keiner anderen Flüssigkeit des weiblichen Reproduktionstraktes nachweisen. TGF- $\beta$  vermittelt ihrer Meinung nach Immuntoleranz gegenüber Spermien im weiblichen Genitaltrakt und hat eine wichtige Funktion als Immunmodulator. Diese Daten werden von Loras et al. 1999 bestätigt. Die im Seminalplasma vorhandene Konzentration an freiem TGF- $\beta$ 1 ist so hoch, dass eine volle Aktivität des Peptids gewährleistet ist. Chu et al. 1996 wiesen ebenfalls hohe Konzentrationen von TGF- $\beta$  im Seminalplasma, die etwa 5fach über dem Serumspiegel lagen, nach. Diese Befunde wurden in dieser Arbeit bestätigt. Nur etwa 25% des TGF- $\beta$  ist im Seminalplasma in der reifen, aktiven Form detektierbar. Es liegt größtenteils in löslicher Form vor, aber eine gewisse Menge ist auch an die postakrosomale Region des Spermienkopfes gebunden (Chu et al. 1996). Der Gehalt an TGF- $\beta$  im Seminalplasma bleibt über die Zeit relativ konstant, er schwankt um maximal 20% (Robertson et al. 2002). Tremellen et al. 1998 stellten fest, dass der TGF- $\beta$ 1-Anstieg im Endometrium eine Folge der Ansammlung von Spermien ist und nicht auf eine de novo-Synthese zurückführbar ist. Außerdem beschreiben sie TGF- $\beta$ 1 als Auslöser der inflammatorischen Reaktion in der Maus, indem es die GM-CSF-Synthese induziert. Diese Befunde wurden von Robertson et al. 2000a bestätigt. Außerdem induziert TGF- $\beta$  in der Maus die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Tremellen et al. 2000). Nocera et al. fanden 1995 heraus, dass die maximale Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 bei pH <4, wie er beispielsweise in der Scheide vorliegt, nach 2 h bei 37°C erfolgt, aber die Aktivierung bereits nach einer Viertelstunde beginnt. Das aktivierte TGF- $\beta$ 1 ist dann für mindestens 24 h stabil. Dies hat zur Folge, dass die Spermien im unteren weiblichen Genitaltrakt (nach Aktivierung des gebundenen TGF- $\beta$ 1) geschützt sind. Tremellen et al. 1997 eruierten, dass die Aktivierung von TGF- $\beta$  entweder bei der Ejakulation oder nach Einbringen in den weiblichen Genitaltrakt durch das saure Milieu in der Vagina erfolgt. Dabei ermittelte er für TGF- $\beta$  folgende biologische Effekte: in der Maus interagiert seminales TGF- $\beta$  mit uterinen und/oder zervikalen epithelialen Zellen und löst dort eine Kaskade von weitergehenden Effekten aus, wie die Hochregulierung

der Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, beispielsweise GM-CSF um den Faktor 20. Beim Menschen ist dies bis dato noch ungeklärt. Unterstützend wirkt, dass die Reaktionsfähigkeit des humanen zervikalen Epithels während der Ovulationszeit auf TGF- $\beta$  am größten ist. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass seminales TGF- $\beta$  die Qualität und die Stärke der mütterlichen Immunantwort auf die Schwangerschaft beeinflusst, indem es die Th2- und/oder Th3-Immunität gegenüber paternalen Antigenen direkt nach Einbringen in den weiblichen Genitaltrakt unterstützt. Daher resultieren auch die gesteigerten Implantationsraten nach Sexualkontakt (Tremellen et al. 2000).

Fazit: Seminales TGF- $\beta$ , abgesetzt im weiblichen Genitaltrakt, ist bei der Insemination aktiviert und interagiert mit den weiblichen Genitaltrakt-Zellen, um die inflammatorische Kaskade auszulösen (Robertson et al. 2002). Salamonsen et al. 2000 schrieben TGF- $\beta$  diverse biologische Aktivitäten zu: Es reguliert die Proliferation und Differenzierung und hat eine wichtige Rolle bei den Gewebe-Aufbau-Prozessen. Zudem kann TGF- $\beta$  als biologischer Schalter agieren, indem es die Aktion anderer Zytokine antagonisiert beziehungsweise moduliert, während andere Zytokine ihrerseits in der nächsten Umgebung die Zellantwort auf TGF- $\beta$  wahrscheinlich modulieren. Sie fanden alle drei Untergruppen in den epithelialen und stromalen Zellen im Endometrium exprimiert, TGF- $\beta$ 1 und 3 in beiden Zelltypen, TGF- $\beta$ 2 v.a. im Stroma. TGF- $\beta$ 3 war maximal im Epithel in der sekretorischen Phase exprimiert, wohl v.a. in der latenten Form (Salamonsen et al. 2000). Weitere Untersuchungen bezüglich der Effekte von TGF- $\beta$  wurden in Tierversuchen ermittelt. Tremellen et al. 1998 zeigten im Mausmodell, dass TGF- $\beta$ 1 wichtig für die immunologische Homöostase ist. Ein Gendefekt für TGF- $\beta$ 1 führt zur Letalität des Embryos. Das TGF- $\beta$  vom männlichen Partner übt einen biologischen Einfluss nach Einbringen in den weiblichen Genitaltrakt aus, da nach Insemination der durchschnittliche Gehalt an TGF- $\beta$  in der uterinen Flüssigkeit auf das 3,3-fache ansteigt. Versuche mit TGF- $\beta$ -Null-Mutanten in der Maus zeigen ein Entwicklungsdefizit in der Präimplantationszeit von 50%, d.h. die Hälfte der Embryonen sterben ab. Diese Letalität für den Embryo gilt für alle drei Isoformen. Bei der Implantation sind alle drei Isoformen an der feto-maternalen Grenze exprimiert. Dabei wirkt TGF- $\beta$  bei der Regulierung der Proliferation, Differenzierung und Produktion der extrazellulären Matrix und der Migration, woraus folgt, dass jede der Isoformen eine Rolle in den zellulären Prozessen, die bei der Implantation ablaufen,

spielt. Des Weiteren wird TGF- $\beta$  gezielt über räumliche, zeitliche und Isoform-spezifische Aktivität reguliert. Dies führt zum einen zum Vorantreiben als auch zur Einschränkung des plazentaren Wachstums. Zudem ist TGF- $\beta$  im Endometrium in der frühen Schwangerschaft exprimiert. Während des Implantationsprozesses wird dadurch wahrscheinlich das Anhaften des Trophoblasten an das Endometrium unterstützt, indem die Produktion extrazellulärer Matrix-Komponenten erleichtert und die Adhäsion von Trophoblast-Zellen an die extrazelluläre Matrix verstärkt werden. Außerdem wird die VEGF-Produktion in Trophoblast-Zelllinien durch TGF- $\beta$ 1 positiv reguliert. Somit hat TGF- $\beta$  sehr wahrscheinlich eine Aufgabe bei der Herstellung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber dem Embryo, eventuell über die Steuerung der Aktivität der Makrophagen (Ingman et al. 2002). Geis et al. 2001 konnten zeigen, dass IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$  die Invasivität des Trophoblasten kontrollieren. Merviel et al. 2001 konnten zeigen, dass TGF- $\beta$  die Vermehrung epithelialer Zellen verhindert, hingegen die Vermehrung stromaler Zellen stimuliert und die lokale Vaskularisation erhöht. Dies ist sehr wichtig bei der Implantation. Neben TGF- $\beta$  spielen auch noch IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Schäfer-Somi 2003 wies nach, dass sich TGF- $\beta$ 1 in den glandulären und epithelialen Endometriumzellen vom Pferd um die Zeit der Implantation anreichert. Man vermutet, dass es das Wachstum und die Differenzierung des Trophoblasten reguliert. In der Maus wird durch diverse Faktoren im Seminalplasma, insbesondere durch TGF- $\beta$ , die Zytokinausschüttung, v.a. die GM-CSF und IL-6-Synthese, durch Östrogen-stimulierte uterine Epithelzellen getriggert. Dabei wird eine Kaskade von Ereignissen, die durch Zytokine und Leukozyten vermittelt werden, initiiert, die einer klassischen inflammatorischen Immunantwort ähneln (Robertson et al., 1997). Um den Ovulationszeitpunkt führt das Einbringen des Ejakulates zur postkoitalen inflammatorischen Antwort, d.i. eine sofortige Veränderung in der Leukozytenpopulation. Dabei kommt es in der Maus durch TGF- $\beta$  zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die einen Einstrom und die Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen auslöst. Diese Hochregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine ist letztendlich wichtig für die Entstehung der Immuntoleranz gegenüber dem Embryo. Beim Menschen verhindert das in hohen Konzentrationen im Seminalplasma vorkommende TGF- $\beta$  die Th1-Immunität gegen Spermien, da es ein starkes Th2-immun-modulierendes Agens und ein Toleranz-induzierendes Schlüsselmolekül ist (Robertson et al. 2001). Robertson 2000b

stellte im Mausmodell fest, dass nach der Insemination der Effekt von IL-1, GM-CSF und TNF $\alpha$  durch TGF- $\beta$  gesteigert werden kann.

### **5.8. Bemerkenswertes für die Etablierung einer Schwangerschaft**

Im Implantationsfenster kommt es zu einer Veränderung der Genexpression. Dabei werden Osteopontin, IL-15, TGF- $\beta$ II R $\alpha$ , die TGF- $\beta$ -Superfamilie und viele andere Gene hochreguliert, während Integrine, VEGF u.a. supprimiert werden (Kao et al. 2002). Aufgrund der im Uterus vorhandenen Zytokine kommt es zu einer Verschiebung der T-Zell-Antwort von Th1 nach Th2. Hier tragen vermutlich die endometrialen Zytokine zu einer lokalen Modulation der adaptiven mütterlichen Immunantwort im Endometrium rund um das Implantationsfenster bei, um eine erfolgreiche Embryo-Implantation und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zu gewährleisten (Lim et al. 1998). Diese Verschiebung der T-Zell-Antwort könnte über das in sehr hohen Konzentrationen vorkommende PG-E im Seminalplasma ausgelöst werden, da dieses äußerst effektiv die lokale Immunantwort im unteren weiblichen Genitaltrakt supprimieren könnte. Die Verschiebung in der Immunantwort erfolgt über eine Verschiebung der IL-10/IL-12-Ratio, die bereits durch 1 mM PG-E im Seminalplasma ausgelöst werden kann. Zudem führt PG-E zur Komplement-Inhibierung, zur Anergie der T-Zellen und auch zu Uterus-Kontraktionen, die oft Krämpfe auslösen. PG-E wirkt hauptsächlich immunsuppressiv und verhindert durch die Auslösung dieser Zytokin-Verschiebung eine vernichtende zytotoxische Antwort beziehungsweise eine Hypersensibilisierung gegenüber Spermien (Kelly et al., 1997a und 1997b). Schließlich stellt die frühe Schwangerschaft auch eine inflammatorische Reaktion dar. So konnten Hunt et al. 1996 sowohl im Menschen als auch in der Maus erhöhte Werte von M-CSF, GM-CSF, IL-6 u.a. messen.

### **5.9. Schlussbetrachtung und Ausblick**

Die detailliert beschriebenen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF wurden in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, d.h. der Inkubation der endometrialen Epithelzellen mit Seminalplasma, verstärkt exprimiert. Die Expression der Zytokin-mRNA zeigte dabei einen zeit- und konzentrationsabhängigen Verlauf mit einer maximalen Expression nach einer dreistündigen Inkubationszeit mit 10% Seminalplasma. Um zu ermitteln, ob diese Effekte durch einzelne Faktoren im Seminalplasma, die dort in hohen Konzentrationen vorliegen, wie VEGF, IL-8 und TGF- $\beta$ 1, hervorgerufen werden, wurden die Epithelzellen mit nahezu derselben Konzentration, wie sie im Seminalplasma vorlag, inkubiert. Es zeigte sich jedoch,

dass die Effekte nur ähnlich, aber nicht identisch sind. Daraus lässt sich schließen, dass die Zytokin-Expression in humanen endometrialen Epithelzellen nicht durch einzelne Zytokine reguliert wird, sondern durch ein breites Spektrum an Mediatoren im Seminalplasma, das in seiner Zusammensetzung exakt für die Etablierung einer Schwangerschaft geeignet ist.

Als weitere mögliche zu untersuchende Faktoren, die einen Einfluss auf die Vorbereitung des Endometriums für die Implantation haben könnten, seien noch weitere Mitglieder der IL-6-Familie erwähnt, wie IL-11, das in Epithel und Stroma exprimiert ist (Cork et al. 2001). Außerdem GM-CSF und M-CSF, die, wie Sjöblom et al. 1999 beschrieben haben, im Mausmodell einen wichtigen Überlebensfaktor für den Embryo darstellen. Allerdings konnte in einigen wenigen Versuchen während dieser Arbeit keine verstärkte Expression von M-CSF und GM-CSF durch Seminalplasma festgestellt werden.

Eine großflächige Stimulierung des humanen Endometriums mit einer Seminalplasma-Konzentration von 10% ist in vivo nicht sehr wahrscheinlich, da, wie Settlage et al. 1972 in ihrer Studie festgestellt haben, weniger als 1 Promille der eingebrachten Spermien das Cavum uteri erreichen. Da Spermien aber im Cavum uteri eine gewisse Zeit verbleiben, könnte das Endometrium lokal derartig hohen Seminalplasma-Konzentrationen ausgesetzt sein und somit lokal die Zytokin-Expression stimuliert werden.

Um die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse auch praktisch anwenden zu können, ist eine intravaginale und intrazervikale Gabe von Seminalplasma des Sexualpartners zum Zeitpunkt der Follikelpunktion bei assistierten Reproduktionsverfahren wie IVF oder ICSI zu erwägen.

## **6. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Seminalplasma die Zytokin-Expression in humanen endometrialen Epithelzellen reguliert.

Das Ziel der Arbeit war, die Regulation der endometrialen Funktion durch Spermien und Seminalplasma darzulegen. Dazu wurden zunächst die RNA-Expression und Protein-Sekretion der Spermien untersucht. Hinsichtlich der RNA-Expression in den Spermien konnten mittels RT-PCR und RPA geringe Mengen an GAPDH und  $\beta$ -Actin mRNA nachgewiesen werden, jedoch keine mRNA von Zytokinen oder anderen Wachstumsfaktoren. Somit sind Spermien nicht in der Lage, selbst Zytokine zu produzieren.

Bei der Untersuchung der Protein-Sekretion der Spermien zeigte sich, dass die Ergebnisse stark von der verwendeten Aufreinigungstechnik abhängig waren. In Spermien, die nur mittels swim up-Technik aufgereinigt worden waren, konnten geringe Mengen an sezerniertem VEGF nachgewiesen werden. Dieses Resultat war aber, wenn die Spermien zusätzlich über die Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt worden waren, nicht mehr zu erzielen. Somit stehen diese Resultate zwar im Gegensatz zu denen von Huleihel et al. 2000a und b, geben aber den indirekten Beweis, dass Seminalplasma an den Spermien haftet. Deshalb ist die Annahme erlaubt, dass die Spermien als Transportvehikel für das Seminalplasma dienen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Versuchen von Chu et al. 1996, die ebenfalls Zytokine, die an Spermien, speziell an den Spermienkopf gebunden waren, nachweisen konnten.

Auch das Seminalplasma wurde vor Beginn der Versuche systematisch analysiert. Dabei wurden die Konzentrationen von insgesamt 16 verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren mittels ELISA gemessen. In dem in dieser Arbeit verwendeten Seminalplasma-Pool waren die Zytokine IL-8 und TGF- $\beta$  sowie der Wachstumsfaktor VEGF im Vergleich zu den Serum-Referenz-Werten stark erhöht. Dies steht in Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Daten (Srivastava et al. 1996; Gruschwitz et al. 1996; Dousset et al. 1997; Loras et al. 1999).

Um den Effekt von Seminalplasma auf die endometrialen Zellen zu ermitteln, wurden die aus hysterektomierten Uteri gewonnenen Epithel- und Stromazellen kultiviert und mit dem Seminalplasma-Pool inkubiert. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Seminalplasma-Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Die Zytokin-Expression in Stroma-

Zellen konnte durch Seminalplasma nicht stimuliert werden. In Epithelzellen führte die Stimulation mit Seminalplasma zu einem signifikanten Anstieg der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF. Am ausgeprägtesten war der Zytokin-Anstieg bei einer Seminalplasma-Konzentration von 10% und einer Inkubationszeit von drei Stunden. Bereits bei einer Inkubation der Epithelzellen mit einer Seminalplasma-Konzentration von 1% zeigte sich ein messbarer Anstieg der mRNA-Expression der oben erwähnten Zytokine.

Um nachzuweisen, dass die Epithelzellen überhaupt auf das Seminalplasma reagieren können, wurde untersucht, ob es auf ihnen zu einer Expression von Zytokin-Rezeptoren kommt. Um sicherzustellen, dass die Expression der Rezeptoren konstant ist, wurde der Versuch auch unter Stimulierung mit Seminalplasma durchgeführt. Die Rezeptoren IL-1 R tI und tII, TNF R p55 und p75(A), IL-6 R $\alpha$ , gp 130 und TGF- $\beta$  R II werden unabhängig von der Stimulation mit Seminalplasma konstant exprimiert. Dies ist ebenso in der Literatur beschrieben (Bigonnesse et al. 2001; Sherwin et al. 2002). Somit ist das Endometrium in der Lage, auf das Vorhandensein verschiedener Zytokine, wie IL-1, IL-6, LIF, TGF- $\beta$  u.a., direkt zu reagieren.

Um zu belegen, dass die epitheliale Zytokin-Expression auf die Stimulierung mit Seminalplasma zurückzuführen ist, wurde das Seminalplasma bei 95°C hitze-inaktiviert. Dadurch sollten alle Peptide und kleinen Proteine irreversibel denaturiert werden. Wie deutlich nachgewiesen werden konnte, war der vorher vorhandene Effekt der gesteigerten Zytokin-Expression in den Epithelzellen nicht mehr messbar. Dies lässt den Schluß zu, dass hauptsächlich Proteine und Peptide, wie beispielsweise die Zytokine, für den stimulierenden Effekt auf die Epithelzellen verantwortlich sind.

Dieser Effekt der Stimulierung der epithelialen Zytokin-Expression konnte bisher nur in Tierversuchen ermittelt werden. So zeigten Tremellen et al. 1998, dass Seminalplasma in den epithelialen Zellen der Maus die Expression von GM-CSF stimuliert.

Da derartige stimulatorische Effekte des Seminalplasmas bereits in Tierversuchen nachgewiesen werden konnten, ist es sehr plausibel, dass das Seminalplasma auch beim Menschen ähnliche Wirkungen hervorruft. Diese Annahme konnte in dieser Arbeit für IL-1 $\beta$ , IL-6 und LIF untermauert werden.

Ebenfalls konnte der vermutete Zusammenhang zwischen der Zyklusphase der Frau und der Rezeptivität des Endometriums für die Stimulierbarkeit mit Seminalplasma durch die Untersuchung der mRNA-Expression in den verschiedenen Zyklusphasen bestätigt werden. Es stellte sich heraus, dass der stimulierende Effekt des Seminalplasmas auf die Epithelzellen nur in der frühen und mittleren Lutealphase nachweisbar ist. Wie in der Diskussion

ausführlich erörtert, sind diese beiden Zyklusphasen dem sog. Implantationsfenster gleichzusetzen. In der gesamten Proliferationsphase und der späten Lutealphase ist das Epithel dem Seminalplasma gegenüber nicht mehr empfänglich.

Da die Expression der Zytokin-mRNA in Epithelzellen durch Seminalplasma signifikant stimuliert wurde, wurden die Epithelzellen mit den Faktoren einzeln stimuliert, die im Seminalplasma in hohen Konzentrationen vorkommen, nämlich IL-8, TGF- $\beta$ 1 und VEGF. Dabei zeigte sich, dass IL-8 und TGF- $\beta$ 1 die Zytokin-Expression in Epithelzellen ebenfalls, wenngleich in reduziertem Maße stimulieren können. Die Stimulation der Epithelzellen erfolgt daher wahrscheinlich nicht monokausal, sondern synergistisch durch ein komplexes Netzwerk von Faktoren, die im Seminalplasma vorhanden sind.

Da der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Epithelzellen gut messbar war, wurde an diesem Beispiel der exemplarische Versuch unternommen, das im Seminalplasma vorhandene TGF- $\beta$ 1 durch seinen spezifischen Antikörper zu blockieren. Im ELISA wurde der Effekt der Blockierung erfolgreich nachgewiesen. Im behandelten Seminalplasma war kein ungebundenes TGF- $\beta$ 1 mehr detektierbar. Als die Epithelzellen mit diesem vorbehandelten Seminalplasma inkubiert wurden, war der Effekt auf die Zytokin-Expression in den Epithelzellen deutlich reduziert. Auch zeigte sich, dass das im Seminalplasma fehlende TGF- $\beta$ 1 unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der einzelnen Zytokine hatte. Dass der verwendete Antikörper selbst keinen störenden Einfluss auf die Epithelzellen nimmt, konnte in einem Kontrollversuch nachgewiesen werden. Hierbei wurde dem Seminalplasma nur der IgG-Anteil des Antikörpers zugesetzt und die Epithelzellen damit stimuliert. Die Epithelzellen wurden durch den Zusatz in ihrer Reaktion nicht beeinträchtigt.

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl Seminalplasma als auch einzelne Inhaltsstoffe, wie TGF- $\beta$  und IL-8, einen signifikanten Einfluss auf die Expression der Zytokin-mRNA in Epithelzellen haben. Sie greifen damit in die endometriale Regulation ein und dürften, da sie hauptsächlich im Implantationsfenster wirksam sind, das Endometrium für eine erfolgreiche Implantation vorbereiten.

Da bereits in klinischen Studien nachgewiesen wurde, dass Seminalplasma die Implantationsrate bei assistierten Reproduktionsverfahren steigern kann (Bellinge et al. 1986, Marconi et al. 1989, Coulam et al. 1995), geben die vorliegenden Ergebnisse Anlass zu weitergehenden Überlegungen. Eine mögliche praktische Anwendung könnte darin bestehen, bei assistierten Reproduktionsverfahren, wie IVF und ICSI, zum Zeitpunkt der Follikelpunktion Seminalplasma des Sexualpartners intravaginal und intrazervikal zu

verabreichen. Eine solche Maßnahme könnte somit eventuell zu einer verbesserten Implantationsrate bei assistierten Reproduktionsverfahren beitragen.

## **7. Literatur**

- Abramowicz, J.S., Archer, D.F.; Uterine endometrial peristalsis – a transvaginal ultrasound study; *Fertil. Steril.* **54**(3): 451-4 (1990)
- Aitken, R.J., Baker, H.W.G; Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans?; *Hum.Reprod.* **10**(7): 1736-9 (1995)
- Alexander, N.J., Anderson, D.J.; Immunology of semen; *Fertil. Steril.* **47**(2): 192-205 (1987)
- Arici, A., Headm, J.R., MacDonald, P.C., Casey, M.L.; Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture; *Mol. Cell. Endocrinol.* **94**: 195-204 (1993)
- Arici, A., Engin, O., Attar, E, Olive, D.L.; Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 1908-15 (1995)
- Arici, A., Seli, E., Senturk, L.M., Gutierrez, L.S., Oral, E., Taylor, H.S.; Interleukin-8 in the human endometrium; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 1783-87 (1998a)
- Arici, A., Seli, E., Zeyneloglu, H.B., Senturk, L.M., Gutierrez, L.S., Oral, E., Olive, D.L.; Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 1201-5 (1998b)
- Arnold, J.T., Kaufman, D.G., Seppälä, M., Lessey, B.A.; Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new culture model; *Hum. Reprod.* **16**(5): 836-45 (2001)
- Ashcroft, G.S.; Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta; *Microb. Infect.* **1**: 1275-82 (1999)
- Beier, H.M., Beier-Hellwig, K.; Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity; *Hum. Reprod. Update* **4**(5): 448-58 (1998)
- Beier, H.M., Beier-Hellwig, K., Sterzik, K.; Die implantationsgerechte Lutealphase des Endometriums. Zum Stand der molekularen und zellbiologischen Forschung; *Zentralbl. Gynäkol.* **123**(6): 319-27 (2001)
- Bellinge, B.S., Copeland, C.M., Thomas, T.D., Mazzucchelli, R.E., O'Neil, G., Cohen, M.J.; The influence of patient insemination on the implantation rate in an in vitro fertilization and embryo transfer program; *Fertil. Steril.* **46**(2): 252-6 (1986)
- Bergqvist, A., Bruse, C., Carlberg, M., Carlström, K.; Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in endometric tissue and in endometrium; *Fertil. Steril* **75**(3): 489-95 (2001)
- Bigonnesse, F., Marois, M., Maheux, R., Akoum, A. ; Interleukin-1 receptor accessory protein is constitutively expressed in human endometrium throughout the menstrual cycle ; *Mol. Hum. Reprod.* **7**(4): 333-39 (2001)
- Boucher, A., Kharfi, A., Al-Akoum, M., Bossù, P., Akoum, A.; Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium; *Biol. Reprod.* **65**: 890-98 (2001)

- Bulletti, C., de Ziegler, D., Polli, V., Diotallevi, L., Del Ferro, E., Flamigni, C.; Uterine contractility during the menstrual cycle; *Hum Reprod.* **15** Suppl 1: 81-89 (2000)
- Caballero-Campo, P., Domínguez, F., Coloma, J., Meseguer, M., Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C.; Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation; *Mol. Hum. Reprod.* **8**(4): 375-84 (2002)
- Cai, L.Q., Cao, Y.J., Duan, E.K.; Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse; *Cytokine* **12**(11): 1676-82 (2000)
- Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., Fenwick, P., Smith, S.K.; Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time; *J. Reprod. Fertil.* **101**: 421-26 (1994a)
- Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., Boocock, C.A., Ahmed, A., Plevin, R., Ferrara, N., Smith, S.K.; Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells; *Biol. Reprod.* **51**(3): 524-30 (1994b)
- Chen, H.-F., Shew, J.-Y., Ho, H.-N., Hsu, W.-L., Yang, Y.-S.; Expression of leukemia inhibitory factor and its receptors in preimplantation embryos; *Fertil. Steril.* **72**(4): 713-9 (1999)
- Chiang, M.H., Steuerwald, N., Lambert, H., Main, E.K., Steinleitner, A.; Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction; *Fertil. Steril.* **61**(2): 276-80 (1994)
- Chu, T.M., Nocera, M.A., Flanders, K.C., Kawinski, E.; Localization of seminal plasma transforming growth factor-beta 1 on human spermatozoa: an immunocytochemical study; *Fertil. Steril.* **66**: 327-30 (1996)
- Classen-Linke, I., Kusche, M., Knauth, R., Beier, H.M.; Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells; *Cell Tissue Res.* **287**: 171-185 (1997)
- Conti, P., Reale, M., Grilli, A., Barbacane, R.C., Di Luzio, S., Di Gioacchino, M., De Lutiis, M.A., Felaco, M.; Effect of electromagnetic fields on several CD markers and transcription and expression of CD 4; *Immunobiology* **201**: 36-48 (1999)
- Cork, B.A., Li, T.C., Warren, M.A., Laird, S.M.; Interleukin-11 (IL-11) in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vivo; *J. Reprod. Immunol.* **50**: 3-17 (2001)
- Cork, B.A., Tuckerman, E.M., Li, T.C., Laird, S.M.; Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro; *Mol. Hum. Reprod.* **8**(9): 841-48 (2002)
- Coulam, C.B., Stern, J.J.; Effect of seminal plasma on implantation rates; *Early pregnancy* **1**: 33-6 (1995)

- Critchley, H.O.D., Kelly, R.W., Brenner, R.M., Baird, D.T.; The endocrinology of menstruation – a role for the immune system; *Clin. Endocrin.* **55**: 701-710 (2001)
- Das, C., Kumar, V.S., Gupta, S., Kumar, S.; Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells; *J. Reprod. Immunol.* **53**: 257-68 (2002)
- Denison, F.C., Grant, V.E., Calder, A.A., Kelly, R.W.; Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release; *Mol. Hum. Reprod.* **5**(3): 220-26 (1999)
- Domínguez, F., Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C.; Paracrine interactions during human implantation; *Rev. Endocrin. Metabol. Dis.* **3**: 97-105 (2002)
- Dousset, B., Hussenet, F., Daudin, M., Bujan, L., Foliguet, B., Nabet, P.; Seminal cytokine concentrations (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, sR IL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility; *Hum. Reprod.* **12**(7): 1476-79 (1997)
- Eggert-Kruse, W., Boit, R., Rohr, G., Aufenanger, J, Hund, M., Strowitzki, T.; Relationship of seminal plasma interleukin (IL)-8 and IL-6 with semen quality; *Hum. Reprod.* **16**(3): 517-28 (2001)
- Fazleabas, A.T., Strakova, Z.; Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment; *Mol. Cell. Endocrinol.* **186**: 143-47 (2002)
- Formigli, L., Formigli, G., Roccio, C.; Donation of fertilized uterine ova to infertile women; *Fertil Steril* **47**: 162-5 (1987)
- Gazvani, R., Smith, L., Fowler, P.A.; Effect of interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8, and IL-12 on endometrial cell survival in combined endometrial gland and stromal cell culture derived from women with and without endometriosis; *Fertil Steril* **77**, No. 10, 62-67 (2002)
- Geis, K., Dietl, J.; Die Rolle der Zytokine an der fetomaternalen Grenze; *Zentralbl. Gynäkol.* **123**: 609-18 (2001)
- Green, M.L., Chung, T.E., Reed, K.L., Modric, T., Badinga, L., Yang, J., Simmen, F.A., Simmen, R.C.; Paracrine inducers of uterine endometrial spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expression during early pregnancy in the pig; *Biol. Reprod.* **59**(5): 1251-58 (1998)
- Gruschwitz, M.S., Brezinschek, R., Brezinschek, H.-P.; Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males; *J. Androl.* **17**: 158-163 (1996)
- Gutsche, S., von Wolff, M., Strowitzki, T., Thaler, C.J.; Transforming growth factor- $\beta$ 1 in seminal plasma might facilitate opening the window of implantation; *Hum. Reprod.* **17** (Abstract Book 1), 6 (2002)
- Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J. et al.; The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA; *Mol. Endocrinol.* **5**: 1806-14 (1991)

- Huang, J.-C., Liu, D.-Y., Dawood, M.Y.; The expression of vascular endothelial growth factor isoforms in cultured human endometrial stromal cells and its regulation by 17 $\beta$ -oestradiol; *Mol. Hum. Reprod.* **4** (6): 603-7 (1998)
- Huleihel, M., Lunenfeld, E., Levy, A., Potashnik, G., Glezerman, M.; Distinct expression levels of cytokines and soluble cytokine receptors in seminal plasma of fertile and infertile men; *Fertil. Steril.* **66**(1): 135-9 (1996)
- Huleihel, M., Lunenfeld, E., Horowitz, S., Levy, A., Potashnik, G., Mazor, M., Glezerman, M.; Expression of IL-12, IL-10, PGE<sub>2</sub>, sIL-2R and sIL-6R in seminal plasma of fertile and infertile men; *Andrologia* **31**: 283-88 (1999)
- Huleihel, M., Lunenfeld, E., Horowitz, S., Levy, A., Potashnik, G., Glezerman, M.; Production of interleukin-1-like molecules by human sperm cells; *Fertil. Steril.* **73**(6): 1132-7 (2000)
- Huleihel, M., Lunenfeld, E., Horowitz, S., Levy, A., Potashnik, G., Mazor, M., Glezerman, M.; Involvement of serum and lipopolysaccharide in the production of interleukin-1- and interleukin-6-like molecules by human sperm cells; *AJRI* **43**: 41-46 (2000b)
- Hunt, J.S., Robertson, S.A.; Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success; *J. Reprod. Immunol.* **32**: 1-25 (1996)
- Hunt, J.S., Pollard, J.W.; Macrophages in the uterus and placenta; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **181**: 39-63 (1992)
- Ingman, W.V., Robertson, S.A.; Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction; *BioEssays* **24**: 904-14 (2002)
- Kao, L.C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J.P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R.N., Lessey, B.A., Giudice, L.C.; Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation; *Endocrinol.* **143**(6): 2119-38 (2002)
- Kauma, S., Matt, D., Strom, S. et al.; Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforminh growth factor-beta expression in endometrium, placenta and placental membranes; *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**: 1430-37 (1990)
- Kelly, R.W.; Immunosuppressive mechanisms in semen: implications for contraception; *Hum. Reprod.* **10**(7): 1686-93 (1995)
- Kelly, R.W., Carr, G.G., Critchley, H.O.D.; A cytokine switch induced by human seminal plasma: an immune modulation with implications for sexually transmitted disease; *Hum. Reprod.* **12**(4): 677-81 (1997a)
- Kelly, R.W., Critchley, H.O.D.; Immunmodulation by human seminal plasma: a benefit for spermatozoa and pathogen?; *Hum. Reprod.* **12**(10): 2200-7 (1997b)
- Koumantakis, E., Matalliotakis, I., Kyriakou, D., Fragouli, Y., Relakis, K.; Increased levels of interleukin-8 in human seminal plasma; *Andrologia* **30**, 339-343 (1998)

- Krüssel, J.S., Casañ, E.M., Raga, F., Hirchenhain, J., Wen, Y., Huang, H.-Y., Bielfeld, P., Polan, M.L.; Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor transmembrane receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium; *Mol. Hum. Reprod.* **5** (5): 452-58 (1999)
- Kunz, G., Beil, D., Deininger, H., Wildt, L., Leyendecker, G.; The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy; *Hum Reprod.* **11**(3): 627-32 (1996)
- Kunz, G., Beil, D., Deininger, H., Einspanier, A., Mall, G., Leyendecker, G.; The uterine peristaltic pump. Normal and impeded sperm transport within the female genital tract; *Adv. Exp. Med. Biol.* **424**: 267-77 (1997)
- Laird, S.M., Li, T.C., Bolton, A.E.; The production of placental protein 14 and interleukin 6 by human endometrial cells in culture; *Hum. Reprod.* **8**: 793-98 (1993)
- Laird, S.M., Tuckerman, E.M., Dalton, C.F., Dunphy, B.C., Li, T.C., Zhang, X.; The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture; *Hum. Reprod.* **12**, 569-74 (1997)
- Lass, A., Weiser, W., Munafo, A., Loumayer, E.; Leukemia inhibitory factor in human reproduction; *Fertil. Steril.* **76**(6): 1091-96 (2001)
- Lessey, B.A.; Endometrial receptivity and the window of implantation; *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **14**(5): 775-88 (2000)
- Leyendecker, G., Kunz, G., Wildt, L., Beil, D., Deininger, H.; Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility; *Hum. Reprod.* **11**(7): 1542-51 (1996)
- Lim, K.J.H., Odukoya, O.A., Ajjan, R.A., Li, T.C., Weetman, A.P., Cooke, I.D.; Profile of cytokine mRNA expression in human peri-implantation endometrium; *Mol. Hum. Reprod.* **4**(1): 77-81 (1998)
- Lindhard, A., Bentin-Ley, U., Ravn, V., Islin, H., Hviid, T., Rex, S., Bangsboll, S., Sorensen, S.; Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation; *Fertil. Steril.* **78**(2): 221-33 (2002)
- Loras, B., Vételé, F., El Malki, A., Rollet, J., Soufir, J-C., Benahmed, M.; Seminal transforming growth factor- $\beta$  in normal and infertile men; *Hum. Reprod.* **14**(6): 1534-39 (1999)
- Maegawa, M., Kamada, M., Irahara, M., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Kasai, Y., Ohmoto, Y., Gima, H., Thaler, C.J., Aono, T.; A repertoire of cytokines in human seminal plasma; *J. Reprod. Immunol.* **54**: 33-42 (2002)
- Marconi, G., Auge, L., Oses, R., Quintana, R., Raffo, F., Young, E.; Does sexual intercourse improve pregnancy rates in gamete intrafallopian transfer?; *Fertil. Steril.* **51**(2): 357-59 (1989)

- Merviel, P., Evain-Brion, D., Challier, J.C., Salat-Baroux, J., Uzan, S.; The molecular basis of embryo implantation in humans; *Zentralbl. Gynaekol.* **123**: 328-39 (2001)
- Miller, D.; Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa; *Mol. Reprod. Dev.* **56** (2 Suppl): 259-64 (2000)
- Nocera, M., Chu, T.M.; Characterization of latent transforming growth factor- $\beta$  from human seminal plasma; *AJRI* **33**: 282-91 (1995)
- Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J.; Dating the endometrial biopsy; *Fertil. Steril.* **1**: 3-25 (1950)
- Obermair, A., Obruca, A., Pöhl, M., Kaider, A., Vales, A., Leodolter, S., Wojta, J., Feichtinger, W.; Vascular endothelial growth factor and its receptors in male infertility; *Fertil. Steril.* **72**(2): 269-275 (1999)
- Ochsenkühn, R., Nieschlag, E.; Therapeutische Möglichkeiten bei Infertilität des Mannes; *Münch. Med. Wschr.* **140**: 628-33 (1998)
- Özörnek, M.H., Bielfeld, P., Krüssel, J.S., Hirchenhain, J., Jeyendran, R.S., Kolsovsky, U.; Epidermal growth factor and leukemia inhibitory factor levels in follicular fluid, Association with in vitro fertilization outcome; *J. Reprod. Med.* **44**: 367-69 (1999)
- Overstreet, J.W., Katz, D.F., Yudin, A.I.; Cervical mucus and sperm transport in reproduction; *Sem. Perinatology* **15**(2): 149-55 (1991)
- Psychoyos, A.; The implantation window: basic and clinical aspects. In "Perspectives in Assisted Reproduction". (Eds. Mori, T., Aono, T., Tominaga, T., Hiroi, M.) pp. 57-63. Serono Series Frontiers in Endocrinology (Ares-Serono Symposia: Rome) (1994)
- Richter, W., Dettmer, D., Glander, H.-J.; Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa; *Mol. Hum. Reprod.* **5**(8): 732-36 (1999)
- Robertson, S.A., Seamark, R.F.; Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): one of a family of epithelial cell-derived cytokines in the preimplantation uterus; *Reprod. Fertil. Dev.* **4**, 435-48 (1992)
- Robertson, S.A., Mau, V.J., Hudson, S.N., Tremellen, K.P. ; Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy; *AJRI* **37**: 438-442 (1997)
- Robertson, S.A., O'Connell, A.C., Hudson, S.N., Seamark, R.F.; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) targets myeloid leukocytes in the uterus during the post-mating inflammatory response in mice; *J. Reprod. Immunol.* **46**: 131-154 (2000a)
- Robertson, S.A.; Control of the immunological environment of the uterus ; *Rev. Reprod.* **5**: 164-174 (2000b)
- Robertson, S.A., Sharkey, D.J.; The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy; *Sem. Immunol.* **13**: 243-54 (2001)

- Robertson, S.A., Ingman, W.V., O'Leary, S., Sharkey, D.J., Tremellen, K.P.; Transforming growth factor  $\beta$  – a mediator of immune deviation in seminal plasma; *J. Reprod. Immunol.* **57**: 109-28 (2002)
- Rogers. P.A.W., Murphy, C.R.; Uterine receptivity for implantation: human studies in blastocyst implantation. In "Blastocyst Implantation" (Ed. K. Yoshida) pp. 231-246 (Adams Publishing Group Ltd: Boston) (1989)
- Salamonsen, L.A., Dimitriadis, E., Robb, L. ; Cytokines in implantation ; *Semin Reprod Med* **18**(3) : 299-310 (2000)
- Salamonsen, L.A., Nie, G., Dimitriadis, E., Robb, L., Findlay, J.K. ; Genes involved in implantation ; *Reprod. Fertil. Dev.* **13**, 41-49 (2001)
- Salamonsen, L.A., Nie, G., Findlay, J.K. ; Newly identified endometrial genes of importance for implantation; *J. Reprod. Immunol.* **53**: 215-225 (2002)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.; Molecular cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY (1989)
- Sawai, K., Matsuzaki, N., Okada, T., Shimoya, K., Koyama, M., Azuma, C., Saji, F., Murata, Y.; Human decidual cell biosynthesis of leukaemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones; *Biol. Reprod.* **56**: 1274-80 (1997)
- Selam, B., Kayisli, U.A., Garcia-Velasco, J.A., Akbas, G.E., Arici, A.; Regulation of Fas Ligand expression by IL-8 in human endometrium; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 3921-27 (2002)
- Senturk, L.M., Arici, A.; Leukemia inhibitory factor in human reproduction; *Am. J. Reprod. Immunol.* **39**(2): 144-51 (1998)
- Settlage, D.S.F., Motoshima, N., Tredway, D.R.; Sperm transport from the external os to the fallopian tubes in women: a time and quantification study; *Fertil Steril.* **24**: 655-661 (1972)
- Sherwin, J.R.A., Smith, S.K., Wilson, A., Sharkey, A.M.; Soluble gp130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility; *J. Clin. Metab.* **87**: 3953-60 (2002)
- Simón, C., Piquette, G.N., Frances, A., Polan, M.L.; Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**(2): 549-55 (1993)
- Simón, C., Valbuena, D., Krüssel, J., Bernal, A., Murphy, C.R., Shaw, T., Pellicer, A., Polan, M.L.; Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium; *Fertil. Steril.* **70**: 896-906 (1998)
- Simón, C., Martin, J.C., Pellicer, A.; Paracrine regulators of implantation; *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **14**(5): 815-26 (2000)

Simón, C., Dominguez, F., Remohí, J., Pellicer, A. ; Embryo effects in human implantation : Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation ; *Ann N Y Acad Sci* **943**: 1-16 (2001)

Sjöblom, C., Wikland, M., Robertson, S.A.; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro*; *Hum. Reprod.* **14**(12): 3069-76 (1999)

Smith, S.K., Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M.; The role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction; *Hum. Reprod.* **13** Suppl. 3: 237-43 (1998)

Srivastava, M.D., Lippes, J., Srivastava, B.I.S.; Cytokines in human reproduction; *AJRI* **36**: 157-66 (1996)

Sugino, N., Kashida, S., Karube-Harada, A., Takiguchi, S., Kato, H.; Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy; *Reproduction* **123**: 379-87 (2002)

Sunder, S., Lenton, E.A.; Endocrinology of the peri-implantation period; *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **14**(5): 789-800 (2000)

Svalander, P.C., Holmes, P.V., Gemzell-Danielsson, K., Swahn, M.-L., Wikland, M., Bygdeman, M.; Characterization of the human endometrium in relation to implantation. In "Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions". (Eds. S.R. Glasser, J. Mulholland, A. Psychoyos) pp. 125-135 (Plenum Press, N.Y.) (1994)

Schäfer-Somi, S.; Cytokines during early pregnancy of mammals: a review; *Animal Reprod. Sci.* **75**: 73-94 (2003)

Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen F., Abbondanzo, S.J.; Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor; *Nature* **359**, Sept.: 76-79 (1992)

Tabibzadeh, S., Santhanam, U., Sehgal, P.B., May, L.; Cytokine-induced production of interferon  $\beta$ 2/interleukin-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 $\beta$ ; *J. Immunol.* **142**: 3134-39 (1989)

Tabibzadeh, S., Sun, X.Z.; Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle; *Hum. Reprod.* **7**: 1214-21 (1992)

Tabibzadeh, S., Kong, Q.F., Babaknia, A., May, L.T.; Progressive rise in the expression of interleukin 6 in human endometrium during the menstrual cycle is initiated during the implantation window; *Mol. Hum. Reprod.* **1**: 2793-99 (1995)

Tabibzadeh, S.; Molecular control of the implantation window; *Hum. Reprod. Update* **4**(5): 465-71 (1998)

Tabibzadeh, S.; Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty; *Front. Bioscience* **7**: 1231-46 (2002a)

Tabibzadeh, S.; Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals; *Front. Bioscience* **7**:1475-86 (2002b)

Thaler, C.J.; Immunological role for seminal plasma in insemination and pregnancy; *AJRI* **21**: 147-150 (1989)

Tremellen, K.P., Robertson, S.; Potential role of seminal plasma TGFbeta in the initiation of the post-coital inflammatory response in humans; *J. Reprod. Immunol.* **34**: 76 (1997)

Tremellen, K.P., Seamark, R.F., Robertson, S.; Seminal transforming growth factor  $\beta$ 1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus; *Biol Reprod* **58**: 1217-1225 (1998)

Tremellen, K.P., Valbuena, D., Landeras, J., Ballesteros, A., Martinez, J., Mendoza, S., Norman, R.J., Robertson, S.A., Simón, C.; The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction; *Hum. Reprod.* **15**(12): 2653-58 (2000)

Tsai, H.D., Chang, C.C., Hsieh, Y.Y., Lo, H.Y.; Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases; *J. Assist. Reprod. Genet.* **17**(8): 415-8 (2000)

Vogiagis, D., Fry, R.C., Sandeman, R.M., Salamonsen, L.A.; Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes; *J. Reprod. Fertil.* **109**(2): 279-88 (1997)

von Wolff, M., Thaler, C.J., Strowitzki, T., Broome, J., Stolz, W., Tabibzadeh, S.; Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion; *Mol. Hum. Reprod.* **6**(7): 627-34 (2000)

von Wolff, M., Thaler, C.J., Zepf, C., Becker, V., Beier, H.M., Strowitzki, T.; Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle; *Gynecol. Endocrinol.* **16**(2): 121-9 (2002a)

von Wolff, M., Stieger, S., Lumpf, K., Bücking, J., Strowitzki, T., Thaler, C.J.; Endometrial interleukin-6 *in vitro* is not regulated directly by female steroid hormones, but by pro-inflammatory cytokines and hypoxia; *Mol. Hum. Reprod.* **8**(12): 1096-1102 (2002b)

WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion; Eds.: Bals-Pratsch, M., Behre, H.M., Knuth, A., Meschede, D., Niemeier, M., Schick, A; 4. Aufl., Springer-Vlg. (1999)

Wild, M.D., Roudebush, W.E.; Presence of ribonucleic acid in human spermatozoa: differences in content between normal and abnormal spermatozoa; *Am. J. Obstet. Gynecol.* **182**(5): 1011-2 (2000)

Wolff, H., Anderson, D.J.; Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulations in human semen; *Fertil. Steril.* **49**: 497-504 (1988)

Wolff, H.; The biological significance of white blood cells in semen; *Fertil. Steril.* **63**(6): 1143-57 (1995)

## Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hermann Hepp für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Forschungslabor der Frauenklinik im Klinikum Großhadern zur Anfertigung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Christian J. Thaler gilt mein Dank für das interessante Thema, für seine hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie für alles, was ich bei ihm lernen durfte.

Herrn Dr. Michael von Wolff danke ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit und die Aufmerksamkeit, mit der er die experimentelle Phase begleitete.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors für das gute Arbeitsklima und zahlreiche Hilfestellungen. Insbesondere danke ich Frau Marianne Fileki für ihre Unterstützung bei der Durchführung der RNase Protection Assays und Frau Dieta Egner für ihre wertvollen Ratschläge.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Peter Lohse und seiner Frau Pia, dass ich in deren Labor die RPAs durchführen konnte und dass sie mir bei allen aufgetretenen Problemen stets freundlich und hilfsbereit zur Seite gestanden sind.

Ich danke allen Schwestern, Pflegern und Ärzten der Kliniken Dritter Orden, Großhadern und Harlaching sowie den MTAs der Dermatologie Innenstadt und des IVF-Labors Großhadern für ihre gute Kooperation bei der Probengewinnung.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei all denjenigen, die mich – jeder auf seine Art – nach Kräften unterstützen und unterstützt haben. Diese vielen liebevollen Menschen haben mir sehr geholfen und auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders danke ich meiner ärztlichen Freundin Annette für ihre große Hilfsbereitschaft.



## Lebenslauf

Name: Stefanie Gutsche

Geburtsdatum: 6. März 1968

Geburtsort: Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1974 – 1978 Eichendorff-Grundschule, Augsburg-Haunstetten  
1978 – 1987 humanistisches Gymnasium bei St. Anna, Augsburg  
1987: Abitur

Ausbildungen: 1988 – 1990 MTLA-Ausbildung an der Akademie Prof. Dr. Grübler,  
Isny  
1992 – 1997 Studium der Biochemie in Regensburg  
1997: Diplom

Beruf: 1987 – 1988 Werkstudentin bei Siemens  
1990 – 1992 MTLA im DRK-Blutspendedienst Ulm  
1998 – 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pathologischen  
Institut der Universität Würzburg  
Seitdem wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Frauenklinik der  
LMU München - Großhadern

Auszeichnungen: 2001: Travel Grant Award für den 21. ASRI-Kongress in Chicago, IL  
2002: Certificate of Excellence Award beim 22. ASRI-Kongress in  
Chicago