

**Integrine und pro-inflammatorische Zytokine  
im humanen Endometrium -  
immunhistochemische Untersuchungen zur Expression  
und in vitro-Studien zur Regulation  
anhand eines optimierten Zellkulturmodells**

Claudia Zepf

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. H. Hepp

**Integrine und pro-inflammatorische Zytokine  
im humanen Endometrium -  
immunhistochemische Untersuchungen zur Expression  
und in vitro-Studien zur Regulation  
anhand eines optimierten Zellkulturmodells**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Claudia Zepf  
aus Spaichingen

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. J. Thaler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Kufer  
Prof. Dr. B. Gerber

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. von Wolff

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2003

<b><u>1. EINLEITUNG</u></b>	<b>4</b>
<b><u>1.1. Wissenschaftlicher Hintergrund</u></b>	<b>4</b>
<b><u>1.2. Fragestellung</u></b>	<b>5</b>
<b><u>2. MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>6</b>
<b><u>2.1. Patientengut und Probenmaterial</u></b>	<b>6</b>
<u>2.1.1. Kriterien für die Auswahl von Probenmaterial</u>	6
<u>2.1.2. Asservierung von Gewebe und Serum</u>	6
<u>2.1.3. Dokumentation</u>	7
<b><u>2.2. Anlegen einer Zellkultur</u></b>	<b>7</b>
<u>2.2.1. Enzymatische Vorbehandlung des Endometrium</u>	7
<u>2.2.2. Matrigelbeschichtung der Kultureinsätze</u>	8
<u>2.2.3. Isolierung von Epithel- und Stromazellen mittels Filtration</u>	8
<u>2.2.4. Zellreinigung mittels Zentrifugation</u>	9
<u>2.2.5. Passage von Stromazellen</u>	9
<u>2.2.6. Mediumwechsel</u>	10
<b><u>2.3. Optimierung der Zellkultivierung</u></b>	<b>10</b>
<u>2.3.1. Gewebetransport bei unterschiedlichen Temperaturen</u>	10
<u>2.3.2. Mechanische Zerkleinerung während der enzymatischen Andauung</u>	11
<u>2.3.3. Wahl der optimale Matrigelverdünnung</u>	11
<u>2.3.4. Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum</u>	12
<b><u>2.4. Charakterisierung der Zellkulturen</u></b>	<b>12</b>
<u>2.4.1. Kontamination mit Fremdzellen</u>	12
<u>2.4.2. Vitalitätsnachweis der Stroma - und Epithelzellen</u>	13
<u>2.4.3. Proliferationsdynamik der kultivierten Zellen</u>	14
<u>2.4.3.1. Untersuchungen mittels Zellzählung und Zelldichtebestimmung</u>	14
<u>2.4.3.1.1. Stromazellkulturen</u>	14
<u>2.4.3.1.2. Epithelzellkulturen</u>	15
<u>2.4.3.2. Untersuchung mittels [3H]-markiertem methyl-Thymidin</u>	16
<u>2.4.3.2.1. Thymidininkorporation</u>	16
<u>2.4.3.2.2. Aufbereitung der Zellen</u>	17
<u>2.4.3.2.3. Messung der inkorporierten Radioaktivität</u>	17
<u>2.4.4. Dezidualisierung und Mehrfachpassagen bei Stromazellen</u>	18

<b><u>2.5.</u></b>	<b><u>Steroidstimulaton der Zellkulturen</u></b>	<b>18</b>
2.5.1.	<u>Stimulation mit 17-<math>\beta</math>-Estradiol und Progesteron</u>	18
2.5.2.	<u>Zytokinmessung in Kulturüberständen mittels ELISA</u>	19
2.5.3.	<u>Thymidininkorporation bei hormonell stimulierten Zellkulturen</u>	20
<b><u>2.6.</u></b>	<b><u>Immunhistochemie</u></b>	<b>20</b>
2.6.1.	<u>Zyklusdatierung der Gewebeproben</u>	20
2.6.2.	<u>Vorbehandlung der endometrialen Kryostatschnitte</u>	21
2.6.3.	<u>Durchführung der Immunhistochemie</u>	21
<b><u>3.</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>24</b>
<b><u>3.1.</u></b>	<b><u>Optimierung der Zellkultivierung</u></b>	<b>24</b>
3.1.1.	<u>Wahl der idealen Temperatur des Transportmediums</u>	24
3.1.2.	<u>Mechanische Zerkleinerung während der Collagenaseandauung</u>	24
3.1.3.	<u>Wahl der optimalen Matrigelverdünnung</u>	26
3.1.4.	<u>Kultivierung der Zellen mit inaktiviertem und nicht inaktiviertem FCS</u>	26
3.1.4.1.	<u>Proliferationsverhalten von Stromazellen</u>	26
3.1.4.2.	<u>Proliferationsverhalten von Epithelzellen</u>	27
<b><u>3.2.</u></b>	<b><u>Charakterisierung der Epithel- und Stromazellkulturen</u></b>	<b>29</b>
3.2.1.	<u>Immunzytochemie</u>	29
3.2.2.	<u>Vitalitätsassay</u>	31
3.2.3.	<u>Proliferationsdynamik endometrialer Zellkulturen</u>	34
3.2.3.1.	<u>Quantitative und semiquantitative Methodik</u>	34
3.2.3.1.1.	<u>Zellzählung bei stromalen Kulturen</u>	34
3.2.3.1.2.	<u>Zelldichtebestimmung bei epithelialen Kulturen</u>	35
3.2.3.2.	<u>Quantifizierung mittels radioaktiv markierten methyl-Thymidin</u>	36
3.2.3.2.1.	<u>Thymidininkorporation bei Epithelzellkulturen</u>	36
3.2.3.2.2.	<u>Thymidininkorporation bei Stromazellen</u>	37
3.2.4.	<u>Dezidualisierung der Stromazellen</u>	38
3.2.5.	<u>Proliferationsdynamik endometrialer Zellen nach Hormonstimulation</u>	39
<b><u>3.3.</u></b>	<b><u>Einflüsse der Steroidstimulation auf die endometriale Zytokinsekretion</u></b>	<b>40</b>
3.3.1.	<u>LIF (Leukemia inhibitory factor)</u>	40
3.3.2.	<u>IL-6 (Interleukin-6)</u>	41

<b><u>3.4.</u></b>	<b><u>Immunhistochemische Charakterisierung der Zellkulturen</u></b>	<b>42</b>
3.4.1.	<u><math>\beta_3</math>-Integrin</u>	42
3.4.2.	<u><math>\alpha_V</math>-Integrin</u>	44
3.4.3.	<u><math>\alpha_V \beta_3</math>-Integrin</u>	46
3.4.4.	<u>LIF</u>	48
3.4.5.	<u>IL-6</u>	50
3.4.6.	<u>Osteopontin</u>	50
<b><u>4.</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>53</b>
<b><u>4.1.</u></b>	<b><u>Aspekte der ungewollten Kinderlosigkeit</u></b>	<b>53</b>
<b><u>4.2.</u></b>	<b><u>Rezidivierende Frühaborte und Implantationsversagen</u></b>	<b>53</b>
<b><u>4.3.</u></b>	<b><u>Das Modell für die Implantation der menschlichen Blastozyste</u></b>	<b>54</b>
<b><u>4.4.</u></b>	<b><u>Ursachenforschung auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene</u></b>	<b>56</b>
4.4.1.	<u>Die zyklusabhängige endometriale Differenzierung als Basis für die uterine Empfänglichkeit</u>	56
4.4.2.	<u>Gestationsspezifische Veränderungen des Endometriums</u>	58
4.4.3.	<u>Die Bedeutung der Integrin-Expression .....</u>	60
4.4.4.	<u>....und der Zytokin- Expression bei der Blastozystenimplantation</u>	65
<b><u>4.5.</u></b>	<b><u>Schlussfolgerung</u></b>	<b>74</b>
<b><u>5.</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>75</b>
<b><u>6.</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>77</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Wissenschaftlicher Hintergrund

Das Phänomen der ungewollten Kinderlosigkeit hat in der westlichen Welt eine zunehmende Tendenz und betrifft in Deutschland 12-15% der Paare. Die derzeit verfügbaren diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten machen die Reproduktionsmedizin zu einem unentbehrlichen Bereich in der Gynäkologie.

Bei schätzungsweise 50% aller spontanen Konzeptionen kommt es zu einem abortiven Ereignis. Aufgrund des steigenden Wiederholungsrisikos spricht man nach drei Fehlgeburten von einer habituellen Abortneigung. Die Pathologie rezidivierender Spontanaborte (RSA) mit einer Häufigkeit von etwa 1% (Bulletti et al., 1996) ist erst ansatzweise geklärt. Viele reproduktionsmedizinische Verfahren umgehen den Tubentransport und somit zahlreiche potentielle Störfaktoren der Präimplantationsphase. Dennoch kommt es in 18-34% der Schwangerschaften zum Abort (Bulletti et al., 1996). In diesen Fällen wird bei ausgeschlossener embryonaler Ursache eine maternale Ätiologie angenommen, die in einer gestörten Frühschwangerschaft resultiert.

Unabhängig von der Anwesenheit eines Keimes tritt zwischen dem 23. und 24. Zyklustag die Phase der uterinen Rezeptivität ein (Psychoyos 1974 und 1993) – sie wird auch als „Implantation window“ bezeichnet. Schon in der Präimplantationsphase findet ein embryo-maternaler Dialog statt. Dieser erfolgt teilweise über die von Endometrium und Blastozyste sezernierten Zytokine, deren para- und juxtakrine Wirkung komplexen Regulationsmechanismen unterliegen (Noyes et al., 1963; Psychoyos, 1986).

LIF (Leukemia inhibitory factor) reguliert die trophoblastäre Differenzierung (Bischof et al., 1995; Dunglinson et al., 1996) und fördert die Expression endometrialer Integrine (Stewart, 1994; Heymann et al., 1996). Maximale mRNA-Mengen fand man im Endometrium der mittleren und späten Sekretionsphase - bei Frauen mit rezidivierendem Implantationsversagen in signifikant niedrigerem Ausmaß als beim Normalkollektiv (Delage et al., 1995). Neben Steroidhormonen (Bamberger et al., 1999) regen IL-1, TNF- $\alpha$  und Wachstumsfaktoren die LIF-Expression in Stromazellkulturen an (Arici et al., 1995). Hohe Konzentrationen von IL-6 (Interleukin-6) im sekretorischen Epithel (Tabibzadeh et al., 1995a; Vandermolen et al., 1996) und die Expression des IL-6-Rezeptors bei Blastozysten (Sharkey et al., 1995) deuten auf eine Funktion bei der Implantation hin. Es bestehen kontroverse Aussagen zur steroidabhängigen IL-6-Expression: eine Steigerung bewirkt beim Epithel die Gabe von Progesteron und/ oder 17- $\beta$ -Estradiol (Laird et al., 1993). Die kombinierte Stimulation führt bei Epithel aus der

späten Sekretionsphase jedoch zu einer Downregulation. Beim Stroma wurde als Folge der Gabe von 17- $\beta$ -Estradiol sowohl die Downregulation (Tabibdzeh et al., 1989; Laird et al., 1993) als auch die Hochregulation (Tseng et al., 1996) der IL-6-Expression beschrieben. IL-1 fördert dosisabhängig zu IL-6-Expression bei Epithel- (Laird et al., 1994) und Stromazellen (Tabibzadeh et al., 1989). Ist das auf endometrialer und trophoblastärer Seite räumlich und zeitlich dynamische Muster der Expression von Adhäsionsmolekülen (Grosskinsky et al., 1996; Lessey et al., 1996) gestört, kommt es vermutlich zum Implantationsversagen. Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zeigt sein epitheliales Expressionsmaximum am 20. Zyklustag, also zum Zeitpunkt des embryonalen Attachments (Tabibzadeh, 1992; Lessey et al., 1992 und 1994). Osteopontin (hOPn), ein Glykoprotein, fungiert als molekulare Brücke zwischen den trophoblastären und endometrialen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen (Liaw et al., 1995).

## 1.2. Fragestellung

Die Kultivierung endometrialer Epithelzellen erfolgte auf Matrigel im 2-Kammersystem, weil dadurch im Gegensatz zur Monolayerkultur die basoapikale Polarität sowie die Expression von Hormonrezeptoren (Bentin-Ley et al., 1994; Classen-Linke et al., 1997) persistiert. Stromazellen wurden als Monolayer auf Polystyrol kultiviert. Die erste Frage lautete daher: Weisen diese Zellen ausreichend hohe Proliferationsraten und eine uneingeschränkte Viabilität zwischen dem 3. und 6. Kulturtag auf? Eignet sich dieses optimierte Kulturmodell somit als Basis für Untersuchungen zur endometrialen Integrin- und Zytokinregulation?

Ein direkter Einfluss von Steroidhormonen oder deren Antagonisten auf das endometriale Integrinmuster wurde bisher weder in vivo noch in vitro nachgewiesen (Van der Linden et al., 1995; Grossinsky et al., 1996; Sillem et al., 1997). Die Annahme einer zytokinvermittelten Steroidwirkung auf das Integrinmuster führte zur ersten Frage: Beeinflussen 17- $\beta$ -Estradiol und Progesteron die endometriale LIF-, IL-6- und hOPN-Sekretion in vitro? Lassen sich daraus unter Mitberücksichtigung der immunhistochemischen Ergebnisse mögliche Regulationsmechanismen insbesondere der endometrialen IL-6-Expression ableiten?

Schließlich stellte sich die Frage: Wie hoch ist die Kontamination der Kulturen mit immunologisch aktiven und das Integrin- und Zytokinmuster beeinflussenden Zellen? Ermöglicht die Analyse der Zyklus- und Gestationsabhängigkeit endometrialer Leukozytenpopulationen die Interpretation entsprechender Quantifizierungen?



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patientengut und Probenmaterial

#### 2.1.1. Kriterien für die Auswahl von Probenmaterial

Die Gewinnung von Endometrium aus verschiedenen Zyklusphasen erfolgte im Rahmen von Hysterektomien bei prämenopausalen Frauen, die am Vortag der Operation über dieses Projekt aufgeklärt wurden und ihr Einverständnis zur Gewebeentnahme gaben. Voraussetzung waren regelmäßige Menstruationszyklen der zwischen 38- und 50-jährigen Patientinnen. Ausschlusskriterien waren neben Regeltempoanomalien eine weniger als drei Monate zurückliegende hormonelle oder antihormonelle Therapie, das Tragen von Intrauterinpressaren sowie Hinweise für neoplastische Prozesse. Entsprechend dieser Voraussetzungen lauteten die Operationsindikationen folgendermaßen: symptomatischer Uterus myomatosus, Hypermenorrhoe und Descensus genitalis.

#### 2.1.2. Asservierung von Gewebe und Serum

Die Probenentnahme erfolgte nach Absprache mit dem verantwortlichen Pathologen direkt im Anschluss an die Hysterektomie im Operationssaal unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde ein „Prevical“ Katheter (Nourypharma, Oberschleißheim, Deutschland) in den Zervikalkanal eingebracht und diente als Führungsstab bei der Eröffnung des Organs mit einem Skalpell. Vom Fundusbereich des Cavum uteri wurde Endometrium für verschiedene Untersuchungszwecke entnommen: Zunächst wurde ein ca. 0,5 cm breiter, 1 cm langer und 0,5 cm tiefer Gewebblock für immunhistochemische Untersuchungen exzidiert. Dieser wurde zur Schonung der epithelialen Drüsenformationen mit der Pinzette derart in ein Kryotube (Greiner, Ort) geschoben, dass an dessen Innenwand der myometriale Anteil des Blöckchens anlag. Anschließend wurde das für die Zellkulturen benötigte Endometrium durch Kürettage des Cavum mit einem Skalpell gewonnen und in ein 6 ml Medium enthaltendes, steriles Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Bei der Nährlösung handelte es sich um phenolrotfreies DMEM/HAM's F-12 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), welches 10% FCS (Gibco, Eggenstein, Deutschland), 0,2% Zienam (Imipenem und Cilastatin) und 0,4% Nystatin (200.00 I.E./L) enthielt. Der Transport erfolgte bei 20°C.

Bei der narkotisierten Patientin wurden 10 ml venöses Blut entnommen und im Forschungslabor zentrifugiert. Nach Abpipettierung des Serums wurde dieses in zwei Eppendorf-Cups zu je 0,5 ml schockgefroren und bis zur Bestimmung von Östrogen, Progesteron und LH durch das Labor der Klinischen Chemie, Klinikum Großhadern, bei 70°C aufbewahrt.

### 2.1.3. Dokumentation

Jede Gewebeentnahme erhielt eine laufende Nummer und wurde mit Datum folgendermaßen protokolliert: das operative Verfahren wie z.B. vaginale oder abdominale Hysterektomie bzw. die Entnahme des Organs in toto oder dessen Morcellierung wurden festgehalten. Desweiteren wurde die Dauer zwischen der Ligierung der Arteria uterina und der Entnahme von Endometrium eruiert und notiert. Daneben fand eine Beschreibung des Endometriums hinsichtlich seiner Beschaffenheit im Sinne einer Einteilung in die drei Kategorien „schwach“, „mittelgradig“ oder „hoch aufgebaute Schleimhaut“ statt. Außerdem wurden sämtliche Besonderheiten, die bei der Inspektion des eröffneten Uterus auffielen, wie z.B. blutreiches Cavum uteri, festgehalten. Aus der Krankenakte wurden Name und Geburtsdatum der Patientin, die gynäkologische Diagnose sowie die Zyklusanamnese entnommen.

## 2.2. Anlegen einer Zellkultur

Die Aufbereitung des endometrialen Gewebes und die Kultivierung von Epithel- und Stromazellen wurden in Anlehnung an die Beschreibung von Classen-Linke et al., 1997, durchgeführt.

### 2.2.1. Enzymatische Vorbehandlung des Endometrium

Der Transport des Gewebes bis zur Verarbeitung zur Zellkultur an der sterilen Werkbank mit laminarer Strömung dauerte durchschnittlich eine Stunde. Zu Beginn wurde der gesamte Inhalt des Transportgefäßes (Gewebe + 6 ml Medium) vorsichtig in eine sterile Petrischale aus Glas überführt und das Endometrium mit dem Skalpell in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Stücke

geschnitten. Nun wurde Collagenase des Typs I A mit einer Aktivität von 400 Units/mg (Sigma) zugefügt, so dass diese in einer Konzentration von 0,153% vorlag. Dem Überführen der Suspension in eine Zellkulturflasche folgte die einstündige enzymatische Andauung im Wasserbad bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 20/min. Dieser Vorgang wurde nach 30 Minuten unterbrochen, um mit einer 1000- $\mu$ l-Pipette den Flascheninhalt ca. 50-mal zu resuspendieren und durch den Sog eine weitere mechanische Zerkleinerung des Endometriums zu erreichen. Nach weiteren 30 Minuten wurde dieser Arbeitsschritt wiederholt.

### 2.2.2. Matrigelbeschichtung der Kultureinsätze

Um eine vorzeitige Gelierung des phenolrotfreien Matrigels (Becton Dickinson, New Jersey, USA) zu vermeiden, wurde stets mit 4°C kalten Instrumenten und Medien gearbeitet.

In die Vertiefungen einer 24-Well-Platte (Falcon, Oxnard, USA) wurden mit einer sterilen Pinzette Kultureinsätze des Typs „Millicell CM“ (Milipore, Eschborn, Deutschland), in welche ein Filter mit der Porengröße 0,4  $\mu$ m eingelassen war, gelegt. Das 4°C kalte und somit visköse Matrigel wurde mit FCS-freiem DMEM im Verhältnis 1:4 verdünnt. Nun folgte die Beschichtung der im Durchmesser 12 mm messenden Einsätze mit je 100  $\mu$ l dieser Verdünnung. Dabei mussten während des Pipettierens langsam von zentral nach außen kreisende Bewegungen erfolgen, um eine ebene und luftblasenfreie Bedeckung der Membran zu erreichen. Es folgte die 90-minütige Gelierung im Brutschrank bei 37°C.

### 2.2.3. Isolierung von Epithel- und Stromazellen mittels Filtration

Das für die folgenden Arbeitsschritte verwendete DMEM/ HAM's F-12 wurde zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Nach der enzymatischen Andauung der Gewebeprobe wurde die Suspension unter Verwendung eines Nylonsiebes aus mit einer Porengröße von 180  $\mu$ m (Millipore) filtriert, wodurch unverdautes Gewebe, Myometrium und Schleimreste entfernt wurden. Vor der Verwerfung dieses Rückstandes wurde durch Nachspülen des Filters mit 5 ml Medium die Ausbeute an Epithel- und Stromazellen im ersten Filtrat erhöht. Die darin enthaltenen endometrialen Drüsenschläuche hielt das im zweiten Filtrationsschritt verwendete 40- $\mu$ m-

Sieb (Becton Dickinson) zurück, während es von Stromazellen und Erythrozyten passiert wurde. Mit 10 ml Medium wurden die den Rückstand darstellenden epithelialen Drüsenschläuche in eine Petrischale gespült.

#### 2.2.4. Zellreinigung mittels Zentrifugation

Die Stroma- und Epithelzellsuspensionen wurden in 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten lang bei 600 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in je 10 ml gelöst und ein zweites Mal zentrifugiert. Nach erneuter Verwerfung des Überstandes wurden die sedimentierten Stromazellen in 5 ml Medium gelöst und in einer Zellkulturflasche mit einer Dichte von 300 000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Bei den Epithelzellen wurden zu diesem Zweck 2,05ml verwendet, so dass auf alle 10 Kultureinsätze 200 µl der Zellsuspension aufgetragen wurde, was einer Dichte von 6000 Drüsenschläuchen/cm<sup>2</sup> entsprach. Die restlichen 50 µl dienten der späteren Zählung der stromalen Einzelzellen und der epithelialen Drüsenschläuche mit Hilfe der Neubauer Kammer.

Um ein zweikammriges Zellkultursystem für endometriales Epithel zu erhalten, wurden 500 µl Medium in jede Vertiefung der Kulturplatte pipettiert, so dass die bereits eingesetzten Kultureinsätze darin schwammen.

#### 2.2.5. Passage von Stromazellen

Durch den ersten Mediumwechsel nach 24 h wurde ein Großteil der im Kulturmedium befindlichen Erythrozyten und Epithelzellen entfernt. Der weiteren Elimination von Fremdzellen diente die Passagierung der Stromazellen. Diese wurde abhängig von der lichtmikroskopischen Beobachtung eines konfluenten Zellteppichs nach weiteren 24 bis 48 h durchgeführt.

Begonnen wurde mit dem Abpipettieren des Mediums, worauf zwei bis drei Spülschritte mit jeweils 10 ml 37°C warmem, sterilem PBS-Puffer folgten. Nun wurde der Boden der Zellkulturflasche mit 1 ml 10%-igem Trypsin (Gibco) benetzt. Während der anschließenden 10-minütigen Inkubation im Brutschrank wurden die Stromazellen von ihrer Unterfläche abgelöst. Mikroskopisch konnte dies anhand der sich verändernden Zellmorphologie, d.h. des Übergangs von der spindelförmigen in eine kugelige Gestalt beobachtet werden

Zum Zeitpunkt der vollständigen Ablösung bewirkte die Zugabe von 9,05 ml FCS-haltigem DMEM/HAM's F-12 die Beendigung der Enzymaktivität. Während der zehnmütigen Zentrifugation bei 1000 U/min wurde die Zahl an Stromazellen in zuvor abgenommenen 50 µl der Zellsuspension mit Hilfe der Neubauer Kammer ermittelt. Nach Verwerfen des trypsinhaltigen Überstandes wurden die sedimentierten Stromazellen in einer entsprechenden Menge an Medium gelöst, so dass sich eine Konzentration von 160.000 Zellen/ml ergab. Durch Auftragen von 500 µl in jede Vertiefung einer 24-Well-Platte erzielte man eine Zellzahl von 80.000/Well bzw. eine Zelldichte von 100.000/cm<sup>2</sup>. Der Beginn der Kultivierung der Stromazellen (= Tag 0) ist in allen weiteren Untersuchungen mit dem Zeitpunkt der Passagierung gleichzusetzen.

#### 2.2.6. Mediumwechsel

Die Zellkulturen inkubierten im Brutschrank bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%. Sowohl bei den Epithel- als auch bei den Stromazellkulturen wurden alle 48 Stunden die Kulturüberstände abpipettiert, zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert und durch die gleiche Menge an frischem, unter 2.1.2 beschriebenem Medium ersetzt. Ob günstige Wachstumsverhältnisse vorlagen, zeigte sich 24-36 Stunden nach Ausstreuung der Zellen.

### 2.3. Optimierung der Zellkultivierung

#### 2.3.1. Gewebetransport bei unterschiedlichen Temperaturen

Durch den Transport des Gewebes auf Eis (4°) findet innerhalb von wenigen Stunden zweimal ein Temperatursprung von 33°C statt, der einen nachteiligen Einfluss auf das Zellwachstum haben könnte. Bei diesem an nur einer Gewebeprobe durchgeführten Versuch wurde die übliche Methode mit der Verwendung von 20°C warmem Medium verglichen. Es sollte geprüft werden, ob durch die Reduzierung der Temperaturdifferenz auf 17°C grobe Unterschiede in der Proliferation bei epithelialen und stromalen Primärkulturen beobachtet werden können.

Im Anschluss an die Gewebeentnahme wurde ein Teil des entnommenen Endometriums auf Eis, der andere Teil bei 20°C bis zur weiteren Verarbeitung transportiert. Nach identischer

Aufbereitung des Gewebes beider Vergleichsgruppen wurden die Suspensionen der Epithel- und Stromazellen auf jeweils drei Kulturansätze verteilt. Die Zelldichte betrug beim Stroma  $120000/\text{cm}^2$ , die Anzahl der epithelialen Drüsenschläuche pro  $\text{cm}^2$  lag bei etwa 1300. Die lichtmikroskopische Beobachtungen der Zellproliferation wurden dokumentiert und verglichen.

### 2.3.2. Mechanische Zerkleinerung während der enzymatischen Andauung

Unter der Vorstellung der besseren Herauslösung endometrialer Drüsenschläuche aus dem Gewebsverband, wurde die einstündige enzymatische Aufbereitung mit Collagenase zweimal unterbrochen um die Zellsuspension mittels einer  $1000\mu\text{l}$ -Pipette ca. 50-mal anzusaugen und auszustoßen. Durch das Abschneiden der ersten 3 mm der Pipettenspitze war deren Öffnung für die Gewebsfragmente gerade noch passierbar, so dass ein kräftiger Sog auf diese wirkte.

### 2.3.3. Wahl der optimale Matrigelverdünnung

Die Wahl der idealen extrazellulären Matrix war eine entscheidende Voraussetzung für die Kultivierung von Epithelzellen. Im folgenden Parallelversuch wurde untersucht, ob bzw. wie stark quantitative Unterschiede in der Verwendung des Matrigels das Zellwachstum beeinflussen.

Die Nylonmembranen der Millicell Inserts wurden mit Matrigel in unterschiedlich starker Konzentration beschichtet. Die Verdünnungen mit FCS-freiem Medium im Verhältnis 1:4 und 1:8 wurden auf jeweils fünf Kultureinsätze aufgetragen. Die aufbereitete Epithelzellsuspension von zwei Gewebsproben wurde entsprechend der Vorgehensweise weiter oben gleichmäßig verteilt. Über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die Proliferation der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und verglichen.

#### 2.3.4. Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum

Diesem Parallelversuch lag die Frage zugrunde, ob in diesem Kulturmodell das Proliferationsverhalten endometrialer Zellen durch vorherige Hitzeinaktivierung des fetalen Kälberserums (Gibcobil) signifikant beeinflusst wird. Vermutlich werden dadurch die wachstumshemmende Wirkung bestimmter Komplementfaktoren sowie der enzymatische Angriff proliferationsfördernder Steroidhormone durch Proteasen vermieden. Zu diesem Zweck wurden von derselben Gewebeprobe sowohl bei Epithel- als auch bei Stromazellen zwei Versuchsreihen A und B zu je drei Kulturansätzen erstellt.

Bis zum vierten Kulturtag (bei Stroma ab Passage) wurden alle Ansätze mit Medium versorgt, das nicht inaktiviertes FCS im Verhältnis 1:10 enthielt. Ab diesem Zeitpunkt (= Tag 4) erhielt Reihe A DMEM, dem in derselben Relation hitzeinaktiviertes Serum (30 Minuten lang bei 56° im Wasserbad) beigemischt wurde, bei Reihe B erfolgten keine Änderungen bezüglich des Nährmediums.

An Tag 9 und 12 wurde zur Beurteilung der Proliferation die Zahl der Stromazellen von zwei Kulturansätzen ermittelt. Bei den Epithelzellkulturen wurde hierfür täglich das unter 2.4.3.1.2 beschriebene Verfahren angewendet. Ebenfalls am 9. und 12. Kulturtag fand der fluoreszenzzytochemische Nachweis vitaler und avitaler Epithelzellen statt.

### 2.4. Charakterisierung der Zellkulturen

#### 2.4.1. Kontamination mit Fremdzellen

Die immunzytochemische Bestimmung der Kontamination mit Zellen nichtendometrialer Herkunft wurde an vier Zellkulturen am sechsten Tag der Kultivierung vorgenommen. Die Vorgehensweise war bei den Epithel- und einfach passagierten Stromazellen hinsichtlich der verwendeten Lösungen, der Inkubationsdauer und der Temperaturen identisch. Die Kultivierung der Epithelzellen auf mit Matrigel beschichteten Membranen machte eine zusätzliche Maßnahme erforderlich, die eine ausreichende Zirkulation von Spül- und Inkubationslösungen gewährleistete: mit der Spitze eines Skalpells wurde die Membranunterseite im schwächer besiedelten Randbereich ca. zehnfach perforiert. Dadurch konnte die apikale und basale Umspülung der Zellen mit den jeweiligen Medien intensiviert werden. Mit Ausnahme der Inkubation mit Blocking Solution wurden nach jedem Schritt

durch dreimaliges Spülen mit PBS für 3- 5 Minuten Reste der Inkubationslösungen entfernt. Nach Abpipettieren des Mediums folgte die Fixierung mit 3,9%-igem Formaldehyd. Mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 % in Methanol ) wurde die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen unterbunden. Nach 30-minütiger Inkubation mit einer ready-to-use Blocking Solution aus dem Histostain SP Färbekit (Zymed) konnte der mit 1,5%-iger BSA-Lösung (Sigma) verdünnte Primärantikörper eine Stunde lang bei 20 °C binden. Es wurden monoklonale Antikörper der Maus gegen folgende spezifische Oberflächenantigene bzw. Zellen verwendet:

Zytokeratin (Dako; 1:100) zur Abschätzung des Anteils epithelialer Zellen bzw. Fibroblasten zur Detektion von Stromazellen (Dianova, Hamburg, Deutschland; 1:50); CD 45 (Dako; 1:100) zur Beurteilung der Kontamination mit Leukocyten generell; CD 14, das für Monozyten bzw. Makrophagen spezifisch ist (Dako; 1:20); CD 56 (Dako; 1:40) - ein den Natural-Killer-Cells gemeinsames Oberflächenmerkmal und schließlich gegen Endothelzellen gerichteter Anti-CD 31-Antikörper (Dako; 1:50). Negativkontrollen erfolgten durch Inkubation mit nicht spezifisch bindenden Immunglobulinen derselben Klasse wie die Primärantikörper, d.h. IgG 1 der Maus für Cytokeratin, CD 31 und CD 56 ; IgG2 für CD 45 und CD 14.

Wiederholtes Spülen mit PBS entfernte unspezifisch gebundene Antikörper. Anschließend inkubierte der biotinierte Sekundär-Antikörper 30 Minuten lang, um die spätere Sichtbarmachung zu verstärken. Die hohe Affinität zwischen Biotin und Avidin wurde bei der folgenden 10minütigen Kopplungsreaktion durch Aufbringen von Streptavidin-konjugierter Peroxidase ausgenutzt.

Diese katalisierte unter Lichtabschluss eine Farbreaktion mittels AEC-haltiger Entwicklerlösung (Zymed), wodurch Antikörper bindende Zellen sich rot darstellten. Nach 7 bis 8 Minuten wurde die Detektion spezifischer Oberflächenantigene mit Aqua dest. gestoppt und der Anteil an Fremdzellen im jeweiligen Kulturansatz unter mikroskopischer Sicht quantifiziert.

#### 2.4.2. Vitalitätsnachweis der Stroma - und Epithelzellen

Für die Beurteilung des angewandten Zellkulturmodells sollte nicht nur die Proliferationsaktivität herangezogen werden. Erst die zusätzliche Sicherstellung, dass der überwiegende Teil der Zellen am 6. Kulturtag vital war, ermöglichte die korrekte



Interpretation von Versuchen bezüglich der Hormonabhängigkeit der Zytokinsekretion, welche zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden.

Der Vitalitätsnachweis anhand eines vorgefertigten Kits (Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland) bei Epithel und Stroma an Tag 6 und 12 wies bei lebenden Zellen die zytoplasmatische Esteraseaktivität nach, die eine Konversion des membrangängigen, ursprünglich nicht fluoreszierenden Calcein in fluoreszierendes bewirkte. Bei nicht mehr vitalen Zellen konnte die Zytoplasmamembran von Ethidium-homodimer (EthD-1) passiert werden, welches sich durch Bindung an Nukleinsäuren im Zellkern anreicherte. Beide zuvor aliquotierten Indikatorsubstanzen wurden wie vom Hersteller empfohlen mit 1 ml Hank`s PBS (Gibco) auf 4 µmol/l für Calcein und 2 µmol/l für Ethidium-Dimer verdünnt.

Sowohl vor als auch nach der dreißigminütigen Inkubation unter Lichtabschluss wurden die Zellkulturen gründlich mit PBS gespült. Bei der sich direkt anschließenden Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Blaufilter im Bereich von 530 nm verwendet, so dass einfallendes Licht die beiden in die Zellen diffundierten Substanzen zur Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt wurde. So konnten die grün fluoreszierenden vitalen Zellen von den rot leuchtenden, avitalen Zellen unterschieden und ausgezählt werden.

### 2.4.3. Proliferationsdynamik der kultivierten Zellen

#### 2.4.3.1. Untersuchungen mittels Zellzählung und Zelldichtebestimmung

##### 2.4.3.1.1. Stromazellkulturen

Bei diesem Versuch wurde mittels einer Zellzählung bei fünf Stromazellkulturen die Abhängigkeit der Proliferationsaktivität von der Kulturdauer geprüft. Darüber hinaus sollte ausgeschlossen werden, dass eine abrupte Änderung des quantitativen Zellwachstums zeitlich mit weiterführenden Untersuchungen zusammenfällt und somit deren Aussagefähigkeit in Frage stellt. Daher interessierte vor allem das Proliferationsverhalten zu einem sich inmitten dieser Versuche befindlichen Zeitpunkt, also etwa dem sechsten Kulturtag.

Es wurden abhängig von der Gesamtzahl in 16 bis 24 Vertiefungen der Kulturplatte je 80.000 Stromazellen ausgestreut. Die vollständige Erneuerung des Mediums mit der wie unter 2.2.6 beschriebenen Zusammensetzung fand im Intervall von 48 h statt. Folgendermaßen wurde am

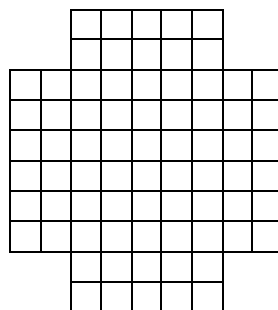
dritten, sechsten, neunten und zwölften Tag nach Einfachpassagierung die Zellzahl von vier bis sechs Wells bestimmt:

Nach Absaugen des Mediums und gründlicher Spülung mit PBS wurden die Zellen solange mit 200  $\mu$ l Trypsin bei 37°C inkubiert, bis mikroskopisch nicht nur die Abhebung der Zellen von der Unterfläche sondern auch deren Lösung aus dem Verband in Form abgerundeter Einzelzellen zu erkennen waren. Durch Zugabe von 800  $\mu$ l FCS-haltigem Medium wurde die Enzymwirkung nach 10 Minuten gestoppt. Nach Auszählung mit der Neubauer Zählkammer wurden die Werte der einzelnen Kulturansätze gemittelt. Anhand der hierbei erhaltenen Zellzahlen in Abhängigkeit von der Kulturdauer wurde ein Diagramm erstellt, welches die Interpretation der Ergebnisse aus weiterführenden Untersuchungen an Stromazellkulturen vereinfachte.

#### 2.4.3.1.2. Epithelzellkulturen

Da die epithelialen Drüsenschläuche nicht enzymatisch in Einzelzellen separiert werden konnten, wurde zur quantitativen Beurteilung der Zellproliferation wie folgt vorgegangen:

Das unten skizzierte, aus 70 Quadraten bestehende Raster wurde auf eine transparente Folie kopiert. Diese wurde vor der mikroskopischen Betrachtung unter die Kulturplatte geschoben und derart positioniert, dass das Zentrum des Rasters dem Mittelpunkt des jeweiligen Kulturansatzes entsprach. Dessen runde Fläche umfasste dadurch ca. 44 Einzelquadrate. Der Anteil der vom Zellteppich bedeckten Fläche jedes Einzelquadrates wurde abgeschätzt und einer von vier Kategorien (25%, 50%, 75% oder 100%) zugeordnet. Die prozentuale Bewachung der Gesamtfläche eines Kulturansatzes erfolgte durch Berechnung des Mittelwertes aus allen 44 Quadraten.



Diese Art der semiquantitativen Ermittlung der Zellzahl eines Kulturansatzes ging folgenden weiterführenden Untersuchungen am etablierten Zellkulturmodell voraus: der Hormonstimulation, der Thymidininkorporation und der sukzessiven Kombination beider Verfahren.

#### 2.4.3.2. Untersuchung mittels [3H]-markiertem methyl-Thymidin

Um die Ergebnisse der Zellzählung bzw. Zelldichtebestimmung zu verifizieren bzw. zu ergänzen, wurde zusätzlich die Semiquantifizierung der Proliferation mittels Thymidininkorporation durchgeführt. Das Prinzip dieser anerkannten Methode beruht auf dem Einbau radioaktiv markierter DNA-Bausteine in den Zellkern mit anschließender Messung der Radioaktivität.

In fünf Zellkulturen wurde nach drei, sechs, und zwölf Tagen Kultivierung mit regelmäßigem Mediumwechsel eine Thymidininkorporation vorgenommen. Die durch Szintillationsmessung erhaltenen Werte wurden dem Zellwachstum, das wie unter 2.4.3.1 beschrieben bei den einzelnen epithelialen und stromalen Kulturansätzen quantifiziert wurde, in der entsprechenden Relation zugeordnet.

##### 2.4.3.2.1. Thymidininkorporation

Für jeden Tag der Kultivierung, an dem ein Thymidineinbau erfolgte, wurden jeweils vier Kulturansätze von Epithel- und Stromazellen angelegt.

Unter Berücksichtigung der Strahlenschutzvorschriften wurde folgendermaßen vorgegangen: Tritium- markiertes Methyl-Thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), ein  $\beta$ -Strahler, wurde in der Konzentration 1  $\mu$ Ci/ml den vier Kulturansätzen zugegeben. Während bei drei Kulturansätzen eine zwölfstündige Inkubation bei 37°C folgte, wurde der vierte, als Negativkontrolle dienende, für denselben Zeitraum bei 4°C gelagert. Bei dieser Temperatur war die Zellproliferation stark reduziert, so dass der Messwert auf eine generelle Hintergrundaktivität zurückgeführt werden konnte und somit von den anderen subtrahiert wurde.

#### 2.4.3.2.2. Aufbereitung der Zellen

Durch Absaugen des Mediums und eine gründliche Spülung der Zellen mit PBS wurde die Hintergrundaktivität durch unspezifische Thymidinbindungen reduziert.

Die Stromazellen wurden bei Raumtemperatur für 5 min. mit 70-% igem Methanol fixiert. Nach einem Spülschritt mit PBS folgte die 5-minütige Denaturierung der zellulären Proteine mit auf 4°C gekühlte 10%-iger Trichloressigsäure (Sigma) bei einer Menge von 250 µl/Well. Nun wurde zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in jeden Kulturansatz 250 µl 1n NaOH gegeben, welches innerhalb von 20 min. zur Lyse der Zellen führte.

Beim Epithel wurde zunächst nach der ersten Spülung mit PBS in jedes Inlet 250 µl 10%-iges Trypsin (Gibco) gegeben. Nach 10-minütiger Enzymwirkung bei 37°C wurde der vom Matrigel abgelöste Zellteppich in einen Eppendorf Cup überführt. Dieser Verfahrensschritt hatte den Zweck, die weitere Bearbeitung der Epithelzellen einschließlich der Entfernung von Thymidinresten an der Grenzfläche zwischen Zellverband und Matrix zu erleichtern, ohne dadurch nennenswerte Zellverluste in Kauf nehmen zu müssen.

Nun folgte wie bei jeder weiteren Inkubation bzw. Spülung die Zentrifugation bei 2000 U/min über 5 min. und das Abpipettieren des Überstandes. Durch zweimaliges Waschen mit PBS konnten Reste des Enzyms eliminiert werden.

Auf die Zelleinsätze wurden nun je 200 µl Matrisperse (Becton Dickinson) aufgetragen, wodurch die noch verbliebenen Matrigelbeschichtungen aufgelöst und darin enthaltene Zellen frei wurden. Nach ebenfalls 10-minütiger Inkubation bei 37°C und Zufügen der Lysate zu den Zellpellets in den Cups war eine weitere Spülung mit PBS notwendig. Die Denaturierung und die Lyse der Zellen wurden entsprechend der Stromazellen durchgeführt.

#### 2.4.3.2.3. Messung der inkorporierten Radioaktivität

Die Lysate der Zellen wurden in Szintillationsröhrchen (Greiner) überführt, in welchen sich bereits 5 ml der Szintillationsflüssigkeit (Rotiszintecoplus, Roth, Karlsruhe, Deutschland) befanden. Nach 15 min. begann die Messung im  $\beta$ -Counter (bF betaszint 5000, Berthold, Bad Wildbad), wobei von jeder Probe die Radioaktivität 10 min. lang gemessen und das Resultat in Counts/min angegeben wurde.

#### 2.4.4. Dezidualisierung und Mehrfachpassagen bei Stromazellen

Bei der Kultivierung der Stromazellen interessierte vor allem die Frage, ob die Sekretion von IL-6 auf die Stromazellen selbst oder die Kontamination mit Fremdzellen zurückzuführen ist. Letztere konnten durch Mehrfachpassagen im Rahmen von Langzeitkultivierung eliminiert werden, was jedoch die Beeinträchtigung anderer Zellfunktionen mit sich bringen könnte. Diesen Einfluss und damit die eingeschränkte Aussagekraft der Zellkulturversuche auszuschließen war Ziel dieses Versuches. Es ist anzunehmen, dass die Dezidualisierung der Stromazellen als komplexer Prozess der Zelldifferenzierung einen sehr sensitiven Parameter für die intakte Zellfunktion darstellt.

Diese funktionelle Umwandlung der Zellen wurde durch die quantitative Bestimmung der damit einhergehenden Sekretion von Prolaktin und IGFBP-1 nachgewiesen. Stromazellen von vier Gewebeproben wurden 1-, 3-, 6- oder 9-fach passagiert und in einer Dichte von 100.000 Zellen/ Well ausgestreut. Es folgte die Hormonstimulation mit Progesteron (50 ng/ml) und Estradiol (0,5 ng/ml) im Rahmen eines regelmäßigen Mediumwechsels alle 48 h. An Tag 8 und Tag 20 wurden Kulturüberstände asserviert und bis zur späteren Analyse bei -70°C aufbewahrt.

Während der Prolaktin Gehalt im Labor der Klinischen Chemie, Klinikum Großhadern, mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay bestimmt wurden, erfolgte die Ermittlung des IGFBP-1 bzw. des IL-6 Gehalts anhand eines vorgefertigten ELISA-Kits (IL-6: Laboserv Diagnostica, Giessen; IGFBP-1: Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA).

#### 2.5. Steroidstimulation der Zellkulturen

##### 2.5.1. Stimulation mit 17- $\beta$ -Estradiol und Progesteron

Von 10 Gewebeproben wurden Kulturen von Stroma- und Epithelzellen zu je 10 Ansätzen angelegt und hormonell stimuliert. Nach dem Wachstum der Zellen bis zu deren Konfluenz im Kulturansatz, was drei bis vier Tage nach Ausstreueung der Fall war, wurde mit der Hormonstimulation über einen Zeitraum von vier Tagen begonnen. Zuvor wurde die Menge an Estradiol und Progesteron im fetalen Kälberserum sowie im DME Medium/HAM's F-12 durch das Labor der Klinischen Chemie des Klinikum Großhadern bestimmt:

**FCS:** Estradiol 32 pg/ml Progesteron 0.13 ng/ml  
**Medium:** Estradiol 24.9 pg/ml Progesteron 0.15 ng/ml

Zu hohe Konzentrationen hätten mit der späteren hormonellen Stimulation der Zellkulturen interferiert. Wie die ermittelten Mengen jedoch zeigten, lagen diese sowohl für DMEM/HAM's F-12 als auch für FCS im Bereich der unteren Nachweisgrenze.

Dem bis dahin verwendeten DMEM wurden 17-β-Estradiol und Progesteron in zwei verschiedenen Verdünnungen sowohl alleine als auch in Kombination beigemischt, so dass folgende Hormonkonzentrationen in den Kulturansätzen vorlagen:

17-β-Estradiol: **A** 0,27 ng/ml und **C** 2,7 ng/ml  
 Progesteron: **B** 31 ng/ml und **D** 310 ng/ml  
 Kontrolle: keine Hormone

EPITHEL	EPITHEL			STROMA	STROMA
A	C			A	C
B	D			B	D
A+B	C+D			A+B	C+D
Kontrolle	Kontrolle			Kontrolle	Kontrolle

Im Rahmen eines täglichen Mediumwechsels wurden nach Abpipettieren der Überstände, die bei -70° bis zur weiteren Verarbeitung (ELISA) gelagert wurden, die Hormone zugegeben.

### 2.5.2. Zytokinmessung in Kulturüberständen mittels ELISA

Für die Bestimmung der LIF- und IL-6-Konzentrationen in den Überständen hormonell stimulierter Zellkulturen wurden im Handel erhältlicher ELISA-Kits verwendet (LIF: Rayd D-Systems; IL-6: Laboserv Diagnostica, Giessen). Die Proben wurden vor der Durchführung entsprechend der Gebrauchsanweisung der Hersteller zentrifugiert. Die Serum- und Plasmaspiegel von IL-6 und LIF wurden gemessen, um die Kontamination des Probenmaterials mit den beiden Zytokinen aus Blutbeimengungen abschätzen zu können. (Der IL-6 bzw. LIF- Gehalt der Proben bezieht sich auf die Proteinmenge im Überstand, welche nach Lowry bestimmt wurde.)

### 2.5.3. Thymidininkorporation bei hormonell stimulierten Zellkulturen

Bei diesem Versuch wurde geprüft, welche Auswirkungen die Gabe von Steroidhormonen auf die Proliferation von Epithel- und Stromazellen unter den oben geschilderten Kulturbedingungen hat. Zellkulturen von insgesamt drei verschiedenen Gewebeproben wurden ab dem vierten Kulturtag über einen Dauer von 72 h hormonell stimuliert.

Dabei erhielten jeweils vier Kulturansätze über einen täglichen Mediumwechsel Progesteron (50 ng/ml), Estradiol (0.5 ng/ml) oder keine Hormone. Da eine Proliferationsmessung für alle unter 2.5.1 verwendeten Steroidkonzentrationen weder praktikabel noch sinnvoll erschien, wurden für diesen Versuch Konzentrationen gewählt, die zwischen den anderen lagen.

Bei der Thymidininkorporation am 7. Kulturtag diente jeweils ein Kulturansatz pro Stimulationsvariante als Negativkontrolle und inkubierte bei 4°C. Bezüglich der Aufbereitung der Zellen und des Messverfahrens wurde wie unter 2.4.3.2 erläutert vorgegangen.

## 2.6. Immunhistochemie

### 2.6.1. Zyklusdatierung der Gewebeproben

Von Gewebeproben aus 40 Hysterektomiepräparaten wurden nach deren Einbettung in Tissue-Teck (Sharp & Dohme) 10 µm dicke Schnitte mit dem Kryostatmikrotom angefertigt. Diese wurden nach der Anfärbung mit Toluidinblau (Sigma) auf zyklusabhängige histologische Merkmale nach Noyes et al., 1950, untersucht. Weiterhin wurde eine Messung der Progesteron-, Östrogen und LH-Werte aus Serumproben der Patientinnen in der klinischen Chemie veranlasst. Mit Hilfe der vorliegenden Daten aus der Zyklusanamnese, der histologischen Kriterien und der Hormonwerte wurden die Gewebeproben datiert, d.h. dem zum Zeitpunkt ihrer Entnahme vorliegenden Zyklustag zugeordnet. Zur Vereinfachung der späteren Interpretation immunhistochemischer Reihenuntersuchungen erfolgte eine Einteilung in folgende Zyklusstadien: frühe Proliferationsphase (Tag 1-5), mittlere Proliferationsphase (Tag 6-9) und späte Proliferationsphase (Tag 10-14) sowie frühe Sekretionsphase (Tag 15-19), mittlere Sekretionsphase (Tag 20-23) und späte Sekretionsphase (Tag 24-28).

## 2.6.2. Vorbehandlung der endometrialen Kryostatschnitte

Die Aufnahme der Gewebsschnitte auf mit Aminopropyl-triethoxysilane (Sigma) beschichtete Objektträger, die durch diese Vorbehandlung eine hydrophobe Oberfläche aufwiesen, vermied die großflächige Verteilung aufgetragener Flüssigkeiten und ermöglichte deren sparsame Verwendung. Die mehrstündige Lufttrocknung der Gewebsschnitte ging den folgenden Inkubationsschritten voraus. Auf diese folgte stets zweimaliges Waschen mit PBS zur Entfernung von Resten der Inkubationslösungen. An die 10-minütige Fixierung in 5°C kaltem Aceton schloss sich die Blockade der endogenen Peroxidase durch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol über 10 min. an. Bei denjenigen Schnitten, deren zytoplasmatische Antigene (Osteopontin) detektiert werden sollten, wurden durch Behandlung mit 0,3%-igem Triton-X (Sigma) in PBS die Zellmembran für die Antikörper permeabilisiert.

## 2.6.3. Durchführung der Immunhistochemie

Die verwendeten Reagentien stammten aus dem Histostain-SP-Kit (Zymed Laboratories, San Francisco, USA). Um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden, erfolgten alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer. Die Blocking Solution, eine 10-fache Verdünnung des Serums derselben Spezies wie der Sekundärantikörper, inkubierte bei 20°C für 30 Minuten. Wurden Primärantikörper der Spezies Ziege verwendet, wurden diese durch entsprechende Verdünnung von Kaninchenserum (JacksonImmunoResearch) mit 1,5%-igem BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) selbst hergestellt. Nach Abtupfen der Blocking Solution erfolgte die einstündige Inkubation mit Primärantikörpern bei Raumtemperatur. Diese mit 1,5%-igem BSA verdünnten Immunglobuline waren gegen folgende Antigene gerichtet:

Monoklonaler Anti- $\beta_3$ -Integrin-Antikörper - Maus (Takara, Shiga, Japan; 1:1000)

Monoklonaler Anti- $\alpha_v$ -Integrin-Antikörper - Maus (Chemicon 1:1000)

Monoklonaler Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper - Maus (Chemicon; 1:100)

Polyklonaler Anti-LIF-Antikörper - Kaninchen (S.L.Stewart, Cancer&Developmental Laboratory, Frederick, USA; 1:200)

Monoklonaler Anti-IL-6 Antikörper - Maus (Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA; 1:50)

Polyklonaler Anti-Osteopontin-Antikörper - Ziege (M.C. Farach-Carson, Health Science Center, Houston, Texas, USA; 1:50)



Bei den Negativkontrollen wurden die Primärantikörper gegen IL-6 sowie gegen die Integrine  $\alpha_v$  und  $\alpha_v\beta_3$  durch IgG1 der Maus (Dako, Hamburg, Deutschland) ausgetauscht. Statt Anti- $\beta_3$  fand IgG2 $\alpha$  der Maus (Dako) Verwendung und statt dem Anti-Osteopontin-Antikörper IgG der Ziege (JacksonImmunoResearch, West Grove, USA). Anstelle der Antikörper gegen LIF wurde Serum des nicht-immunisierten Kaninchens (JacksonImmunoResearch) eingesetzt. Dessen Proteinkonzentration entsprach der Verdünnung der Primärantikörper.

Die biotinierten Sekundärantikörper gegen Primärantikörper der Maus (Goat-Anti-Mouse-Antibody) bzw. des Kaninchens (Goat-Anti-Rabbit-Antibody) stammten aus den ready-to-use-Kits, während biotiniertes Immunglobulin gegen die Spezies Ziege (Dako) vor der Anwendung im Verhältnis 1:250 verdünnt wurde.

Verfahrensschritt	Substanzen	Besondere Kondition	Inkubationszeit
Vorwässern	PBS	20°C	5 min.
Fixierung	Aceton	4°C	10 min.
Spülen	PBS	20°C	5 min.
Peroxidase-Blockierung	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol	unter Lichtabschluss	10 min.
Blockierung	Blocking Solution aus 10% Normal Serum	in feuchter Kammer bei 20° C	30 min.
Primärantikörper	s. Auflistung unten	in feuchter Kammer bei 20° C	60 min.
Spülen	PBS	20°C	2x5 min.
Sekundärantikörper	s. unten	in feuchter Kammer bei 20° C	30 min.
Spülen	PBS	20°C	2x5 min.
Kopplungsreaktion	Streptavidin-Peroxidase-Komplex	in feuchter Kammer bei 20° C	10 min.
Spülen	PBS	20°C	2x5 min.
Färbung	Diaminobenzidin	unter Lichtabschluss	7-8 min.
Stoppen der Farbentwicklung	Aqua dest.	20°C	5-10 min.
Lufttrocknen		20°C	mehrere Stunden
Einbetten der Schnitte	Histomount		

Nach 30-minütiger Inkubation wurde Streptavidin- konjugierte Peroxidase aufgetragen Über einen Zeitraum von 10 Minuten konnte diese aufgrund der hohen Affinität von Biotin und Streptavidin an den Sekundärantikörper binden. Sie katalisierte die Farbreaktion, bei welcher nach Zugabe von DAB aus einem Färbekit (Zymed Laboratories) Primärantikörper bindende Strukturen der Zellen lichtmikroskopisch in einem kräftigen braunen Farbton erschienen. Nach 7-8 min. wurde dieser Vorgang durch Aqua dest. gestoppt.

Nach mehrstündiger Lufttrocknung der Schnitte folgte deren Haltbarmachung, indem nach Aufbringen eines Tropfens Histomount (Zymed Laboratories) auf den Objektträger das Deckglas möglichst luftblasenfrei aufgelegt wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Optimierung der Zellkultivierung

##### 3.1.1. Wahl der idealen Temperatur des Transportmediums

Die tägliche lichtmikroskopische Beurteilung und Dokumentation der Wachstumsdynamik der Zellkulturen führte zu folgendem Resultat:

Nach einer Kulturdauer von 24 h zeigten die bei 20° transportierten Epithelzellkulturen ein diffuses Auswachsen von etwa 5-15 Einzelzellen pro Drüsenschlauch (Abb. 3.1 und 3.2) und weitere 24 h später eine Zunahme des ursprünglichen Zellvolumens um 75%. Am vierten Tag nach Ausstreuerung lag ein Zellteppich vor, der sich über 50-60% der Kulturfläche ausbreitete (Abb. 3.3).

Bei den auf Eis transportierten Zellen waren diese Phänomene in einem deutlich geringeren Ausmaß vorhanden: etwa 5-10 epitheliale Zellen umgaben die glandulären Formationen nach einem Tag. Die Zellmasse hatte sich innerhalb von zwei Tagen nur verdoppelt und bedeckte am vierten Kulturtag 30-50% der Fläche eines Kultureinsatzes (Abb. 3.4).

Das bei 4°C transportierte endometriale Stroma zeigte 48 h nach Passage disseminierte Gruppierungen mit jeweils 10-20 spindelförmigen Zellen, welche nach insgesamt sechstägiger Kultivierung einen konfluenten Teppich bildeten. Die bei Raumtemperatur beförderten Vergleichskulturen wiesen zwei Tage nach Passagierung größere Ansammlungen von 30-40 Zellen auf und waren bereits am vierten Kulturtag konfluent (Abb. 3.5 und 3.6).

**Zusammenfassung:** Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Proliferationsverhalten in kultivierten endometrialen Zellen durch den Gewebetransport auf Eis eher nachteilig beeinflusst wird, so dass dieser für weitere Untersuchungen bei Raumtemperatur erfolgte.

##### 3.1.2. Mechanische Zerkleinerung während der Collagenaseandauung

Ob eine zweimalige gründliche Resuspension des zerkleinerten Gewebes in Medium nach jeweils 30-minütiger enzymatischer Andauung die Zahl ausstreubarer endometrialer Einzelzellen und Drüsenschläuche steigert, wurde durch Zählung mit der Neubauer Kammer überprüft. Die Zahl der epithelialen Drüsenschläuche nach der Aufbereitung von fünf

Abb. 3.1

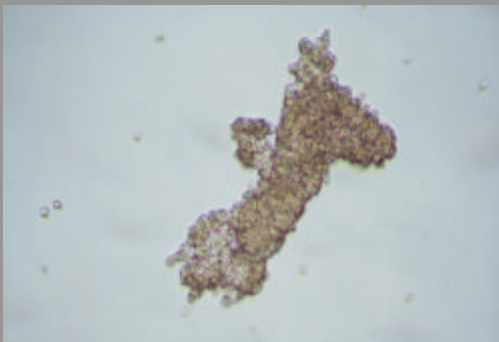


Abb. 3.2

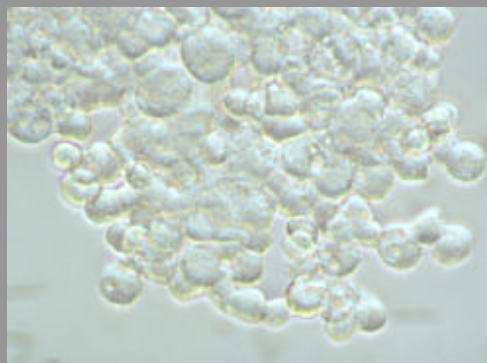


Abb. 3.3

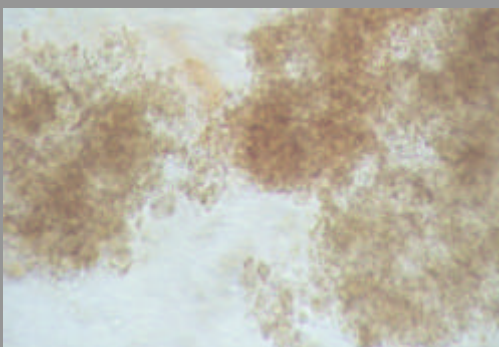


Abb. 3.4

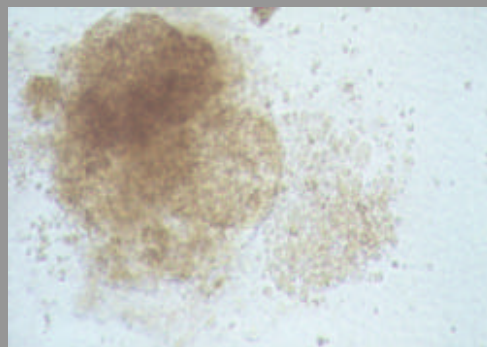


Abb. 3.5

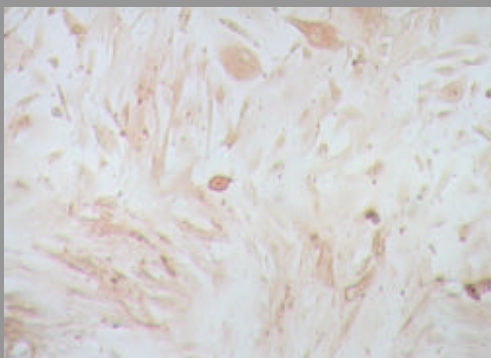
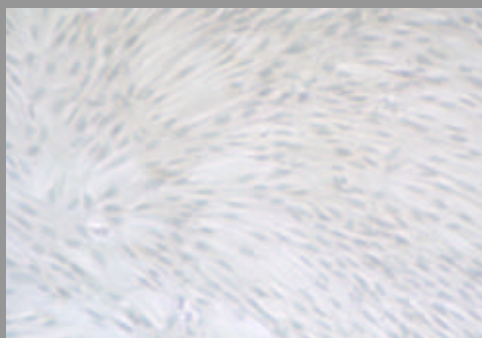


Abb. 3.6



Gewebeproben ohne Resuspension betrug im Durchschnitt 10.500/ml, wobei die Einzelwerte zwischen 5.000/ml und 25.000/ml schwankten. Der Mittelwert der Stromalen Einzelzellen lag bei 2.3 Mio/ml. Nach Resuspension, die bei acht Gewebeproben durchgeführt wurde, konnten durchschnittlich 30.000 Drüsenschläuche mit einer Abweichung der Einzelwerte bis zu 20.000 sowie 4.5 Mio Stromazellen/ml gezählt werden.

**Zusammenfassung:** Die Untersuchungen zeigen, dass durch diese Maßnahme die Ausbeute an Epithel- und Stromazellen um das 2-3-fache gesteigert werden kann, weswegen auf diesen Arbeitsschritt beim Anlegen aller weiteren Zellkulturen nicht mehr verzichtet wurde.

### 3.1.3. Wahl der optimalen Matrigelverdünnung

Matrigel wurde mit FCS-freiem Medium im Verhältnis 1:4 und 1:8 verdünnt - letztere Konzentration wird von Classen-Linke et al. (1997) verwendet. Mit den beiden Verdünnungen wurden die Nylonmembranen von jeweils zweimal fünf Kultureinsätzen beschichtet. Die aufbereiteten Epithelzellsuspensionen von zwei verschiedenen Gewebeproben wurden zu gleichen Teilen auf die Kultureinsätze mit beiden Matrigelverdünnungen verteilt und ihr Wachstum beobachtet. Die Konfluenz der Epithelzellen war nach viertägiger Kultivierung ohne Ausnahme in allen Einsätzen aus beiden Vergleichsgruppen erreicht.

Da sich die Ablösung des Zellteppichs, die für verschiedene weitere Untersuchungen erforderlich war, von der Matrix mit festerer Konsistenz als einfacher erwies, wurde die 1:4 - Verdünnung gewählt. Ein höherer Matrigelanteil gewährleistete ausserdem eine ausreichende Versorgung der Zellen mit den extrazellulären Komponenten bei den mit einer längeren Kulturdauer (7 Tage) verbundenen Untersuchungen an diesem Zellkulturmodell.

### 3.1.4. Kultivierung der Zellen mit inaktiviertem und nicht inaktiviertem FCS

#### 3.1.4.1. Proliferationsverhalten von Stromazellen

Zwischen dem Zeitpunkt der Passagierung und dem 8. Kulturtag nahm die Zahl der Stromazellen, die hitzeinaktiviertes Serum erhielten, um durchschnittlich 120% zu und

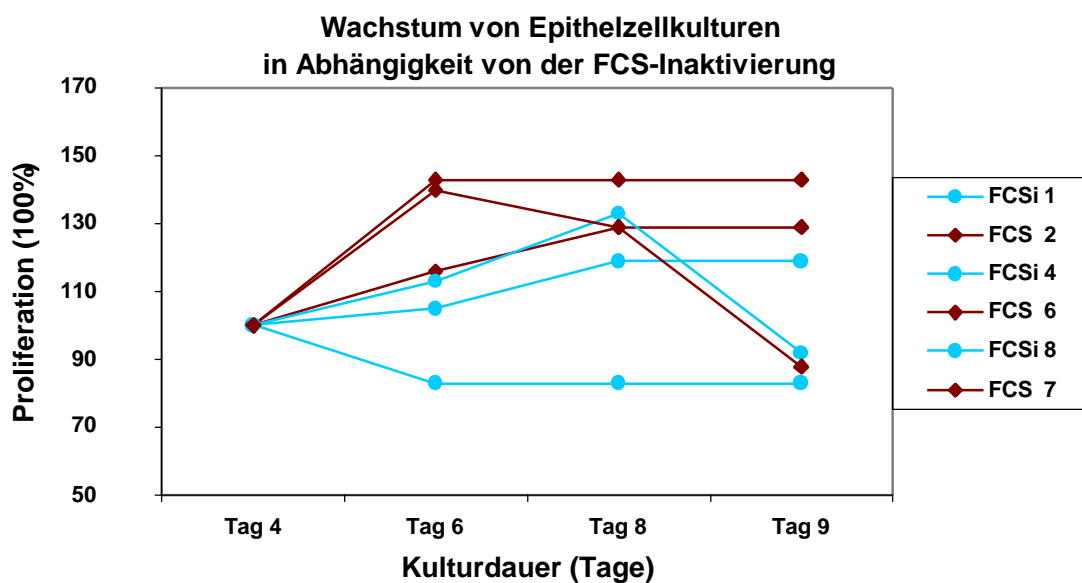
während den folgenden drei Tagen um weitere 25%. Die Zellzahl am 11. Kulturtag betrug also im Mittel ca. das 2.7-fache des Ausgangswertes.

Bei den Stromazellen, die mit nicht vorbehandeltem FCS kultiviert wurden, nahm die Zellzahl während der ersten Woche um 150% zu und stieg in den folgenden 72 h um 7% an, d.h. über die gesamte Dauer von 11 Tagen fand auch in dieser Gruppe ein Zunahme auf das 2.7-fache der anfänglichen Zellzahl statt.

Eine nach acht Tagen durchgeführte Vitalitätsprobe mit Trypanblau zeigte, dass der Anteil avitaler Stromazellen bei Gabe von hitzeinaktiviertem FCS 3.8% betrug, bei Verwendung von nicht vorbehandeltem Kälberserum 5.1%.

Der Unterschied in der Proliferation zwischen den beiden Versuchsreihen liegt noch im Rahmen der üblichen Schwankungen, welche auch bei den weiter unten angeführten Studien zum Wachstumsverhalten von Stromazellen beobachtet wurden. Eine mögliche Erklärung für das stärkere Wachstum der mit hitzeinaktiviertem FCS kultivierten Stromazellen zwischen dem 8. und 11. Kulturtag könnte die geringere Zelldichte am 8. Tag sein, wodurch mehr Raum für die weitere Proliferation geboten wird. Die Annäherung der absoluten Zellzahlen in beiden Versuchsreihen am 11. Tag mit einer Abweichung von nur noch 2.3% spricht auch für diese Vermutung. Diese Untersuchung liefert keine Hinweise dafür, dass durch die Hitzeinaktivierung des FCS das stromale Zellwachstum beeinflusst wird.

#### 3.1.4.2. Proliferationsverhalten von Epithelzellen



Zu Beginn des Versuchs (4. Kulturtag) wurde die ursprüngliche Zellzahl in jedem Kulturansatz mit einer Bewachungsdichte von 100% gleichgesetzt. Nach 48 h zeigte sich in den Kulturansätzen der Versuchsreihe, die nicht vorbehandeltes Serum erhielt, eine Zunahme der Zelldichte um durchschnittlich 31%. In der Gruppe mit Verwendung von inaktiviertem FCS wurde bei zwei Kulturansätzen ein geringeres Wachstum mit Werten zwischen 2% und 10% und im dritten Ansatz sogar ein Rückgang der Zelldichte um 18% beobachtet. Innerhalb der nächsten 48 h stagnierte bereits in jeweils einem Ansatz aus beiden Vergleichsgruppen die Zellproliferation. In den anderen beiden Kulturansätzen aus der Reihe mit hitzeinaktiviertem FCS lag der durchschnittliche Zuwachs an Zellen bei 14% und betrug in der Vergleichsgruppe 0%. Im letzten Drittel des Beobachtungszeitraumes konnte in einer weiteren Zellkultur aus jeder Gruppe ein Wachstumsstillstand festgestellt werden. In den letzten beiden Ansätzen fand jeweils ein Abfall der Bewachungsdichte um etwa 40% statt.

Der fluoreszenzcytochemische Vitalitätsnachweis bei den Epithelzellen zeigte vier Tage nach Versuchsbeginn bei beiden Gruppen einen Anteil vitaler Zellen zwischen 95% und 99%, welcher drei Tage später bei 90-95% lag. Die Hitzeinaktivierung des FCS scheint sich insofern auszuwirken, als ein über den 6. Kulturtag hinaus konstanteres Wachstum mit geringeren absoluten Zellzahlen erreicht wird. Bei der Vergleichsgruppe ohne Hitzeinaktivierung ist die Zunahme der Zelldichte zwischen dem 3. und 6. Kulturtag 4- bis 5-mal höher und stagniert anschließend.

**Zusammenfassung:** Eine deutliche proliferationssteigernde Wirkung des hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum auf endometriale Epithel- und Stromazellen konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Allerdings scheint die Vorbehandlung des FCS bei beiden Zelltypen nicht ohne Einfluss auf die Wachstumsdynamik zu sein: es wurde eine tendenziell konstantere Proliferation bis zum 11. Kulturtag bei durchgehend niedrigeren absoluten Zellzahlen beobachtet, während die deutlich steilere Wachstumskurve der Vergleichsgruppe bereits am 7. bzw. 8. Kulturtag stagniert.

Aufgrund der geringen Daten kann lediglich eine eingeschränkte Aussage gemacht werden: bei fehlendem Hinweis für einen Einfluss der Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum auf das quantitative Zellwachstum in diesen Zellkulturmodellen allenfalls geringfügig und ist im Hinblick auf deren Optimierung folglich kein entscheidendes Kriterium.

## 3.2. Charakterisierung der Epithel- und Stromazellkulturen

### 3.2.1. Immunzytochemie

Die Bestimmung des Anteils immunzytochemisch detektierter Fremdzellen erfolgte bei lichtmikroskopischer Betrachtung durch deren Auszählung in einem repräsentativen Gesichtsfeld. Da nur schwach positive Zellen ebenfalls berücksichtigt wurden, liegen die ermittelten prozentualen Werte tendentiell im hochnormalen Bereich.

Die Kontamination der Stromazellkulturen mit zytokeratinpositiven Epithelzellen liegt bei etwa 8%, während nur 3% der Zellen in Epithelkulturen durch den für Stroma spezifischen Fibroblasten-Antikörper markiert wurden. Der Anteil endothelialer Zellen betrug beim Stroma 0.5% und war beim Epithel mit 1% doppelt so hoch. In beiden Kultursystemen sind etwa 3% der Zellen LCA (leucocyte common antigen) -positive Leukozyten (Abb. 3.7 und 3.8), wobei es sich bei jedem dritten um eine CD-56-exprimierende natürliche Killerzelle handelt (Abb. 3.9 und 3.10). Die durch Anti-CD-14-Antikörper charakterisierten Makrophagen machten 10% der Leukozyten in Epithelzellkulturen (Abb. 3.11) und etwa die Hälfte aller weissen Blutkörperchen in den stromalen Kulturansätzen (Abb. 3.12) aus.

Diese Resultate erlauben zunächst eine qualitative Beurteilung der verwendeten Zellkultursysteme, insbesondere der Isolierung von Epithel- und Stromazellen. Außerdem erleichtert die Kenntnis über die Kontamination mit Fremdzellen die Interpretation der in den Kulturüberständen gemessenen ZytokinKonzentrationen.

Die vollständige Separation der beiden endometrialen Zelltypen ist bei der Aufbereitung des Gewebes selbstverständlich nicht möglich. Obwohl beim Epithel eine Primärkultur vorliegt, ist hier der Anteil an Stromazellen kleiner als der von Epithelzellen in den passagierten und somit gereinigten Stromazellkulturen. Die Erklärung hierfür könnte im Rahmen des zweiten Filtrationsschrittes zu finden sein: durch Nachspülen des Rückstandes im 40- $\mu$ m-Sieb werden zwar viele Stromazellen vom epithelialen Rückstand entfernt, zugleich passieren jedoch viele epithelialen Einzelzellen den Filter ebenfalls und heften sich in der anschließenden 48-stündigen Kultivierung der Stromazellen an der Polystyrolfläche der Kulturflasche an, so dass der Reinigungseffekt durch Passagierung abgeschwächt wird.

Die zweite Überlegung zu dieser Beobachtung bezieht sich auf die Eigenschaften des Matrigels, das speziell für die Kultivierung der Epithelzellen entwickelt wurde. Eventuell beinhaltet der fördernde Einfluss der extrazellulären Komponenten auf die Epithelzellproliferation zugleich eine Wachstumshemmung der Stromazellen.



Abb. 3.7

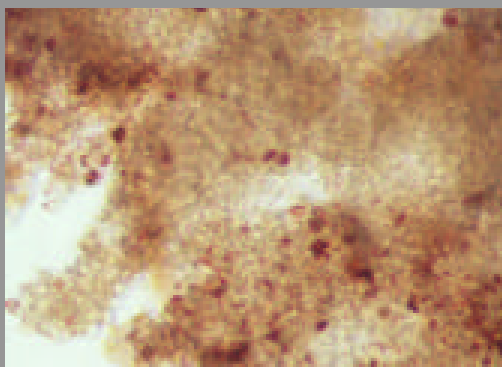


Abb. 3.8

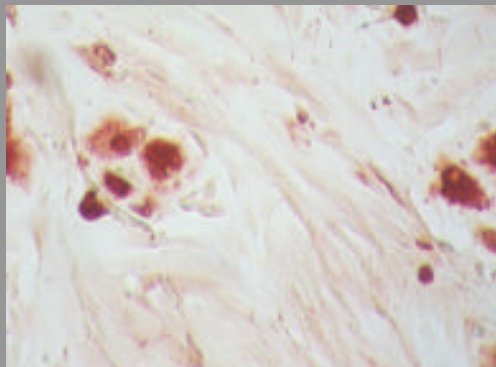


Abb. 3.9

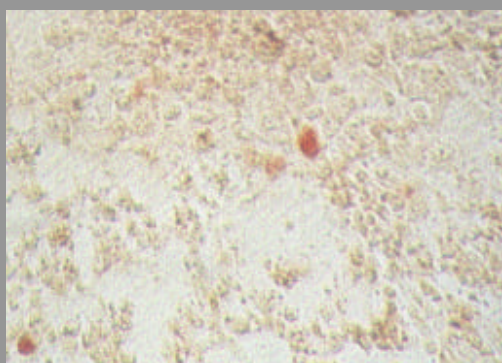


Abb. 3.10

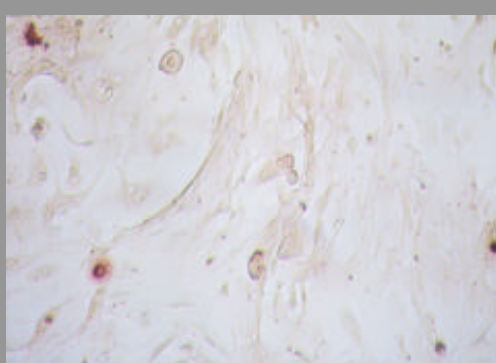


Abb. 3.11

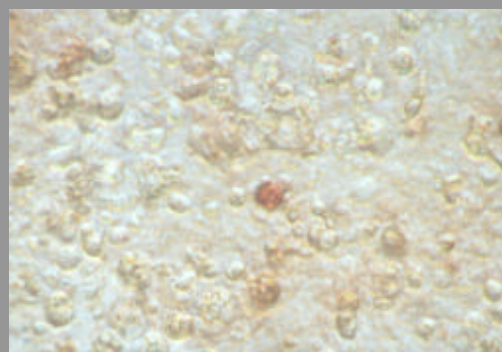
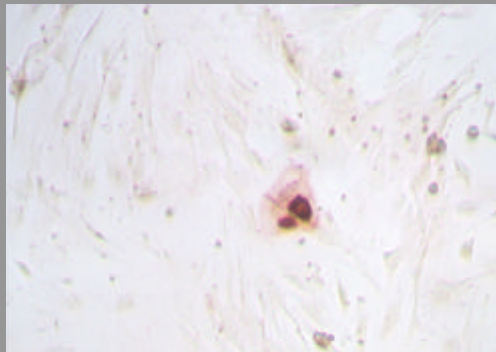


Abb. 3.12



### 3.2.2. Vitalitätsassay

Der fluoreszenzzytochemische Nachweis vitaler Epithel- und Stromazellen in den Kulturen erfolgte sechs und zwölf Tage nach Ausstreuung bzw. Passagierung. Um die in der folgenden Tabelle wiedergegebenen Zahlenwerte zu erhalten, wurden avitale, rot fluoreszierende und vitale, grünfluoreszierende Zellen in einem repräsentativen Ausschnitt des gesamten Kulturansatzes ausgezählt.

Kultur-Nr.	avitale Zellen nach 6 d		avitale Zellen nach 12 d	
	Epithel	Stroma	Epithel	Stroma
27	3-5%	1%	8%	1-2%
36	2%	1-2%	8-10%	4%
44	5-7%	1-2%	10-15%	2-3%
60	1-5%	0-1%	5-10%	4-5%
<b>Durchschnitt</b>	<b>3.75%</b>	<b>1.125%</b>	<b>9.25%</b>	<b>3.125%</b>

Nach sechstägiger Kultivierung sind 1.125% der Stromazellen avital (Abb. 3.13), nach 12 Tagen beträgt dieser Anteil mit 3.125% etwa das Dreifache. Demgegenüber steht ein Prozentsatz an avitalen Epithelzellen von 3.75% nach sechs Tagen (Abb. 3.14) bzw. von 9.25% nach 12 Tagen. Anhand der vorliegenden Werte kann gefolgert werden, dass der Anteil avitaler Zellen in Epithelkulturen sowohl nach sechs als auch nach zwölf Tagen etwa dreimal höher ist als in Stromazellkulturen.

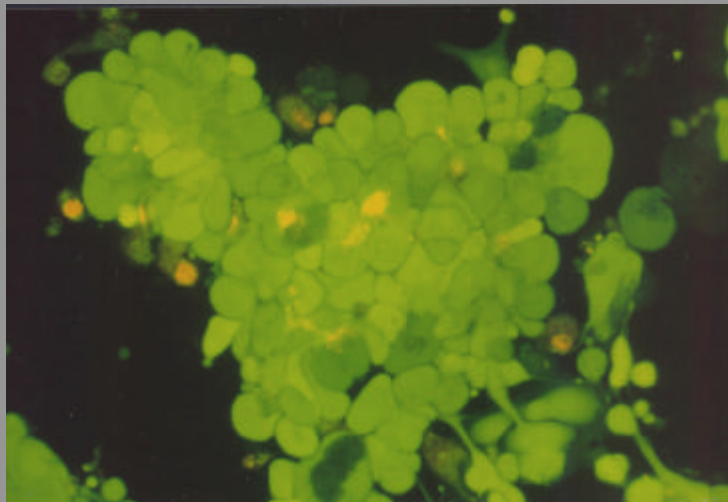
Eine Erklärung hierfür liefert die Isolierung der Epithelien aus dem Zellverband. Diese führt zwangsläufig zum Verlust interzellulärer Kontakte und zahlreicher Mediatoren, welche für die Aufrechterhaltung der Polarität und der intakten physiologischen Funktionen der Epithelzellen essentiell sind. Zwar bietet deren Kultivierung auf Matrigel gerade den entscheidenden Vorteil der basoapikalen Ausrichtung, dennoch scheint sich besonders während des anfänglichen Vorliegens einzelner Zellen und Drüsenschläuche die eingeschränkte Möglichkeit zur Zell-Zell-Interaktion bei Epithelien in Form höherer Zellverluste zu äußern. Stromazellen, die zu Beginn überwiegend als Einzelzellen vorliegen, reagieren auf den unphysiologischen Mangel an interzellulären Kontakten offensichtlich weniger sensibel.

Ein weiterer Grund könnte der Einfluss der Formation der jeweiligen Zellverbände auf deren Nährstoffversorgung sein. Der überwiegende Teil der Epithelzellen proliferiert ausgehend von

Abb. 3.13



Abb. 3.14



DrüsenSchläuchen in traubenartigen Zellverbänden. Zwar findet in dem zweikammrigen Kultursystem eine baso-apikale Zirkulation des Mediums statt, doch werden durch diese ungleichmäßigere Verteilung der Zellen im epithelialen Kulturansatz Abbauprodukte des Zellstoffwechsels vermutlich schlechter abtransportiert und andererseits erreichen die Nährstoffe des frischen Mediums die innersten Zellen eines großen Verbandes nicht in ausreichender Konzentration.

Stromazellen hingegen bilden in den Wells der polystyrolhaltigen Kulturplatten einen konfluenten ebenmäßigen Teppich. Verbrauchtes Medium wird nicht von Nischen zurückgehalten und frisches Medium erreicht alle Einzelzellen in gleichem Ausmaß.

Die dritte Überlegung bezüglich des unterschiedlich hohen Anteils an vitalen Zellen zielt auf die Kultivierung der Epithelien auf Matrigel ab. Erst diese noch junge Methodik ermöglicht es den anspruchsvollen Zellen, in einer Weise zu proliferieren, die den in-vivo Verhältnissen nahe kommt. Die extrazelluläre Substanz enthält neben Komponenten wie Laminin oder Collagenase auch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und Fibroblastenwachstumsfaktor. Im Laufe der Kultivierung werden diese Stoffe durch die Epithelzellen verbraucht, eine Erneuerung der Matrigels findet nicht statt, wodurch dieses wahrscheinlich zum begrenzenden Faktor bezüglich der Vitalität und somit der maximalen Kulturdauer wird.

Im Gegensatz dazu kann die wichtigste Nährstoffquelle der anspruchslosen Stromazellen, das DMEM/HAM's F-12, durch regelmäßigen Wechsel vollständig erneuert werden. Der Anteil avitaler Zellen steigt bei längerer Kultivierung schwächer an als in den Epithelzellkulturen.

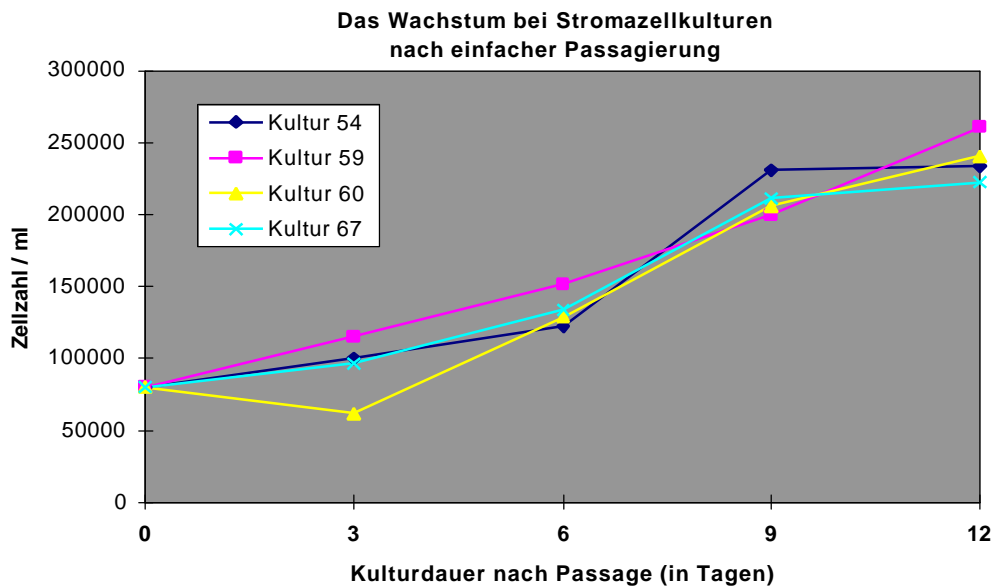
**Zusammenfassung:** Entscheidendes Resultat dieses Versuches ist die Tatsache, dass nach einer Kulturdauer von 12 Tagen mit ca. 91% für Epithel und 97% für Stroma ein ausreichend hoher Anteil vitaler Zellen vorlag. Somit eignen sich beide Zellkulturmodelle für weitere Untersuchungen, die zwischen dem 3. und 7. Kulturtag stattfinden.

### 3.2.3. Proliferationsdynamik endometrialer Zellkulturen

#### 3.2.3.1. Quantitative und semiquantitative Methodik

##### 3.2.3.1.1. Zellzählung bei stromalen Kulturen

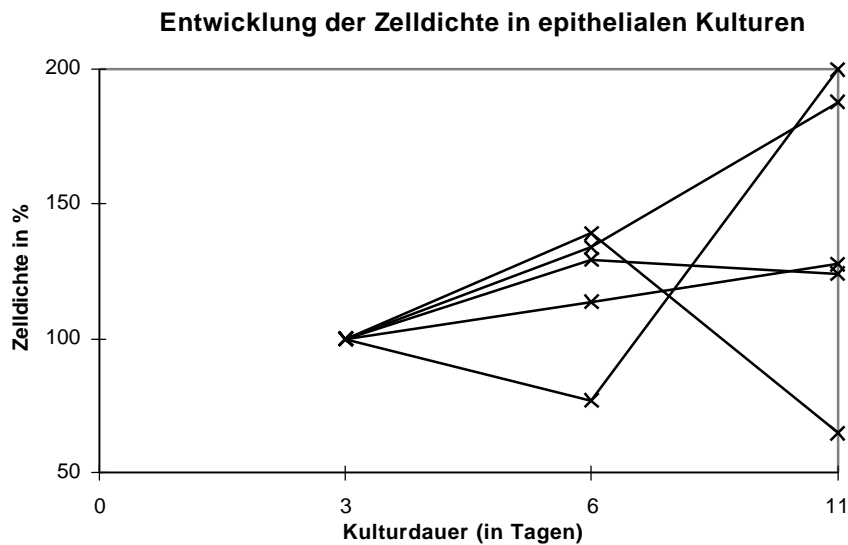
Die Bestimmung der durchschnittlichen Zellzahl pro Well am 3., 6., 9. und 12. Tag nach Passage wurden bei Stromazellkulturen von vier verschiedenen Gewebeproben durchgeführt. Die Ergebnisse werden im folgenden Diagramm veranschaulicht:



Zur Vereinfachung wird der Zeitraum von 12 Tagen in vier Phasen unterteilt. Ausgehend von 80.000 Zellen pro Well bei Ausstreung an Tag 0 lag die durchschnittliche Zunahme der Zellzahl nach drei Tagen bei 16% und nach 6 Tagen bei 52%. Die Quantifizierung am 9. Tag nach Passage ergab einen mittleren Zuwachs um 58%. In der letzten Phase der Kultivierung fand ein Wachstumsrückgang auf 14% statt. Der durchschnittliche Zellzuwachs über die gesamte Kulturdauer von 12 Tagen betrug 35%.

**Zusammenfassung:** Die Proliferation von Stromazellkulturen bis zum 12. Tag nach Passage unterliegt Schwankungen, wobei zwischen dem 3. und 9. Kulturtag die stärkste Zunahme der Zellzahl stattfand. Das weitgehend konstante Wachstum in diesem Kulturmodell ohne Hinweise für eine Stagnation war eine grundlegende Voraussetzung für die Untersuchungen zur Hormonabhängigkeit der stromalen Zytokinsekretion zwischen Tag 3 und Tag 6.

### 3.2.3.1.2. Zelldichtebestimmung bei epithelialen Kulturen



Zwischen dem 3. und 6. Tag findet man bei 80% der Kulturen eine Zunahme der Zelldichte um durchschnittlich 19%. Nach diesem Zeitpunkt hält die Proliferation mit ähnlichen Durchschnittswerten an, allerdings werden in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes stärkere Schwankungen bezüglich der Zelldichte beobachtet, die sich sowohl in einer starken Proliferationszunahme um circa 260%, als auch in einem Abfall der Zelldichte auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes äußern. Interessanterweise zeigt die Kultur mit dem stärksten Zellwachstum in der ersten Phase als einzige einen deutlichen Proliferationsabfall in der zweiten. Umgekehrt zeigt diejenige Kultur, die als einzige eine Abnahme der Zelldichte in der ersten Phase aufweist, eine Zunahme in der zweiten Phase um mehr als das 2.5-fache.

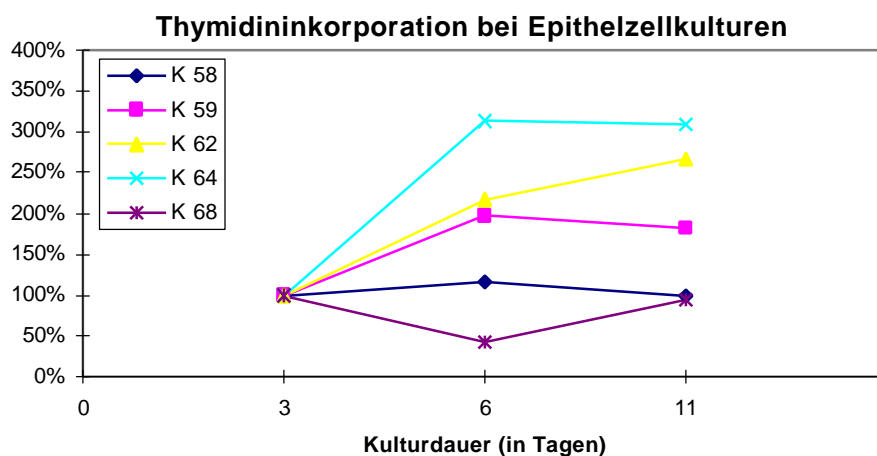
**Zusammenfassung:** In diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass bei der Kultivierung endometrialer Epithelzellen auf Matrigel Wachstumsbedingungen vorliegen, die bei der Mehrzahl der Kulturen eine Proliferation bis zum 11. Kulturtag ermöglichen. Bis zum 6. Kulturtag weichen die Werte für die Zunahme der Zelldichte nur geringfügig und erst in den folgenden fünf Tagen deutlich stärker voneinander ab.

Das Ergebnis zeigt, dass die Anforderung an das Proliferationsverhalten der Epithelzellen in diesem Kulturmodell sogar noch übertroffen wurde, da für die Aussagekraft weiterführender Versuche lediglich ein initialer Proliferationsabfall (vor Tag 7) auszuschließen war.

### 3.2.3.2. Quantifizierung mittels radioaktiv markierten methyl-Thymidin

#### 3.2.3.2.1. Thymidininkorporation bei Epithelzellkulturen

Aufgrund der ungleichmäßigen Zelldichte in den Kulturansätzen war eine Anpassung der Rohdaten an eine theoretische Zelldichte von 100% erforderlich. Der Faktor, mit dem die Messwerte multipliziert wurden, entsprach dem Quotienten aus „Bewachung von 100% : tatsächlicher Bewachung im jeweiligen Kulturansatz“. Anhand dieser Werte wurde die durchschnittliche Szintillation aller bei 37°C inkubierten Kulturansätzen berechnet. Nach Subtraktion des Betrages der Negativkontrolle lagen die definitiven Daten vor.

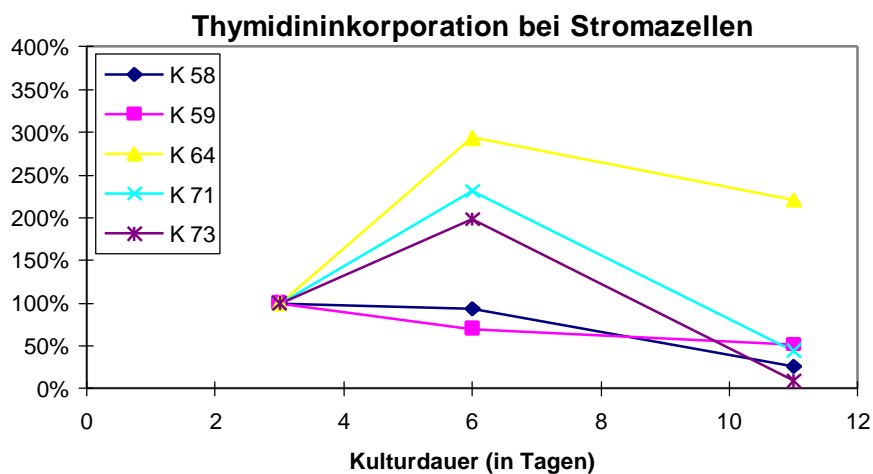


In diesem Diagramm ist die auf eine theoretische Zelldichte von 100% bezogene Szintillation in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt. Zwischen dem 3. und 6. Kulturtag nimmt die Thymidininkorporation um das 1,8-fache zu und stagniert bis zum 12. Tag auf diesem Niveau, was als gleichbleibendes Zellwachstum und nicht etwa als stagnierende Zellzahl interpretiert werden muss.

**Zusammenfassung:** Die Untersuchungen zur Steroidabhängigkeit der Zytokinsekretion finden in einer idealen Phase der Kultivierung statt, denn diesen Zeitraum kennzeichnet eine zunehmende Zellteilungsrate, was für eine ausreichende Vitalität der Epithelzellen einschließlich der StoffwechsellLeistungen spricht. Das konstante Wachstum zwischen dem 6. und 11. Kulturtag ohne Hinweise auf einen Einbruch in der Proliferationsaktivität wird nicht nur unter dem theoretischen Aspekt der fortbestehenden Aussagefähigkeit oben genannter Studien sondern als Qualitätskriterium für dieses Zellkulturmodell beurteilt.

### 3.2.3.2.2. Thymidininkorporation bei Stromazellen

Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin am 3., 6. und 12. Tag nach Passage wurde bei Kulturen von fünf verschiedenen Gewebeproben vorgenommen. Wie die Bestimmung der Zellzahl über eine Kulturdauer von 12 Tagen zeigte, bestehen zwischen den einzelnen stromalen Kulturansätzen nur geringe Schwankungen in der absoluten Zellzahl, so dass zur Berechnung der definitiven Daten die Rohdaten herangezogen werden konnten. Die Messwerte der einzelnen Ansätze wurden gemittelt und nach Abzug des Betrags der Negativkontrolle, die bei 4° C inkubierte, in folgendem Diagramm dargestellt:

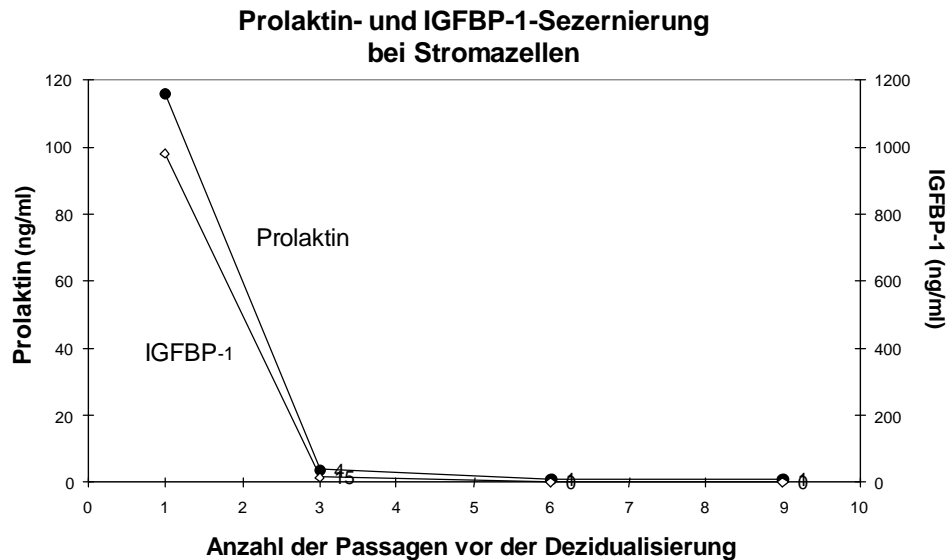


Zwischen dem 3. und 6. Kulturtag nahm gemäß diesen Versuchsergebnissen die Proliferationsaktivität der Stromazellen im Durchschnitt um das 1.7-fache zu. Zwischen Tag 6 und Tag 11 der Kultivierung fiel die durchschnittliche Thymidininkorporation wieder auf 40% des Ausgangswertes ab.

**Zusammenfassung:** Die zusätzliche Quantifizierung des stromalen Zellwachstums durch die Thymidininkorporation zeigt eine zunehmende Proliferationsaktivität der Stromazellen zwischen dem 3. und 6. Kulturtag. Mit dem Nachweis der Vitalität bzw. der günstigen Kulturbedingungen ist eine grundlegende Voraussetzung für die im selben Zeitraum durchgeführten Untersuchungen zur Zytokinexpression unter Hormonstimulation gegeben.



### 3.2.4. Dezidualisierung der Stromazellen

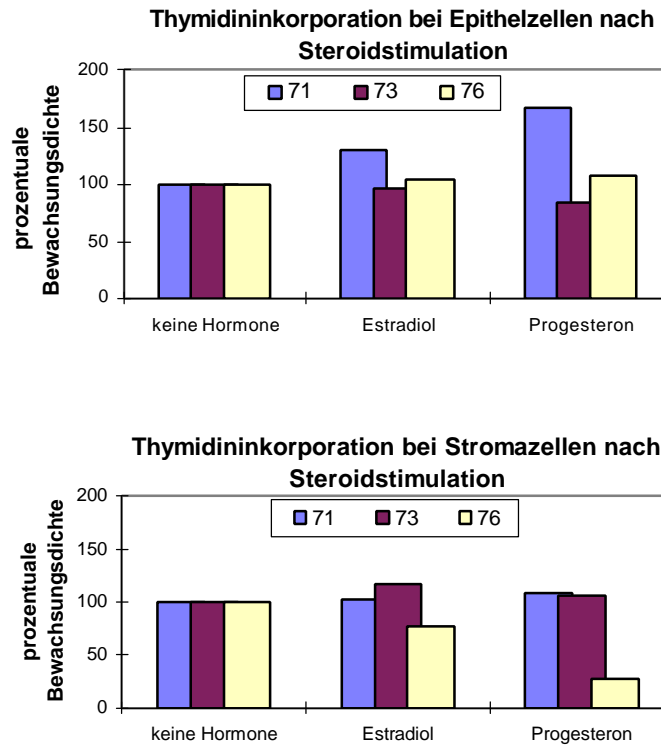


Ein sensibler Parameter für die Fähigkeit der Stromazellen, unter gleichzeitiger Estradiol- und Progesterongabe zu dezidualisieren, sind die sezernierten Mengen an Prolaktin und dem Wachstumsfaktor IGFBP-1, welche nach 8- bzw. 20-tägiger Hormonstimulation in den Überständen gemessen wurden. Die Durchschnittswerte der Kulturen von drei verschiedenen Gewebeproben wurden in obigem Diagramm dargestellt.

**Zusammenfassung:** Stromazellen verlieren nach mehrfacher Passage die Fähigkeit, infolge der simultanen Gabe von Estradiol und Progesteron zu dezidualisieren. Bereits nach dreimaliger Passage sind nur noch minimale Mengen an Prolaktin und IGFBP-1 nachzuweisen. Deren Produktion und Sezernierung ist offensichtlich nicht nur ein Effekt der Hormonstimulation, sondern von der Anwesenheit weiterer Faktoren abhängig. Einerseits könnte die mit der Herstellung einer Reinkultur einhergehende Elimination der Fremdzellen dafür verantwortlich sein. Durch den Wegfall von Interleukinen, Zytokinen und Zell-Zell-Interaktionen zwischen Stroma, Leukozyten und Epithelzellen fehlen möglicherweise entscheidende Stimuli zur Differenzierung. Auch die Vorgehensweise selbst, d.h. die wiederholte enzymatische Behandlung mit Trypsin, könnte die Stromazellen beeinträchtigen mit der Konsequenz, dass nur basale Funktionen aufrechterhalten werden, die eine Umwandlung zur Deziduazelle nicht miteinschließen. Eine höhere Anzahl (>3) an Passagen mit dem Ziel einer stromalen Reinkultur ist nach den vorliegenden Ergebnissen abzulehnen, weil dadurch eine spezifische Leistung dieses Zelltyps supprimiert wird.

### 3.2.5. Proliferationsdynamik endometrialer Zellen nach Hormonstimulation

Für die Ermittlung der Daten wurde wie unter 3.2.3.2 vorgegangen, so dass es sich bei jeder Form der Hormonstimulation um Durchschnittswerte handelt. Die Ergebnisse der nicht hormonell stimulierten Kulturansätze dienten als Referenzwerte und wurden mit 100% gleichgesetzt.

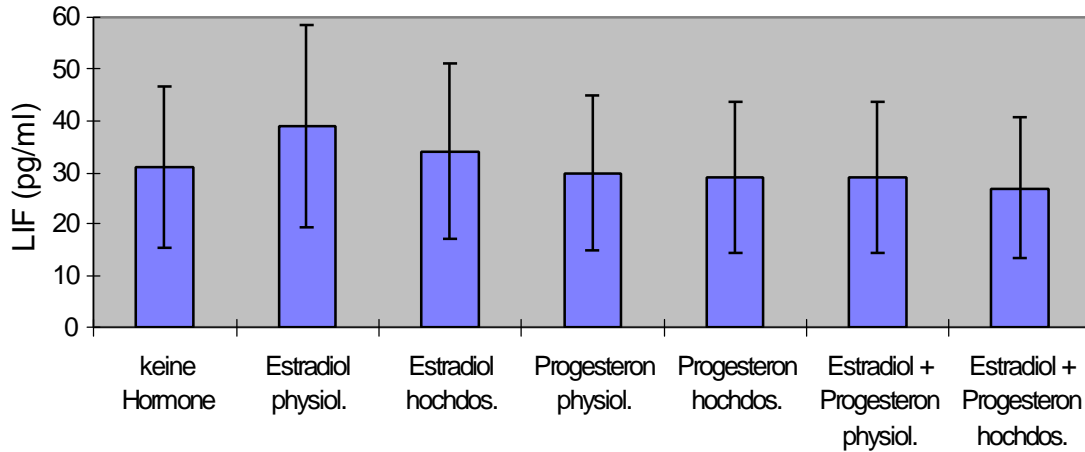


Die größte Abweichung vom Bezugswert betrug 20% und lag sowohl bei der Stimulation mit Estradiol als auch mit Progesteron vor. Unterschiede dieses Ausmaßes fanden sich auch beim Vergleich von Kulturansätzen derselben Gewebeproben, bei denen ohne eine vorherige Hormongabe die Thymidininkorporation durchgeführt wurde. Somit scheinen weder durch Progesteron noch durch Estradiol Proliferationsänderungen induziert zu werden, die stärker sind als die im Rahmen anderer Versuche beobachteten Wachstumsunterschiede.

**Zusammenfassung:** Die Steroidstimulation des Endometrium scheint auf die weitere Zellproliferation in unserem Kulturmodell keinen Einfluss zu haben, der durch den Thymidineinbau messbar wäre. Unterschiede in der endometrialen Zytokinsekretion nach Steroidgabe sind somit Folge einer hormonell bedingten Differenzierung und nicht einer Zunahme der Zellzahl im Kulturansatz.

### 3.3. Einflüsse der Steroidstimulation auf die endometriale Zytokinsekretion

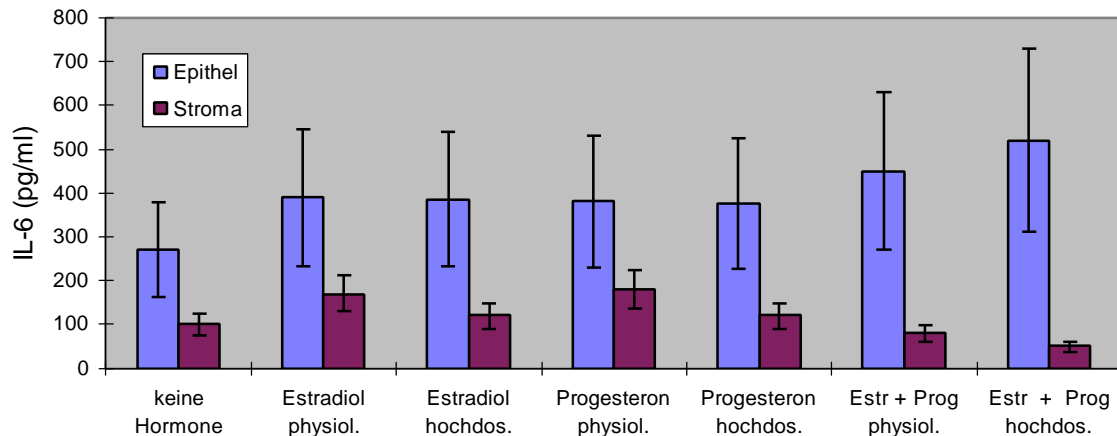
#### 3.3.1. LIF (Leukemia inhibitory factor)



Die höchsten Konzentrationen dieses Zytokins wurden in den Kulturüberständen der ausschließlich mit Estradiol stimulierten Epithelzellen gefunden. Die LIF-Sekretion betrug bei Stimulation mit Estradiol in physiologischer ( $10^{-9}$ M) und 10-fach höherer ( $10^{-8}$ ) Dosierung etwa das 1.5-fache des bei den nicht stimulierten Kontrollkulturen ermittelten Durchschnittswerts (Referenzwert). Bei allen anderen Formen der Steroidstimulation, denen die Behandlung mit Progesteron gemeinsam war, lagen die LIF-Konzentration zwischen dem 0.8- und 0.9-fachen des Referenzwertes. In den Überständen von Stromazellkulturen war LIF nicht nachweisbar.

**Zusammenfassung:** Die Analyse der LIF-Konzentration im Medium von hormonell stimulierten Epithelzellkulturen liefert Ergebnisse, wie sie nach Kenntnis der zum Östrogenprofil fast parallele verlaufenden uterinen LIF-Sekretion zu erwarten waren: es besteht eine deutliche Abhängigkeit von Estradiol, während Progesteron ohne Effekt bleibt und darüber hinaus die Estradiol-induzierte LIF-Sekretion zu inhibieren scheint.

### 3.3.2. IL-6 (Interleukin-6)

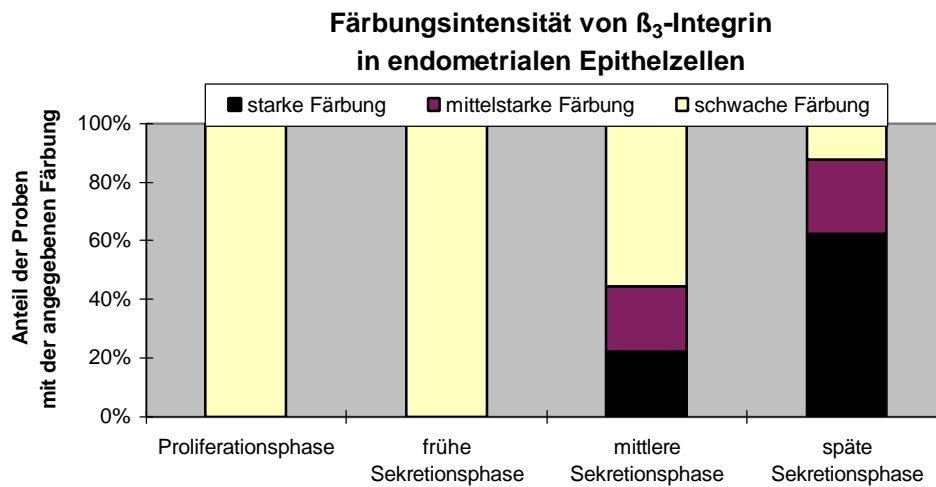


Jede Form der Hormonstimulation scheint die epitheliale IL-6-Sekretion zu stimulieren. Etwa die 1.5-fache Zytokinmenge wurden nach der Gabe von E<sub>2</sub> unabhängig von dessen Konzentration gemessen. Durch Progesteron in niedriger (10<sup>-7</sup>M) und hoher (10<sup>-6</sup>M) Dosierung konnten annähernd gleich hohe Zytokinmengen wie bei der Stimulation mit Estradiol erzielt werden. Als besonders effektiv erwies sich die kombinierte Gabe beider Steroide, die niedrigdosiert etwa die 1.7-fache und hochdosiert fast die doppelte (1.9-fache) Zytokinsekretion der Kontrollkultur bewirkten. Maximalwerte von ca. dem 1.75-fachen des Referenzwertes wurden in den Überständen von Stromazellkulturen gemessen, die mit Estradiol oder Progesteron in physiologischer Konzentration stimuliert wurden. Bei hoher Dosierung ließ sich kein signifikanter Unterschied zu nicht stimulierten Zellkulturen feststellen. Die kombinierte Steroidgabe führte unabhängig von der Dosierung zu IL-6-Konzentrationen zwischen 40% und 85%, also deutlich unterhalb des Referenzwertes. Statistische Grundlage bei der Auswertung dieser Untersuchung war der Wilcoxon signed-rank test (p<0.05).

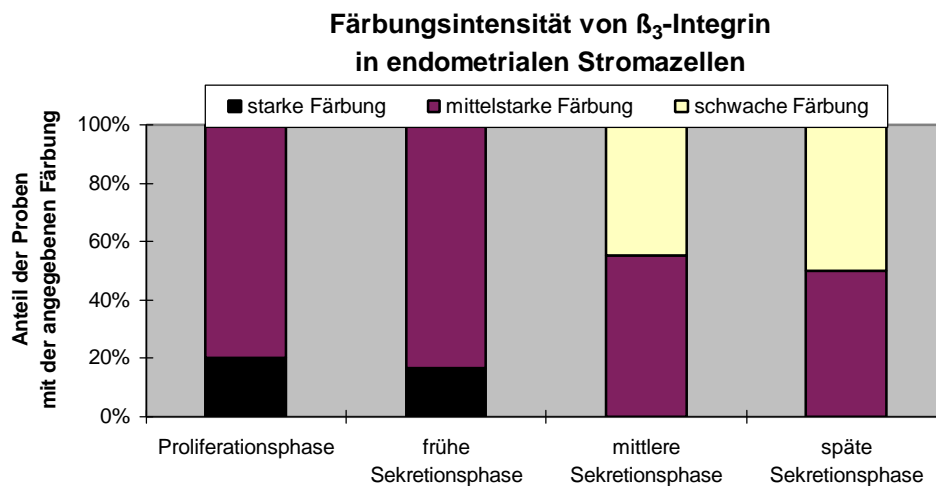
**Zusammenfassung:** Die maximale IL-6-Sekretion beim Epithelzellkulturen wird durch die gleichzeitige Stimulation mit beiden Steroidhormonen in hoher Dosierung ausgelöst. Demzufolge scheint der starke Anstieg von IL-6 in Uterussekreten aus der mittleren und späten Sekretionsphase entscheidend von den Epithelzellen getragen zu werden, da die kombinierte Steroidgabe die stromale IL-6-Sezernierung vermutlich inhibiert und höchste Zytokinmengen durch singuläre Hormonstimulation erzielt wurden.

### 3.4. Immunhistochemische Charakterisierung der Zellkulturen

#### 3.4.1. $\beta_3$ -Integrin



Alle Kryostatschnitte aus der Proliferations- und der mittleren Sekretionsphase zeigten eine schwache Färbungsintensität. In der mittleren Sekretionsphase lag der Anteil der mittelstark und stark gefärbten Proben bei 20%. Letzterer verdreifachte sich in der späten Sekretionsphase, während die Proportion derer mit moderater Intensität konstant blieb.



Das endometriale Stroma zeigte ein gegenläufiges Verhalten im Vergleich zum Epithel: Kryostatschnitte aus der Proliferationsphase sind nur stark und mittelstark gefärbt (Verhältnis 1:4). In der zweiten Zyklushälfte finden sich keine starken Färbungen mehr, hinzu kommen jedoch schwache Färbungen mit einem Anteil von 45-50%.

Abb. 3.15:  $\beta_3$ -Integrin bei endometrialem Epithel (40-fach vergr.)

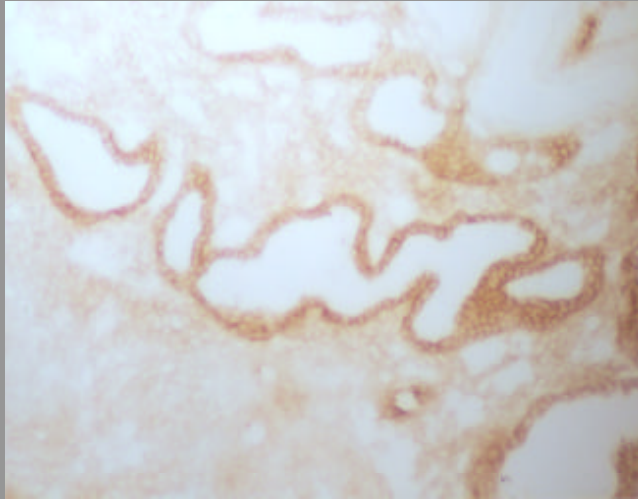


Abb. 3.16:  $\beta_3$ -Integrin bei endometrialem Epithel (100-fach vergr.)

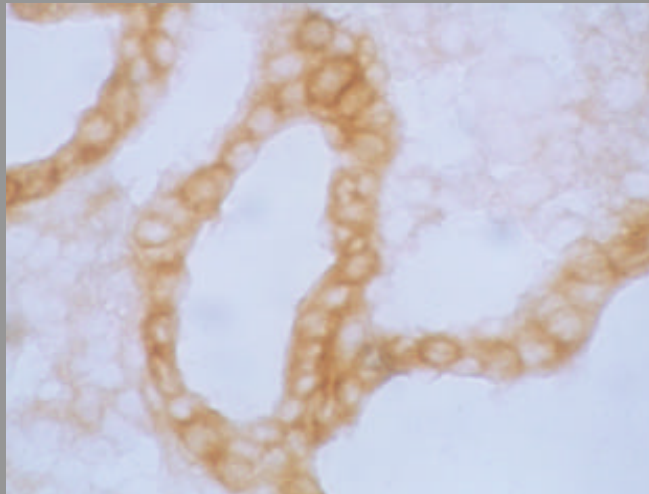
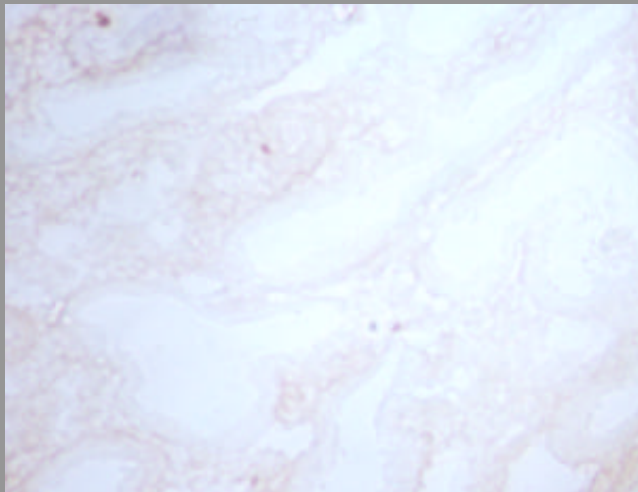
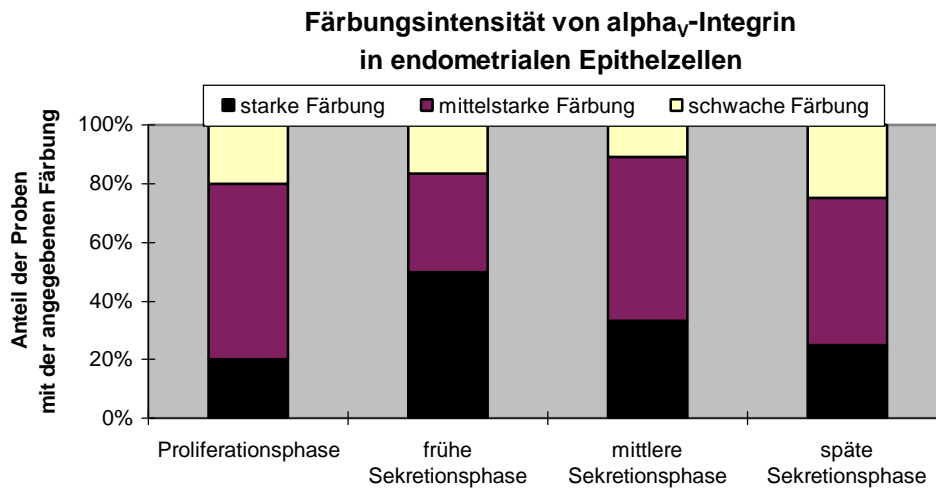


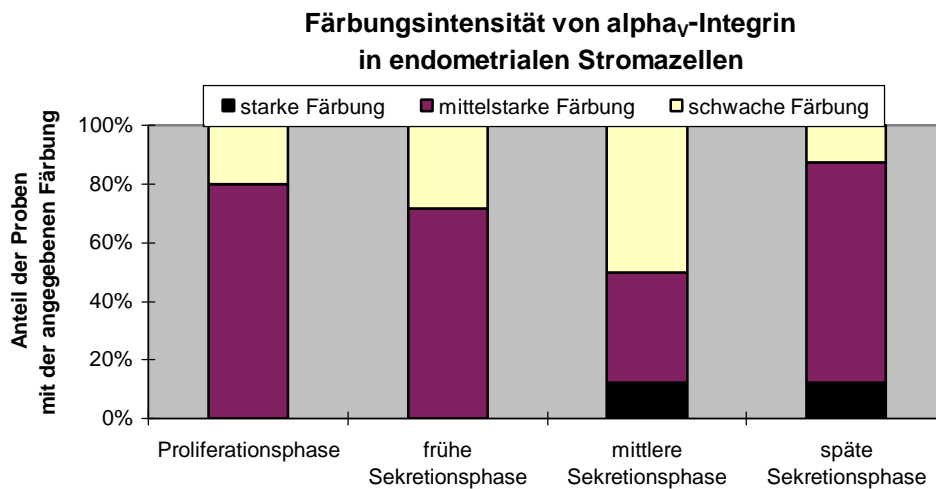
Abb. 3.17:  $\beta_3$ -Integrin bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle)



### 3.4.2. $\alpha_V$ -Integrin



Bei den Epithelzellen konnte aufgrund der immunhistochemischen Untersuchungen keine Zyklusabhängigkeit der Expression des  $\alpha_V$ -Integrins festgestellt werden. Bis auf einen hohen Anteil der stark gefärbten Proben von 50% in der frühen Sekretionsphase zeigten die Relationen der drei verschiedenen Färbungsintensitäten über den gesamten Zyklus hinweg keine nennenswerten Schwankungen.



Zwar lagen bei den Stromazellen zwischen dem 19. und 28. Zyklustag zu ca. 10% stark gefärbte Proben vor, doch fand sich in der mittleren Sekretionsphase gleichzeitig der höchsten Prozentsatz schwach gefärbter Kryostatschnitte. Dieser nahm in der sich anschließenden letzten Phase mit 15% den kleinsten Wert an, so dass eine verstärkte Expression im letzten Drittel des Menstruationszyklus diskutiert werden muss.

Abb. 3.18:  $\alpha_v$ -Integrin bei endometrialem Epithel (40-fach vergr.)

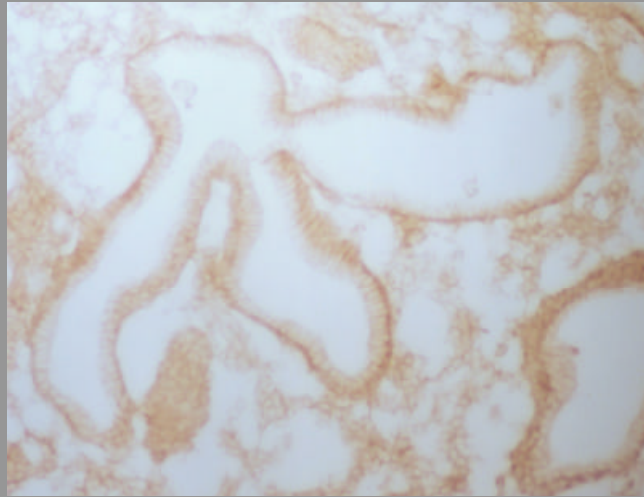


Abb. 3.19:  $\alpha_v$ -Integrin bei endometrialem Epithel (100-fach vergr.)

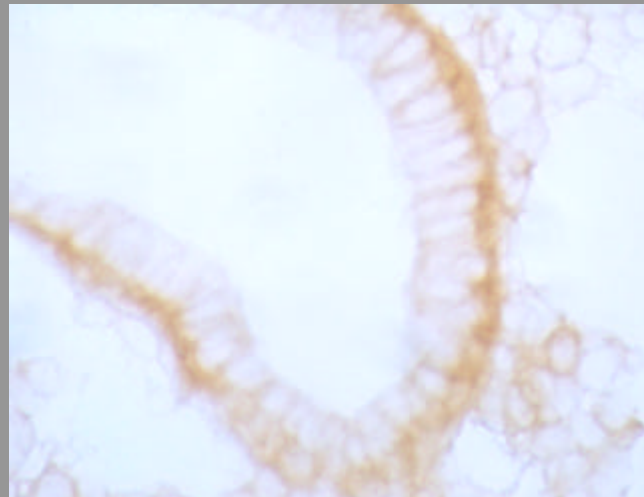
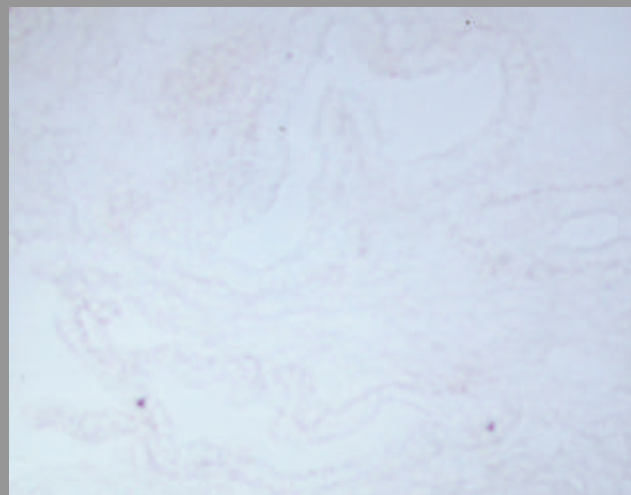
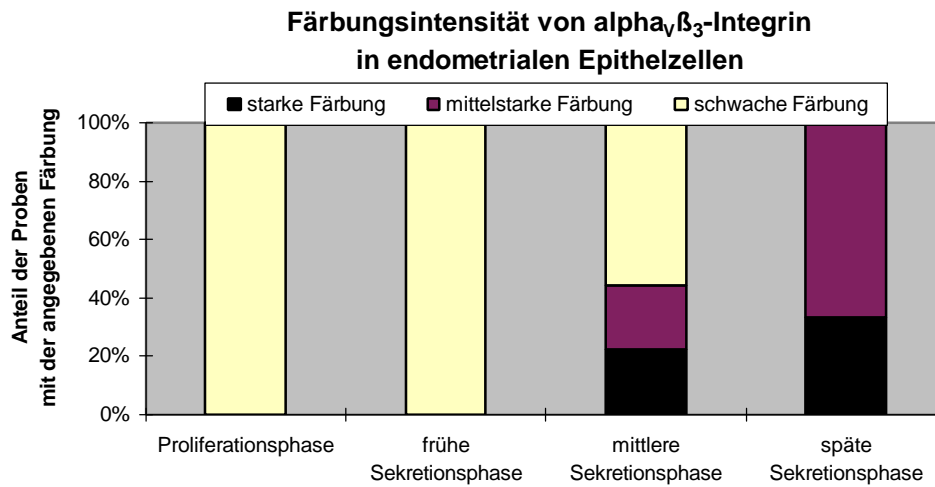


Abb. 3.20:  $\alpha_v$ -Integrin bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle)

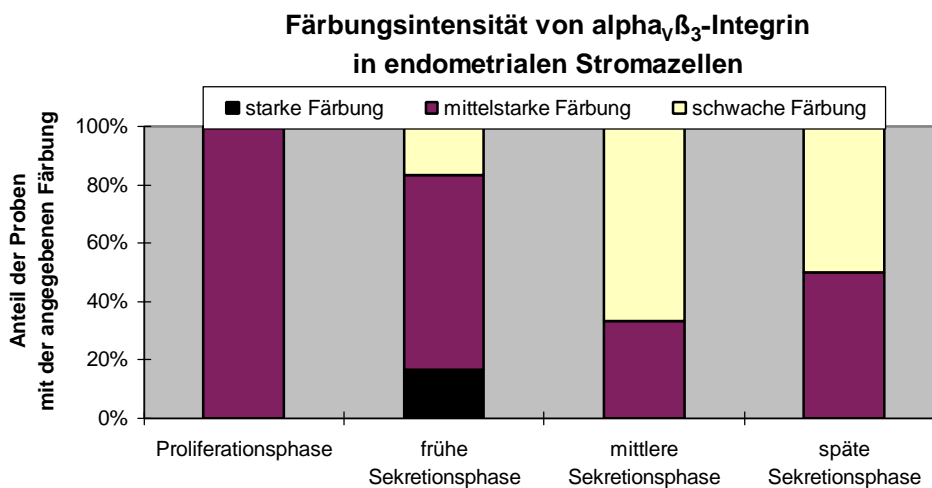




### 3.4.3. $\alpha_V \beta_3$ -Integrin



Proliferierende und frühsekretorische Epithelzellen waren ausschließlich schwach gefärbt. In der mittleren Sekretionsphase fand man bei jeweils einem Viertel der Proben mittelstarke und starke Intensitäten. Deren Anteil stieg bei den Kryostatschnitte aus der späten Sekretionsphase auf 100% mit einem Verhältnis von 2:1 zugunsten der mittelstarken Intensitäten an.



Bei den Stromazellen zeichnete sich eine umgekehrte Tendenz ab mit einem Abfall des Anteils mittelstark gefärbter Proben auf 35-45% in der mittleren und späten Sekretionsphase. Zugleich fanden sich in der mittleren Sekretionsphase die meisten schwachen Färbungen (55-65%).

Abb. 3.21:  $\alpha_v \beta_3$ -Integrin bei endometrialem Epithel (40-fach vergr.)

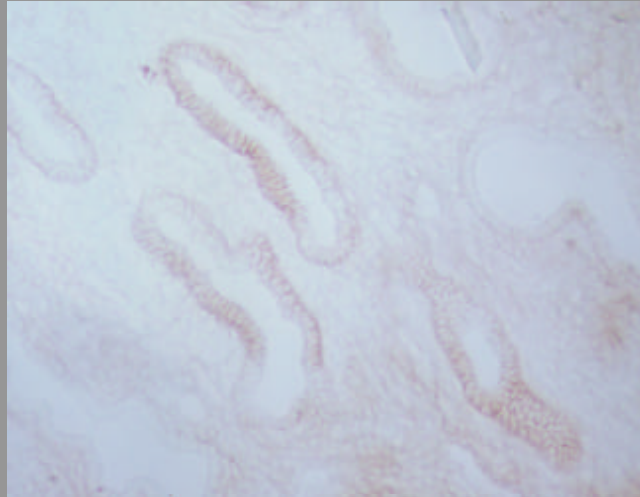
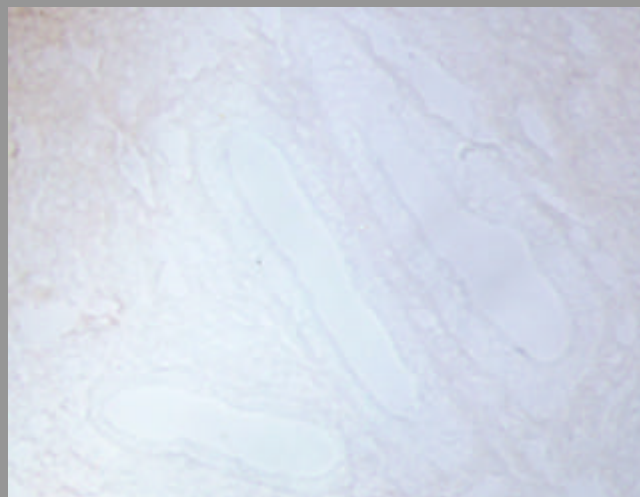


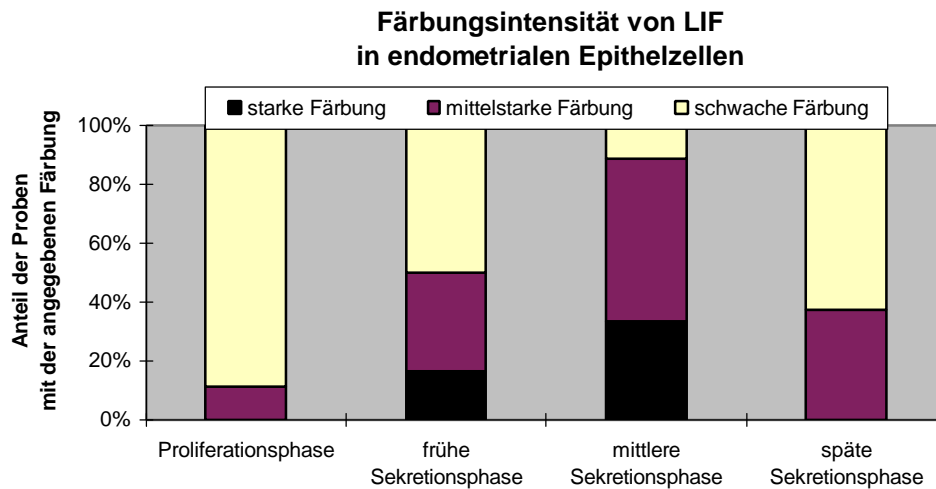
Abb. 3.22:  $\alpha_v \beta_3$ -Integrin bei endometrialem Epithel (100-fach vergr.)



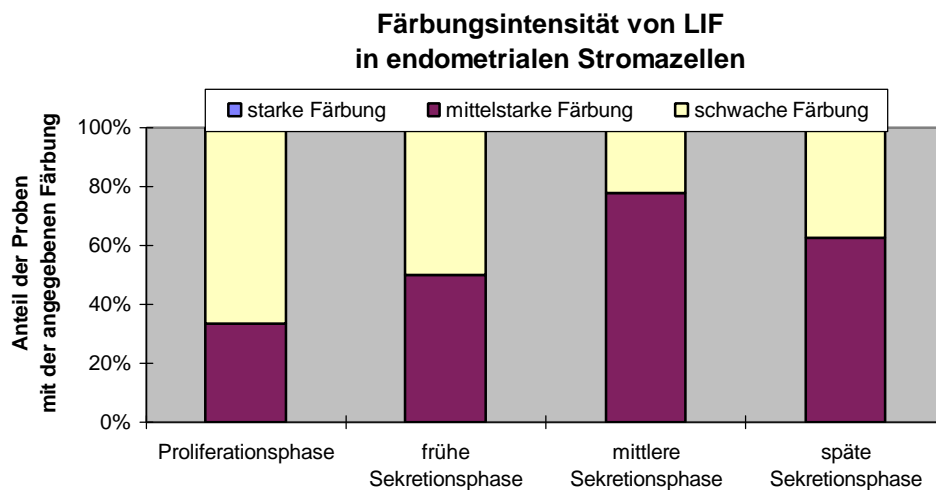
Abb. 3.23:  $\alpha_v \beta_3$ -Integrin bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle)



### 3.4.4. LIF



90% der Kryostatschnitte aus der Proliferationsphase waren schwach gefärbt. Dieser Anteil sank auf 30% in der frühen Sekretionsphase, in welcher etwa die Hälfte aller Proben eine mittelstarke Intensität zeigte. In derselben Häufigkeit fand sich diese bei Schnitten aus der mittleren Sekretionsphase, dort erreichten außerdem die stark gefärbten Proben mit einem Anteil von ca. 40% ihr Maximum. Über 60% der Gefrierschnitte aus dem letzten Viertel des Zyklus zeigten eine schwache Färbung, die verbliebenen 40% eine mäßige Intensität.



Auch bei den Stromazellen zeichnete sich, allerdings weniger ausgeprägt als bei den Epithelzellen, ein Expressionsmaximum in der mittleren Sekretionsphase ab. In dieser lag der Anteil an mäßig gefärbten Proben bei nahezu 80%. Es fanden sich in keinem Kryostatschnitt

Abb. 3.24: LIF bei endometrialem Epithel (40-fach vergr.)

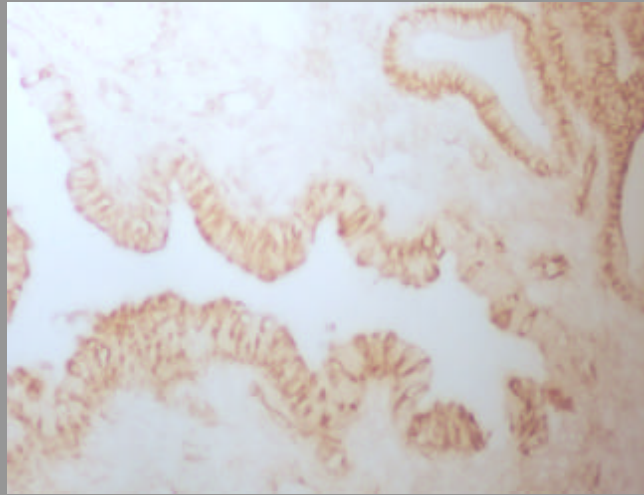


Abb. 3.25: LIF bei endometrialem Epithel (100-fach vergr.)

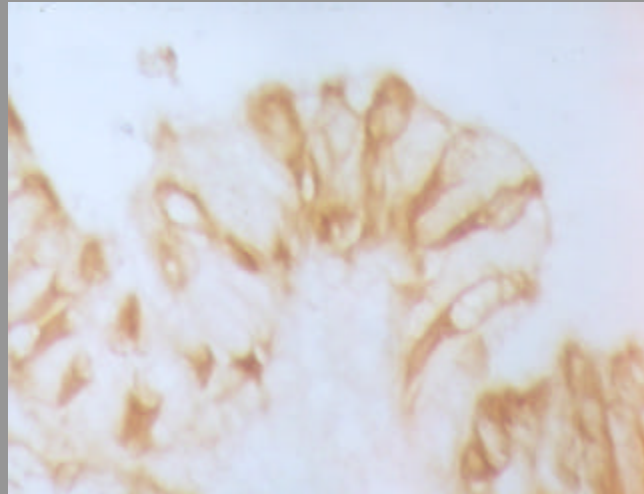
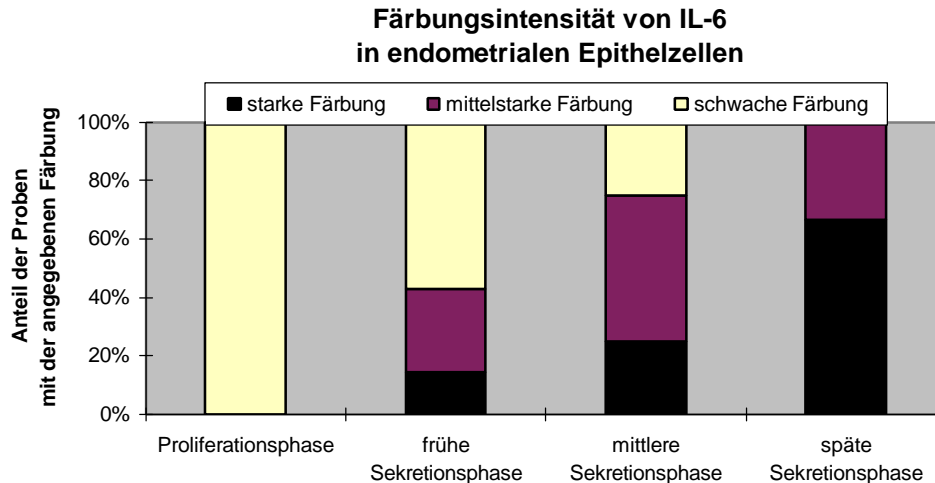


Abb. 3.26: LIF bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle)

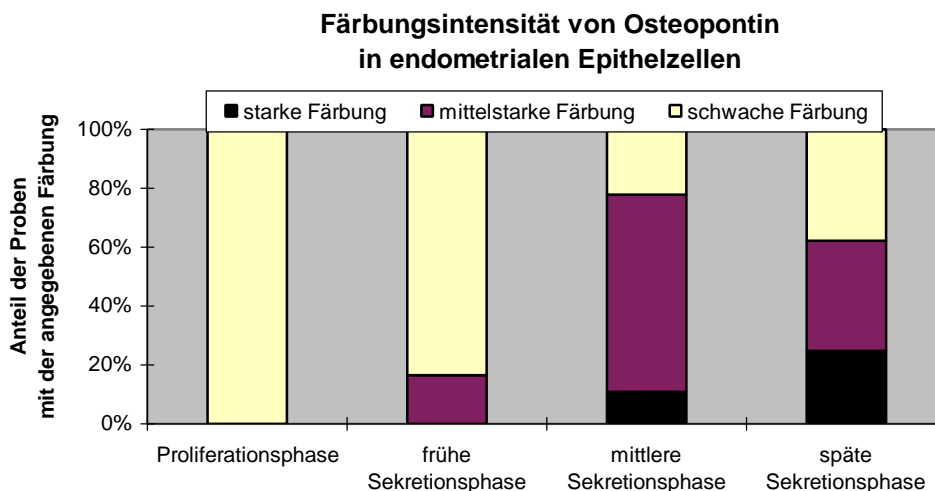


### 3.4.5. IL-6



Das proliferierende Epithel wies ausschließlich schwache Färbungsintensitäten auf. Frühsekretorisch lag der Anteil an mittelstarken Intensitäten bei 25%, jener der stark gefärbten Gewebeproben bei 15%. Mittsekretorisch waren 45% der Kryostatschnitte mäßig und etwa 25% stark gefärbt. Letztere hatten in der späten Sekretionsphase einen Anteil von fast 70%, bei den restlichen 33% war die Intensität mittelstark.

### 3.4.6. Osteopontin



Das proliferierende Epithel zeigte ausschließlich schwache Färbungen, in der frühen Sekretionsphase waren etwa 17% der Proben mäßig gefärbt. Dieser Anteil vervierfachte sich mittsekretorisch, bei 10% der Gefrierschnitte fand sich eine starke Intensität. Letztere ließ sich in der späten Sekretionsphase bei 25% der Proben nachweisen, während mäßige Färbungen bei etwa einem Drittel zu finden waren.

Abb. 3.27: IL-6 bei endometrialem Epithel (40-fach vergr.)

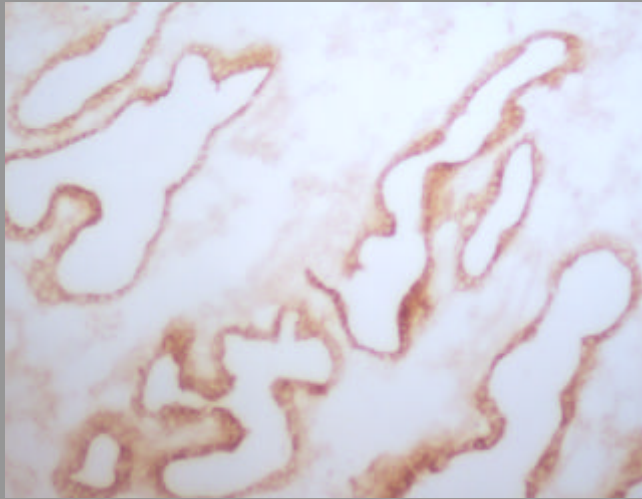


Abb. 3.28: IL-6 bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle 40-fach vergr.)

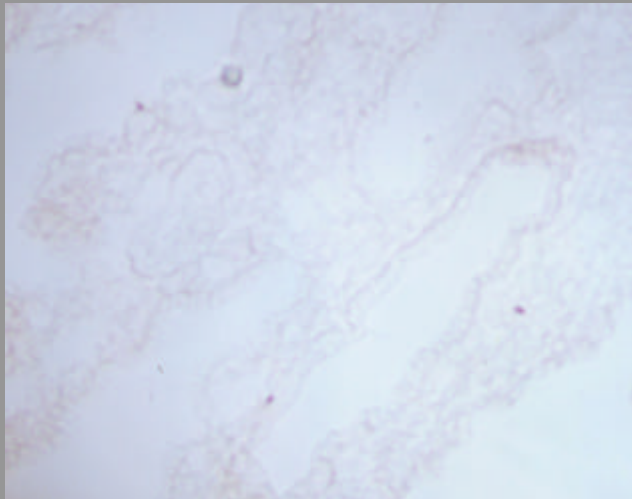


Abb. 3.29: IL-6 bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle 100-fach vergr. )

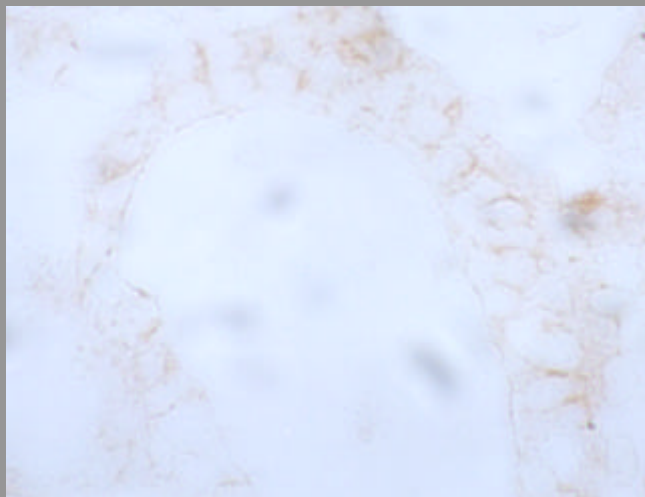


Abb. 3.30: Osteopontin bei endometrialem Epithel (40-fach vergr.)

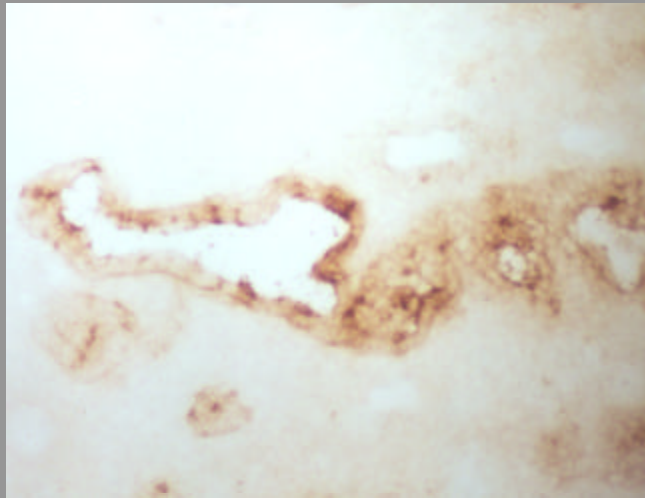


Abb. 3.31: Osteopontin bei endometrialem Epithel (100-fach vergr.)

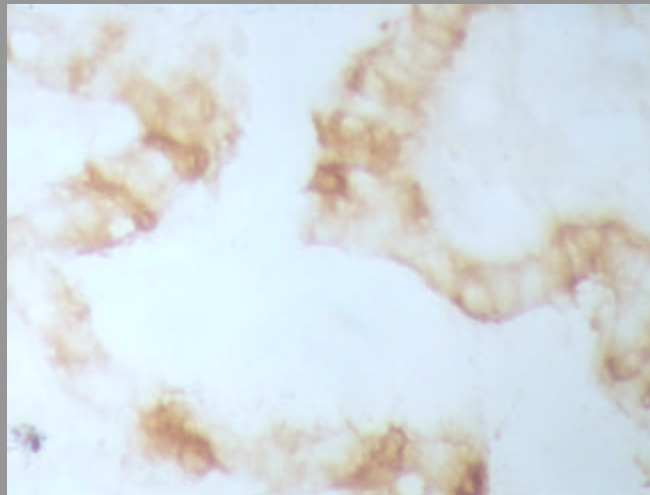


Abb. 3.32: Osteopontin bei endometrialem Epithel (Negativkontrolle)



## 4. Diskussion

### 4.1. Aspekte der ungewollten Kinderlosigkeit

Bei dem Problem des unerfüllten Kinderwunsches spielt sicher die Verschiebung der Familienplanung in einen späteren Lebensabschnitt der Frau eine große Rolle. Bei der Ursachenfindung hinsichtlich demographischer Entwicklungen müssen auch antikonceptionell wirksame Umwelteinflüsse der modernen Lebensweise berücksichtigt werden (Krebs, 1991). Interessant ist das Ergebnis einer dänischen Studie, der zufolge in den vergangenen 50 Jahren die durchschnittliche Spermiedichte im Ejakulat um 50% abnahm (Carlson et al., 1992). Man spricht von Sterilität, wenn die Konzeption ausbleibt. Bei jeweils einem Drittel der ungewollt kinderlosen Paare wird die Ursache bei einem oder beiden Partnern gleichzeitig gefunden (Lilford und Dalton, 1987). In den verbleibenden 10% der Fälle kann sie nicht erklärt werden.

In Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Ursache erhöhen verschiedene Methoden der Reproduktionsmedizin die Wahrscheinlichkeit eines Schwangerschaftseintrittes. Die Indikation für das jeweilige Verfahren ist sehr sorgfältig zu stellen, da diese nicht nur kosten- und zeitaufwendig sind, sondern auch eine psychische Belastung des Paares mit sich bringen. Führt die Konzeption nicht zur Geburt eines lebensfähigen Kindes, findet der Begriff Infertilität seine Anwendung. Frühaborte ereignen sich definitionsgemäß vor der 16. SSW und haben häufig eine genetische oder immunologische Ursache: 50% aller Spontanaborte weisen chromosomale Aberrationen des Embryos auf (Lomax et al., 2000). Störungen im mütterlichen Reproduktionstrakt, die zur zunehmenden Unterversorgung des Embryos führen, sind beispielsweise Uterusmalformationen, Zervixinsuffizienz oder Myome. Da die klinische Manifestation der Spontanaborte vom Schwangerschaftsalter abhängt, werden bezogen auf die Zahl der Geburten nur 15-20% der Aborte bemerkt.

### 4.2. Rezidivierende Frühaborte und Implantationsversagen

Bei der Anwendung extrakorporaler Befruchtungstechniken wird der Transport durch den Eileiter umgangen. Obwohl dadurch potentielle tubare Störfaktoren der Präimplantationsphase vermieden werden, liegt die durchschnittliche Schwangerschaftsrate pro Embryonentransfer bei 30% und entspricht der Wahrscheinlichkeit von 25-30% pro Zyklus, auf natürlichem Weg schwanger zu werden. Es wird daher angenommen, dass



erfolgreiche Sterilitätsbehandlungen überwiegend auf pathologische Vorgänge im Cavum uteri während der Präimplantationsphase zurückzuführen sind. Vermutlich ist eine Dysregulation der endometrialen Integrin- und Zytokinexpression die Ursache für ein rezidivierendes Implantationsversagen.

Eine erfolgreiche Implantation ist mit dem empfänglichen Zustand des Endometriums alleine noch nicht gewährleistet. Wenn von beiden Individuen ausgehende und sich gegenseitig bedingende Vorgänge ausbleiben, werden spätestens zum Zeitpunkt der Nidation die Folgen für den Embryo manifest und es kommt zum Abort. Einiges deutet darauf hin, dass in diesem Zusammenhang endokrinologische und immunologische Faktoren eine bedeutende Rolle spielen. Antiphospholipid- und andere Autoantikörper aus dem Serum von Frauen mit RSA (rezidivierenden Spontanaborten) hemmen *in vitro* die Adhäsion von Trophoblasten an Endothelzellen (Bulla et al., 1999). Das in immunologische Prozesse als Adhäsionsmolekül involvierte sICAM-1 wird von endometrialen Stromazellen hormonabhängig exprimiert. Dessen lösliche Form zeigt bei RSA-Patientinnen in der Lutealphase gegenüber dem Normalkollektiv eine reduzierte Expression (Gafurri et al., 2000).

Die Aufklärung des postulierten Implantationsversagens bei wiederholten Frühaborten wurde zu einem Schwerpunkt der aktuellen Forschungsbemühungen - eventuell liegt in diesem Bereich auch Potential für eine nebenwirkungsarme Methode der Antikonzeption.

#### 4.3. Das Modell für die Implantation der menschlichen Blastozyste

Anhand von Analogien zum Tiermodell konnten zahlreiche Rückschlüsse auf die Implantation der humanen Blastozyste gezogen werden. Es wurde die Beteiligung zahlreicher Zytokine, Integrine und Wachstumsfaktoren, die bereits aus der Immunabwehr und der Tumorbioogie bekannt sind, nachgewiesen. In Gegensatz zu diesen sich verselbstständigenden Prozessen unterliegt die Expression bei der Implantation sorgfältig abgestimmten zellulären und molekularen Regulationsmechanismen. Auch wenn in ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstanden, bleiben folgende Aspekte der Implantation bei Säugetier und Mensch unumstritten: die uterine Empfänglichkeit, das maternale Erkennen und Tolerieren der Schwangerschaft sowie die Invasivität des Keimes (Denker, 1993).

Während des Transportes durch die Tube und der Interaktion mit deren Mukosa findet die Entwicklung der Zygote zur Morula statt. Unmittelbar nach deren Eintritt in die Uterushöhle, also 72-96 h nach der Konzeption, beginnt der embryo-maternale Dialog.

Ein Kennzeichen dieser ersten Phase ist der Verlust der Zona pellucida am 5. Gestationstag und die Fusion der äußeren trophoblastären Zellschicht zu mehrkernigen Synzytotrophoblasten. Im weiteren Verlauf formiert sich die Blastozystenöhle.

Bei der Apposition nähert sich der embryonale Pol der Blastozyste (Lindenberg et al., 1986) so nahe an das endometriale Oberflächenepithel an, dass zwischen Plasmamembranen beider Individuen ein Spalt von etwa 20 nm verbleibt. Durch diese Nähe erreichen embryonale Signale das endometriale Epithel und induzieren dort die Expression von löslichen und membranständigen Faktoren, welche die Adhäsion der Blastozyste fördern. Bei diesem Attachment findet über Oberflächenproteine von Trophoblasten und apikalem endometrialen Epithel erstmals eine direkte Zell-Zell-Interaktion zwischen beiden Individuen statt. Ein submembranöses Netzwerk aus intermediären Filamenten im uterinen Epithel stabilisiert diese Verbindung (Denker, 1993). Apposition und Adhäsion als Teilprozesse der zweiten Phase der Implantation finden beim Menschen wahrscheinlich am 5.-6. postovulatorischen Tag statt (Enders, 1991; Psychoyos, 1993).

Man kennt speziesabhängig unterschiedliche Formen der Penetration, die innerhalb der nächsten 24h erfolgt und beim Menschen als invasiv bezeichnet wird (Enders, 1991). Die Interposition trophoblastärer Fortsätze zwischen die Epithelzellen führt dazu, dass Verbindungen zwischen benachbarten Epithelzellen durch sogenannte „junctions“ zwischen Epithel- und Trophoblastenmembranen ersetzt werden. Dadurch wird die Penetration der Basalmembranen unter das Oberflächenepithel und das Eindringen in das endometriale Stroma möglich (Denker, 1977 und 1993). Invasive Zytotrophoblasten interagieren mit Makromolekülen der extrazellulären Matrix wie Lamentin oder Fibronektin. Außerdem sezernieren sie Enzyme, die Matrixbestandteile auflösen und dadurch am zyklusabhängigen Gewebuntergang und Remodelling teilnehmen wie Proteasen (Graham et al., 1993) und Metalloproteinasen (Bischof et al., 2001).

Die Bildung der Plazenta beginnt 7-13 Tage nach der Ovulation mit der Arrosion endometrialer Gefäße durch synzytotrophoblastäre Anteile des Keimes, dessen Lakunen von maternalem Blut umspült werden. Aus Primärzotten entstehen zwischen dem 13. und 15. Gestationstag verzweigte Sekundärzotten und mit der Formation vaskularisierter Tertiärzotten ist die letzte Phase der Implantation abgeschlossen (Tabibzadeh und Babaknia, 1995a).

#### 4.4. Ursachenforschung auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene

##### 4.4.1. Die zyklusabhängige endometriale Differenzierung als Basis für die uterine Empfänglichkeit

Die Steroidhormone Estradiol und Progesteron koordinieren unter Vermittlung von Wachstumsfaktoren (Strowitzki et al., 1991; Cullingford und Pollard, 1994) die endometriale Expression von Proteinen, Adhäsionsmolekülen (Tabibzadeh, 1992; Denker, 1993; Lessey et al., 1992 und 1994;) und Zytokinen (Paria und Dey, 1990; Bhatt et al., 1991; De et al., 1993). Daraus resultiert die Umwandlung in ein adhäsives und somit rezeptives Oberflächenepithel (Psychoyos, 1976; Beier, 1982) am 5. bzw. 6. postovulatorischen Tag. Dies bezeichnet Denker als zellbiologisches Paradoxon, da apikale Plasmamembranen von Epithelzellen normalerweise nicht adhäsiv sind (Simons und Fuller, 1985; Glasser et al., 1991). Bei Ratten wird das durch Progesteron geprimte neutrale Endometrium durch Östrogengabe zunächst empfänglich und innerhalb der folgenden 36h refraktär (Psychoyos, 1973b und 1993). Erst nach mindestens zweitägigem Progesteronentzug wird der empfängliche Zustand erneut erreicht. Auch beim Menschen wird eine sich an das "Implantation window" zwischen dem 5. und 7. postovulatorischen Tag anschließende, refraktäre Phase vermutet (Psychoyos, 1993). Das "transfer window" im Rahmen extrakorporaler Befruchtungsverfahren variiert in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen und der Hormontherapie (Garcia et al., 1984; Martel et al., 1987).

Verschiedene strukturelle und biochemische Differenzierungsmerkmale des Epithels der mittleren Sekretionsphase sind von der Anwesenheit eines Keimes unabhängig und stellen die primäre Voraussetzung für dessen erfolgreiche Einnistung dar: Im Rahmen der 1950 von Noyes etablierten Datierung endometrialer Biopsien anhand histologischer Kriterien wird eine typische zyklus- und steroidhormonabhängige Morphologie beschrieben, zu der auch die ödematöse Veränderung des Stromas um den 21. Zyklustag als Zeichen einer prädezidualen Umwandlung gehört. Mit dem Verlust der Mikrovilli geht die Ausbildung apikaler Protrusionen des luminalen Epithels um den 20. Zyklustag (Martel et al., 1991; Psychoyos, 1993) einher. Die Formation dieser als Pinopodien bezeichneten Strukturen korreliert mit dem Anstieg des Serumprogesteron sowie der verminderten epithelialen Expression von Progesteron-Rezeptoren (Stavreus-Evers et al., 2001). Pinopodien stellen geeignete Marker für die uterine Rezeptivität dar (Nikas und Psychoyos, 1974).

Verschiedenen intermediären Filamentproteinen wird eine Bedeutung bei der Implantation zugeschrieben: über subepitheliale Anhäufungen von Vimentin (Hochfeld et al., 1990)

kommt es zum Remodelling der Basallamina (Marx et al., 1990). CK 13, ein Typ I Zytokeratin, lässt sich im luminalen Epithel der Sekretionsphase nachweisen (Olson et al., 2002). Daneben wurden die Aufhebung der Zellpolarisation sowie Veränderungen im junctionalen Komplex beobachtet (Winterhager und Kühnel, 1982). Bei Kaninchen kommt es während des "window of implantation" zum Verlust an negativ geladenen Molekülen der apikalen Zellmembran (Lampelo et al., 1985; Winterhager et al., 1994). Damit einher geht die Abnahme der Glykokalix (Anderson und Hoffmann, 1984; Anderson et al., 1986), ein von zellwandständigen Glykoproteinen gebildeter Bestandteil der apikalen Plasmamembran.

Muzine sind hochmolekulare Glykoproteine, die mit sekretorischen Epithelzellen in zahlreichen Geweben assoziiert sind und die Zelloberfläche gegen externe Noxen schützen. MUC-1 ist ein sekretorisches Produkt in den Drüsenlumina des uterinen Epithels und spielt eine wichtige Rolle in der Phase des Attachments (Aplin et al., 2001). Seine Expression ist 6-7 Tage nach dem LH-Peak maximal (Hey et al., 1994). Zwar führt die stark glykosilierte Form zu einer großen Ausdehnung und in der Folge zur sterischen Verhinderung rezeptorvermittelter Zell-Zell-Adhäsionen. Wahrscheinlich weist das Molekül jedoch spezifische Erkennungsstrukturen für das initiale Attachment der Blastozyste auf oder bildet dabei eine Brücke (Aplin et al., 1994) - im Gegensatz zu direkter Bindung über Integrine.

Auch die endozervikale Muzin-Expression ist zyklusabhängig: sie fällt mit steigendem Serumprogesteronspiegel rapide ab. Die mRNA des quantitativ dominierenden Muzin 5B zeigt einen präovulatorischen Peak, höchste Mengen des Proteins fand man mittzyklisch (Gipson, 2001). Endometriales Epithel exprimiert auch Uteroglobulin hormonabhängig und sezerniert das Protein infolge der Progesteronwirkung apikalwärts (Beier und Mootz, 1979; Beier, 2000). Das Glukose-Transporter-Protein Glut-1 ist ebenfalls ein potentieller Marker der endometrialen Differenzierung, da die Expression der mRNA in der späten Sekretionsphase ansteigt und maximale Mengen in Deziduazellen nachgewiesen wurden (Strowitzki et al., 2001). Die hormonabhängige Proteinsynthese ändert auch die epitheliale Enzymexpression (Classen-Linke et al., 1987). Früh- und mittsekretorisch werden Metalloproteinasen steroidhormonvermittelt downreguliert, um die endometriale Integrität während der Invasion und den Aufbau einer hämochorialen Plazenta zu gewährleisten (Osteen et al., 2002).

Die steroidhormonabhängige Expression der HOXA-10 mRNA nimmt mitt- und spätsekretorisch zu und ist bei Frauen mit unerklärter Infertilität vermindert, so dass eine wichtige Funktion des Genproduktes bei der Implantation und der endometrialen Dezidualisierung angenommen wird (Ma et al., 1998; Li et al., 2002).

Schließlich werden im Endometrium zyklusabhängig leukozytäre Subpopulationen rekrutiert (Blumer et al., 1991), die eine ödematöse Veränderung des Endometriums während des

„window of implantation“ hervorrufen: Mediatoren wie NO und vermutlich von Mastzellen sezerniertes IL-8 bewirken die Migration von neutrophilen Granulozyten und deren Freisetzung von Elastase im Stroma. Durch den Kollagenabbau entstehen Spalten, in welchen Hyaluronsäure Wasser intermolekular bindet (Okada et al., 2001).

#### 4.4.2. Gestationsspezifische Veränderungen des Endometriums

Bereits kurz nach der Konzeption exprimiert die Zygote Polypeptide, die der Erkennung der Schwangerschaft durch den mütterlichen Organismus dienen. Dieser reagiert auf die trophoblastäre Signalgebung mit endokrinologischen und immunologischen Veränderungen (Psychoyos 1973b, 1993), so dass bereits in der Präimplantationsphase eine Kommunikation zwischen beiden Individuen stattfindet. Deziduale und trophoblastäre Genprodukte sind wahrscheinlich durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auto- und parakrine Regulatoren der trophoblastären Invasion (Bischof et al., 2001). Den Inhibinen und Aktivinen wird eine bedeutende Rolle bei der parakrinen Regulation der endometrialen Rezeptivität, Dezidualisation und Implantation zugeschrieben (Jones et al., 2002). Dafür spricht die bei Mäusen nachgewiesene Induktion des epidermalen Wachstumsfaktor HB-EGF im luminalen Epithel vor der Adhäsion (Das et al., 1994). Die Etablierung eines komplizierten Kommunikationsnetzwerkes aus Steroidhormonen, Integrinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, einschließlich deren Rezeptoren resultiert in der Aufhebung der Barrierefunktion des luminalen Epithels gegenüber dem invasiven Trophoblasten. Die phänotypischen Veränderungen des Endometrium erinnern an die Transformation von Epithel zu Mesenchym während der Embryonalphase.

Der Verlust der Membranpolarität ist ein Effekt extrazellulärer Signale, welche Bindungen über Zelladhäsionsmoleküle und Junctionsformationen initiieren und so zur Reorganisation mit dem Ziel der Stabilisierung des Zytoskelettes führen. Zugleich kommt es zur Repositionierung von Zellorganellen und zum Aufbau neuer Austauschmuster der Plasmamembrandomänen. Dies geht nur dann mit einer verstärkten Adhäsivität des Trophoblasten einher, wenn epithelspezifische Adhäsionsmoleküle nicht mehr polar angeordnet, sondern entlang der Plasmamembran gleichmäßig verteilt sind (Thie et al., 1995). Der embryo-maternale Dialog überdauert Attachment und Invasion in der mittleren Sekretionsphase und der Fokus der Differenzierung wandert vom sekretorischen Epithel zu den Stromazellen und deren Dezidualisierung. Unter dem Einfluss des trophoblastären Hormons HCG wird die Funktion des Corpus luteum und somit die ovarielle

Hormonproduktion aufrechterhalten, was die Abstoßung der Schleimhaut in Form einer Menstruationsblutung verhindert.

Bei Wiederkäuern wurde nachgewiesen, dass das trophoblastäre Interferon- $\tau$  die Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -Expression negativ reguliert. PGF- $2\alpha$  löst beim Ausbleiben einer Konzeption eine Regression des Corpus luteum aus und soll außerdem auch die Expression nicht Schwangerschaft-assoziiertes Gene inhibieren (Godkin et al., 1996). Auch menschliche Trophoblasten produzieren Interferone (Whaley et al., 1994) und eine Beteiligung als second messengers bei der Aufrechterhaltung des Corpus luteum neben der direkten Wirkung des  $\beta$ -HCG ist ebenso denkbar wie Modulationen im maternalen Arachnoidonsäuremetabolismus während der Präimplantationsphase (Hunt und Roby, 1994).

Leptin ist ein Peptidmolekül, das die Trophoblasteninvasion reguliert und auch an der plazentaren Entwicklung und dem fetalen Wachstum beteiligt zu sein scheint (Gonzalez et al., 2000), indem es durch die Modulation der Expression von Metalloproteinasen auto- und parakrine Effekte erzielt (Castellucci et al., 2000). Im uterinen Sekret gravider Mäuse sind die Leptinlevel deutlich erhöht gegenüber dem nichtgraviden Zustand. In vitro Leptin stimuliert dosisabhängig die trophoblastäre HCG-Sekretion (Chardonnnes et al., 1999) und unterstützt die Zellteilung und die Entwicklung von Blastozysten (Kawamura et al., 2002).

Nach der erfolgreichen Invasion steht die lokale Nährstoffversorgung im Vordergrund und das Endometrium sämtlicher Spezies reagiert - ebenfalls durch unterschiedliche Mediatoren - auf die Anwesenheit der Blastozyste mit einer erhöhten Permeabilität der subepithelialen Gefäße in der Umgebung (Psychoyos, 1973b und 1993). Bei Ratten triggern trophoblastäre Signale die Expression eines Fibroblasten-stimulierenden Wachstumsfaktors in dezidualen Zellen, die in protektiver Funktion die implantierte Frucht umgeben (Carlone und Rider, 1993). Diese stromale Proliferation als Teil des uterinen Remodellings kann durch Antagonisierung des Progesteron-Rezeptors aufgehoben werden (Rider und Psychoyos, 1994).

#### 4.4.3. Die Bedeutung der Integrin-Expression .....

Die als Integrine bezeichneten Adhäsionsmoleküle beteiligen sich an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, wodurch sie zur Migration und dem Aufbau des Zytoskeletts (Huttenlocher et al., 1996) sowie der bidirektionalen Signalübertragung beitragen. Neben der Involvierung in neoplastische oder Wundheilungsprozesse spielen sie eine wichtige Rolle bei der Fortpflanzung: bereits die Fertilisation erfolgt über das  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin der Eizelle (Klentzeris et al., 1995; Sueoka et al., 1997). Integrine sind transmembranäre Glykoproteine und bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten der Gruppe  $\alpha$  (120-180kDa) und  $\beta$  (90-110kDa), deren Domäne mit dem N-terminalen Ende als Rezeptor für Komponenten der extrazellulären Matrix, Signalproteine oder andere Adhäsionsmoleküle dient (Hynes, 1987; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987; Ruoslahti 1991). Die  $\beta$ -Untereinheiten dieser Heterodimere enthalten Zysteine, die extensive intrazelluläre Disulfidbrücken bilden und für die Stabilität der Ligandenbindung sorgen. Durch die Interaktion zytoplasmatischer Proteinanteile mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts (Van Kuppevelt et al., 1989; Hemler, 1990) initiieren sie den Wechsel zwischen Migration und stationärem Zustand. Stärker als die  $\beta$ -Untereinheiten spielen die  $\alpha$ -Untereinheiten bei der Signaltransduktion eine Rolle (Chan et al., 1992). Ihr zytoplasmatischer Anteil weist typischerweise drei bis vier Wiederholungen einer divalenten Kationen-bindenden Sequenz auf, über welche die Bevorzugung der Liganden und die Dauer der Konformationsänderung reguliert werden. Durch die eingeschränkte Kombinationsmöglichkeit der Untereinheiten ist die Expression spezifischer, intakter Integrine und somit die Zellmorphologie sorgfältig kontrolliert, wobei verschiedene Stressoren diese balancierte Komposition schnell ändern können. Die Bevorzugung bestimmter Liganden hängt vom Zelltyp (Elices und Hemler, 1989; Elices et al., 1991) und der Zusammensetzung der Zellmembran ab (Conforti et al., 1994). Erst die Interaktion mit dem Integrin ändert die Tertiär- oder Quartärstruktur des Liganden und führt zur Exposition der vorher verborgenen Primär- oder Erkennungssequenz. Über jeweils drei Kontaktpunkte in den bindenden Domänen von Ligand und Integrin wird die Aktivierung des letzteren erreicht (Haas und Plow, 1994). Dies geht mit einer zytoskelettalen Reorganisation im Sinne einer Fokussierung von Integrinen an den Stellen mit maximalem Kontakt zur extrazellulären Matrix einher. Die Bindungsaffinität beruht weniger auf der Anzahl der Rezeptoren sondern auf einer von zellspezifischen Determinanten und deren Konzentration abhängigen Konformationsänderung der ligandenbindenden Domäne (Stuiver und O'Toole, 1995). Eine Modulation der Affinität ist durch proteolytische Anteile beider Bindungspartner, divalente Kationen und Lipide sowie die dynamische Signaltransduktion möglich. Regulatorische

Kofaktoren mit Repressor- oder Aktivator- Funktion interagieren mit spezifischen zytoplasmatischen Integrin-Sequenzen, deren Varianten aus alternativem Splicing resultieren (Van Kuppevelt et al., 1989).

Zum Großteil werden endometriale Integrine konstitutiv exprimiert, teilweise jedoch zyklusabhängig, wodurch sie sich als Marker für die uterine Rezeptivität eignen (Grosskinsky et al., 1996, Lessey et al., 1996). Während des "Implantation window" ist die Verteilung der Integrine auf der apolaren Plasmamembran gleichmäßiger, was eine Folge der veränderten Komplexbildung zwischen zytoplasmatischen und zytoskelettalen Proteinen ist. Ein weiterer wichtiger Aspekt der embryo-maternalen Kommunikation ist die Interaktion zwischen Epithel und Stroma über Integrine (Tabibzadeh, 1992; Lessey et al., 1996). Das endometriale Epithel exprimiert überwiegend jene Integrine, die Bestandteile der Basalmembran wie Laminin oder Kollagen binden. Glanduläre, vor allem aber luminale Zellen weisen während des Implantationsfensters eine spezifische Up- bzw. Downregulation der Integrinexpression auf (Lessey et al., 1996). Diese verändert sich mit dem Steroidhormonspiegel über noch unbekannte Mediatoren. Durch die kombinierte Gabe von Östrogen und Progesteron dezidualisiert Stroma und exprimiert die Integrine  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$ . Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des dezidualisierten Stromas nimmt in der Frühschwangerschaft ein epitheliales Muster an. Bei einer intakten Intrauterin gravidität weist das endometriale Stroma insgesamt höhere Integrin-Level auf als bei einer ektopen Schwangerschaft. Dies spricht für die Induktion der dezidualen Integrinexpression durch direkte, trophoblastäre Signale. Proliferierendes Stroma exprimiert die Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_6$  sowie  $\beta_3$  und  $\beta_4$ , letzteres ausschließlich in den Zellkernen.

Ein Beispiel für eine von der Zyklusphase abhängige Lokalisation endometrialer Integrine ist  $\alpha_4\beta_1$ , ein Fibronectin-bindendes Integrin. Es erscheint zu Beginn der frühen Sekretionsphase bis zum Ende des 3-4-tägigen Implantationsfensters im glandulären Epithel (Tabibzadeh, 1992). Außerhalb dieser kurzen Zeitspanne ist die Verteilung der  $\alpha_4$ -Untereinheit limitiert und man findet diese hauptsächlich auf vaskulärem mesenchymalem Gewebe (Bridges et al., 1994). Ein Zusammenhang zwischen Infertilität und einem Mangel an diesem Integrin liegt nahe (Klentzeris et al., 1993). In der mittleren Sekretionsphase wird außerdem der Kollagen-/Laminin-Rezeptor  $\alpha_1\beta_1$  exprimiert, allerdings nur auf glandulären Epithelzellen. Während der frühen Gestation ist die stromale Expression stärker als im nichtgraviden Zustand. Möglicherweise trägt dessen Interaktion mit dem Kollagen perizellulärer Basalmembranen des dezidualisierten Stromas zur strukturellen Unterstützung bei der Adhäsion bei. Eine defekte  $\alpha_1\beta_1$ -Synthese findet sich bei der Präeklampsie (Lessey et al., 1992). Die Koexpression von  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin ist spezifisch für invasive trophoblastäre Zellen.



Integrine der  $\beta_1$ -Klasse dienen überwiegend als Rezeptoren für Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Laminin ( $\alpha_{1-3}\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ), Kollagen ( $\alpha_{1-3}\beta_1$ ) und Fibronectin ( $\alpha_{3-5}\beta_1$ ) (Klentzeris et al., 1993). Von diesen zeigt aufgrund fehlender Expression in der mittleren Sekretionsphase nur  $\alpha_2\beta_1$  eine Zyklusabhängigkeit (Van der Linden et al., 1995). Bei allerdings fehlender Korrelation mit dem Serumhormonspiegel spielt die Regulation durch Steroidhormone offensichtlich eine untergeordnete Rolle. Die zyklusunabhängige, gleichbleibende Expression von  $\alpha_3\beta_1$ -Integrin überwiegt luminal, jene von  $\alpha_6\beta_4$ -Integrin zeigt keinen Unterschied zum glandulärem Epithel. Bei der Integrin-Expression endometrialer Stromazellen dominieren Fibronectin-Rezeptoren, wie beispielsweise das konstitutiv vorhandene  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin.

Das Expressionsmaximum von  $\alpha_v\beta_3$  im endometrialen Epithel besteht am 20. Zyklustag, allerdings mit einer leichten luminalen Verzögerung (Tabibzadeh, 1992; Lessey et al., 1992 und 1994). Elektronenmikroskopisch gelang der Nachweis in den sekretorischen Granula mit einer apikalwärts, also zu den Mikrovilli hin gerichteten Motilität. Damit gehört es zu den wenigen Integrinen, deren zeitliche und räumliche Expression so reguliert wird, dass eine Teilnahme an Zell-Zell-Adhäsionen zwischen Endometrium und Trophoblasten möglich ist. Das Integrin dient auch der Substratbindung bei stationären Zelltypen: es findet sich in vitro an Kontaktpunkten der Stromazellen, welche die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoplasma sowie der Kernmatrix verbinden. Anders als das  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin persistiert  $\alpha_v\beta_3$  bis zum Zyklusende. Ein Mangel an  $\alpha_v\beta_3$  in der Sekretionsphase ist selbst bei erfüllten histologischen Kriterien mit Lutealphaseninsuffizienz, Endometriose und Infertilität assoziiert (Lessey et al. 1992, 1994b, 1995a, 1996, Bridges et al., 1994). Bei  $\alpha_v\beta_3$ -Knock-out-Mäusen sind Fertilität und Embryogenese interessanterweise uneingeschränkt (Zheng et al., 1995). Vorangegangene immunhistochemische Analysen ergaben eine deutliche Zunahme der glandulären Expression von  $\alpha_v\beta_3$  während des „window of implantation“, wobei die Färbungsintensitäten stark mit jener von Glykokodelin korrelierten (Damario et al., 2001). Wir fanden beim proliferierenden und frühsekretorischen Epithel ausnahmslos schwache Färbeintensitäten (Kap. 3.4.1), jenes aus der mittleren Sekretionsphase zeigte zusätzlich, jenes aus der späten Sekretionsphase ausschließlich mäßige bis starke Färbeintensitäten für  $\alpha_v\beta_3$ . Die Resultate unserer Arbeit sprechen somit für eine beginnende endometriale Expression zum Zeitpunkt des embryonalen Attachments. Das endometriale Stroma wies ein gegenteiliges Färbeverhalten auf: der Anteil an mäßig und stark gefärbten Proben war am höchsten bei Kryostatschnitten aus der Proliferations- und frühen Sekretionsphase. In bisherigen Untersuchungen ließ sich die  $\alpha_v$ -Untereinheit im proliferierenden Epithel nicht nachweisen, sondern erst postovulatorisch

(Lessey et al., 1992). Die Stimulation mit humanem Gonadotropin führt zu einer verminderten glandulären Expression der aus der  $\alpha_v$ -Untereinheit bestehenden Integrine  $\alpha_v\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_4$ , beim Vitronektin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  außerdem im luminalen Epithel (Thomas et al., 2002). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist die endometriale  $\alpha_v$ -Expression (Kap. 3.4.2) während des gesamten Zyklus heterogen, es fand sich allerdings beim Epithel aus der frühen Sekretionsphase ein Maximum des Anteils an starken Färbungsintensitäten, welche bei endometrialem Stroma erst ab dem 22. Zyklustag beobachtet wurden.

Vorangegangene immunhistochemische Analysen ergaben eine abrupte Zunahme der Expression der  $\beta_3$ -Untereinheit bei endometrialem Epithel der mittleren Sekretionsphase (Lessey et al., 1992 und 1994). Die  $\beta_3$ -Untereinheit wurde nicht nur bei menschlichen Embryonen (Campbell et al., 1995) und Trophoblasten (Daiter et al., 1996) sondern auch bei Embryonen der Maus während der Periimplantationsphase (Sutherland et al., 1993) nachgewiesen. Bei Frauen mit ungeklärter Infertilität fand man eine erniedrigte  $\beta_3$ -Expression im endometrialen Epithel (Lessey et al., 1995). Wir stellten fest, dass die epitheliale Expression der  $\beta_3$ -Untereinheit während des Menstruationszyklus (Kap. 3.4.1) weitgehend jener von  $\alpha_v\beta_3$  entspricht, denn alle Proben aus der Proliferations- und frühen Sekretionsphase färbten sich schwach, jene aus der mittleren bis späten Sekretionsphase zusätzlich mäßig bis stark an. Endometriales Stroma zeigte ein Expressionsmaximum von  $\beta_3$  in der Proliferationsphase und eine kontinuierliche Abnahme bis zum Zyklusende hin (Abb. 3.7.1.2). Die Expression des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins stimuliert der Wachstumsfaktor EGF oder HB (heparin-binding-) EGF - vermutlich über parakrine Mechanismen (Lessey, 2002). Die oben bereits erwähnte Abhängigkeit der Integrinfunktion von verschiedenen Co-Faktoren äußert sich im Falle von  $\alpha_v\beta_3$  in der Präsenz von Liganden, die eine Sequenz aus den Aminosäuren Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) besitzen. Osteopontin, ein saures Glykoprotein der extrazellulären Matrix, interagiert über RGD (Oldberg et al., 1986) mit Integrinen der  $\alpha_v$ -Gruppe und bindet an die luminale Epitheloberfläche.  $\alpha_v\beta_3$ -exprimierende Zellen zeigen eine verstärkte Migration zum Osteopontin-Gradienten (Liaw et al., 1995; Senger et al., 1996). Als adhäsives und chemotaktisches Molekül vermittelt Osteopontin die Zellmigration, Adhäsion und Biomineralisation in verschiedenen anderen Geweben wie Knochen (Butler et al., 1989, Flores et al., 1992; Zimolo et al., 1994), Nieren, Trophoblasten und Plazenta (Young et al., 1989; Brown et al., 1992; Daiter et al., 1996; Omigbodun et al., 1997). Die Expression wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone reguliert (Craig et al., 1991) und ist im Endometrium differenzierungs- und gestationsabhängig (Waterhouse et al., 1992). Im Östrogen-geprägten endometrialen Epithel wird sie durch Progesteron direkt hochreguliert. Beginnend in der frühen Sekretionsphase dauert die Expression vom 20. bis zum 25.

Zyklustag fort. Die mRNA von Osteopontin findet sich in menschlichen Trophoblasten bereits ab dem ersten Trimenon. Das Protein wird allerdings ausschließlich von Zytotrophoblasten exprimiert, während die Synzytotrophoblasten nur das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aufweisen (Daiter et al., 1996). Die Bindung trophoblastärer Integrine an RGD-enthaltende Liganden wird durch RGD-enthaltende Peptide blockiert (Amant et al., 1996). Osteopontin scheint als molekulare Brücke zwischen den endometrialen Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$  und dem Trophoblasten zu fungieren, was einerseits der embryonalen Adhäsion dient (Brown et al., 1992; Liaw et al., 1995). Andererseits unterstützt diese Bindung die trophoblastäre Migration und Invasion sowie die Formation der Chorionzotten und die strukturelle Integrität der Plazenta. Die T-Zell-Aktivierung und das Anlocken von Makrophagen durch Osteopontin sowie dessen Regulation durch Zytokine wie TGF- $\beta$ , LIF und Interleukine (Guilbert et al., 1993) weisen außerdem auf entscheidende funktionelle Aufgaben von Osteopontin bei der plazentaren Immunantwort und dem embryo-maternalen Dialog hin. Wir konnten erst im mittelsekretorischen Epithel eine schwache Färbeintensität feststellen, welche ihr Maximum mit Beginn der späten Sekretionsphase erreichte. Es lag generell ein sehr inhomogenes Färbeverhalten vor: im Epithel desselben Kryostatschnitts fanden sich gleichzeitig nicht und stark gefärbte Drüsen, innerhalb der Drüsen nicht und stark gefärbte Zellen. Nebenbei fiel eine intensivere Färbung einzelner Leukozyten im sekretorischen Epithel auf. Stroma zeigte unabhängig von der Zyklusphase keine Reaktivität gegenüber Osteopontin (Kap. 3.4.6).

Die Resultate unserer immunhistochemischen Reihenuntersuchungen verdeutlichten noch einmal die bereits beschriebene zyklusabhängige Expression von  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\beta_3$  und Osteopontin. Aufgrund des simultanen Expressionsmaximum zum Zeitpunkt der Implantation und der Tatsache, dass die embryo-endometriale Interaktion durch Adhäsion und Migration gekennzeichnet ist, wird eine wichtige Funktion von Osteopontin und dem  $\beta_3$ -Integrin bei der Implantation angenommen. Wegen ihrer stabilitätsfördernden Wirkung scheint die  $\beta_3$ -Untereinheit eine besonders wichtige Rolle während des Attachments zu spielen. Die Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit bereits vorgehenden bestätigte außerdem, dass das für Zellkulturen verwendete Endometrium eine zyklus- und hormonabhängige Differenzierung aufwies.

#### 4.4.4. ....und der Zytokin- Expression bei der Blastozystenimplantation

Die endometriale Expression der Zytokine als eine Art "second messenger" wird ebenfalls sorgfältig reguliert. Entscheidend für die Zytokinwirkung sind sowohl die Konzentration als auch die Affinität zum Rezeptor. Dieser liegt in membrangebundener oder löslicher Form vor (Arai K-i et al., 1990) - letztere findet man vor allem bei den in inflammatorische Prozesse involvierten Zytokinen. Eine gesteigerte Rezeptoraffinität kann als natürlicher Schutz vor einer exzessiven Expression dieser Polypeptide mit konsekutiver Apoptose und Zytolyse dienen. Die Wirkung in bereits picomolarer Dosierung verdeutlicht die Relevanz dieser Balance. Stimulierte T-Zellen und Makrophagen, sind die wichtigsten Produzenten von Zytokinen, welche auf die Leukozyten wiederum stimulatorisch und chemotaktisch wirken und deren Lokalisation im Gewebe beeinflussen (Haimovici et al., 1991). Die „natural-like killer cells“ bilden eine Population großer granulärer Lymphocyten, die potente Zytokine wie TNF, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  produzieren (Johnson, 1994). Im uterinen Epithel der Maus fand man hohe Spiegel an CSF (Pollard, 1990; Robertson et al., 1992), IL-6 (Robertson et al., 1992) und TNF- $\alpha$  (Hunt, 1993). Die Expression dieser inflammatorischen Zytokine wird unter anderem hormonabhängig reguliert. Progesteron alleine hat generell einen inhibitorischen Effekt. Die GM-CSF-Synthese erfolgt bei Estradiol-stimulierten Epithelzellen (Robertson et al., 1992), während CSF-1 und TNF durch die Kombination von Östradiol und Progesteron induziert werden. Für TNF gilt dies auch im humanen Endometrium. Dies erklärt, warum die durch GM-CSF, CSF-1 und TNF chemotaktisch angelockten Makrophagen als größte Leukozytenpopulation im Endometrium der Maus (Hunt und Pollard, 1992) ihr Maximum 24 h nach dem Estradiol-Peak im Serum erreichen. Zytokine beeinflussen auf unterschiedliche Weise die endometriale Integrinexpression. Gestationsspezifische Mediatoren wie EGF, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  führen zu einer verstärkten stromalen Expression von  $\alpha_1$ -Untereinheiten und somit der Kollagen/Laminin-Rezeptoren (Grossinsky et al., 1996), während IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Dezidualisierung und die  $\alpha_6$ -Expression supprimieren. Diese Untereinheit stimuliert die Kollagenolyse durch extrazelluläre Glykoproteine und kennzeichnet den invasiven Zelltyp (Bischof et al., 1995). Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt nahe, dass Zytokine als Mediatoren des Steroideffektes auf das endometriale Integrinmuster fungieren. Die mittlere und späte Sekretionsphase sind durch eine Zunahme an Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen charakterisiert (Kodama et al., 1998). Sie sind die Hauptquellen von Entzündungszytokinen, welche ihre Expression gegenseitig stimulieren. Die hohen prämenstruellen Konzentration an TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 hängen mit der

Beteiligung dieser Zytokine an der Menstruationsblutung zusammen. Sie wurden beim Menschen in der tubaren Flüssigkeit und im Amnion nachgewiesen (Srivastava et al., 1996). Bei Mäusen führen sowohl die intrauterine Instillation als auch die durch Kopulation erhöhte Freisetzung von GM-CSF aus Estrogen-geprimtem Uterusepithel zum Einstrom von Makrophagen, Granulozyten und Eosinophilen in das Stroma (Robertson et al., 1992). Die dadurch gesteigerte uterine Expression von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  (De et al., 1993) erreicht ihren Peak am ersten Gestationstag und fällt mit dem Rückzug der Leukozyten an die Grenze zwischen Endometrium und Myometrium wieder ab (McMaster et al., 1992). Eine durch Bestandteile der Seminalflüssigkeit direkt initiierte postkoitale Inflammation ist auch beim Menschen denkbar, GM-CSF wird jedoch auch von menschlichen Deziduazellen produziert (Wegmann et al., 1998). Wahrscheinlich hat diese lokale "post-mating" Entzündungsreaktion einen permissiven Effekt auf die Blastozystenimplantation, solange die Expression schwangerschaftsassoziierter Zytokine und deren Rezeptoren beim Embryo und im Endometrium während der gesamten Implantation sorgfältig reguliert bleibt. Kommt es jedoch beispielsweise im Rahmen einer Infektion durch chemotaktisch angelockte Makrophagen zur exzessiven Zytokinfreisetzung, ist eine unangemessene Signalwirkung die Folge. So führt CSF-1 bei Mäusen bereits in kleinsten Mengen zu abortiven Ereignissen in der Frühschwangerschaft (Tartakovsky et al., 1991). Eine Dysbalance der Mediatoren ist ein möglicher Grund für eine gestörte Periimplantation (Tabibzadeh et al., 1995).

Im Rahmen von IVF-Behandlungen wurden in dem für Embryonen verwendeten Medium IL-1, IL-6, TGF- $\beta$  und lösliche TNF-Rezeptoren nachgewiesen (Austgulen et al., 1995). TGF- $\beta$  trägt über die Synthese und Sekretion verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Osteopontin und Proteoglykane zur Gewebshomöostase bei. Die verstärkte Expression von TGF- $\beta$  in der mittleren Sekretionsphase weist auf die zusätzliche Involvierung in die endometriale Integrinexpression und den Implantationsprozess hin.

Das von dezidualisierten Epithelzellen sezernierte CSF-1 fördert das plazentare Wachstum (Pollard et al., 1987). In vitro führt es zur Differenzierung humaner Trophoblasten und zur Produktion von plazentarem Laktogen (Garcia-Lloret et al., 1998). Rezeptoren für dieses Zytokin fand man bei Embryonen vor und nach der Implantation, außerdem in Uterus und Plazenta (Daiter et al., 1991). Die Fertilität CSF-1-defizienter Mäusen ist reduziert (Pollard et al., 1991). Der Mangel kann jedoch durch andere Faktoren kompensiert werden, einer davon ist wahrscheinlich TNF (Hunt et al., 1993). Mäuse ohne TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$  und deren Rezeptoren sind fertil, vermutlich sind TGF- $\beta$  und Typ-I Interferone zwar nicht essentiell für die Frühschwangerschaft, schützen diese aber durch derartige Kompensationen.

Bei endometrialen Adenokarzinomzellen induziert IFN- $\gamma$  die Expression von GBP-1 (Guanylat-bindendes Protein-1). Die mRNA-Expression beider Mediatoren nimmt in endometrialen Drüsen der mittleren Sekretionsphase zu. Auch wenn die Ursache dieser Genaktivierung im „window of implantation“ noch nicht geklärt ist, scheinen IFN- $\gamma$  und GBP-1 geeignete Marker für die uterine Rezeptivität zu sein (Kumar et al., 2001).

TNF- $\alpha$  ist als Apoptose-induzierender Faktor (Tabibzadeh et al., 1994) beim Gewebeaufbau - und Untergang beteiligt. Durch Zerstörung von Endothelzellen führt das Zytokin in der späten Sekretionsphase zur ödematösen Veränderung und Destruktion des endometrialen Gewebes mit konsekutiver Menstruationsblutung (Tabibzadeh et al., 1996, von Wolff et al., 1999). Embryonen der Maus besitzen in der Periimplantationsphase Rezeptoren für TNF (Pampfer et al., 1993), das in der Tube und in endometrialen Epithel- und Stromazellen synthetisiert wird. Dies spricht für ein über die perimenstruelle Gewebedestruktion hinausgehende Funktion. TNF induziert die trophoblastäre (Mitchell et al., 1993; Hunt, 1989) und maternale Produktion weiterer Zytokine während der frühen und späten Gestation (Chen et al., 1991). Durch Anti-TNF-Antikörper wird die Entwicklung von Mäuseembryonen gehemmt. Vermutlich limitiert dieses Zytokin außerdem die Trophoblasteninvasion auf ein angemessenes Kompartiment durch die Zytolyse disseminierender Zellen (Chen et al., 1993). Im menschlichen Endometrium bewirkt der fallende Östrogenspiegel während der späten Sekretionsphase die Hochregulation der TNF- $\alpha$ -Expression (Tabibzadeh et al., 1999). Anders als der Einfluss dieses Zytokins bei der Menstruationsblutung ist jener bei der Implantation allerdings noch spekulativ.

Endometriales IL-1 wird von stimulierten Makrophagen (Numerof et al., 1988) und bei der Maus auch vom Trophoblasten sezerniert. IL-1 $\alpha$  ist in der Proliferationsphase im gesamten epithelialen Zytoplasma nachweisbar, in der Sekretionsphase verstärkt luminal (Tabibzadeh und Sun, 1992). Auch die Rezeptoren für IL-1 wurden im luminalen Epithel nachgewiesen (Dang und Polan, 1994). Die Korrelation der Konzentrationen von IL- $\beta$  mit dem Serum-Östrogenspiegel und der Peak am vierten Gestationstag spricht für eine Steroidhormon-regulierte Expression. Da die intrauterine Injektion eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten bei schwangeren Mäusen zum Implantationsversagen führt, ist eine wichtige Funktion bei der Implantation (Simon et al., 1998) anzunehmen. Zwar hemmt IL-1 in vitro das Attachment der Blastozyste an Fibronectin, es fördert aber das Auswachsen trophoblastärer Zellen der bereits adhärierenden Blastozyste (Haimovici et al., 1993). Es scheint sich hauptsächlich um die Funktion beim Attachment, weniger bei der embryonalen Entwicklung zu handeln. Auch beim Menschen ist eine reduzierte IL-1 $\beta$ -Expression im sekretorischen Endometrium mit habituellen Frühaborten assoziiert (von Wolff et al., 2000). TGF- $\beta$ , TNF und IL-1 $\alpha$  sind wichtige Regulatoren der trophoblastären Sekretion von Metalloproteinasen (Meisser et al.,

1999). Jüngste Untersuchungsergebnisse sprechen für eine bedeutende Rolle von IL-1 $\alpha$ , das in-vitro gemeinsam mit Leptin zu einer Hochregulation von zytotrophoblastären Metalloproteinasen und der  $\alpha_6$ -Integrinuntereinheit führt und somit über parakrine Effekte die Invasion fördert (Gonzalez et al., 2001).

LIF (Leukemia inhibitory factor) ließ sich beim Menschen immunhistochemisch im glandulären Epithel, weniger im Stroma von Gewebe aus derselben Zyklusphase nachweisen (Charnock-Jones et al., 1994). Auf auto- bzw. parakrine Interaktionen endometrialer Zellen deutet der Nachweis von LIF-Rezeptoren im luminalen Epithel hin (Cullinan et al., 1996). Die mRNA des Zytokins wurde bei der Maus unabhängig von der Anwesenheit eines vitalen Embryos in hoher Konzentration im glandulären Epithel am vierten Gestationstag gefunden. Wahrscheinlich initiiert dieses Zytokin die Implantation (Bhatt et al., 1991). Bei Knock-out Mäusen mit fehlender uteriner LIF-Expression kommt es zum Implantationsversagen mit Ausbleiben einer dezidualen Reaktion des Endometrium (Stewart et al., 1992; Salamonsen et al., 2001). Stewart vermutet aufgrund der überwiegend glandulären und weniger luminalen LIF-Expression im Epithel der Maus einen Tag vor Implantation keine direkte Rolle des Zytokines bei dem Attachment. Die Funktion von LIF bei der Implantation scheint eher im Sinne einer Limitierung des invasiven Prozesses zu sein. Durch die Interaktion mit seinem Rezeptor auf humanen Zytotrophoblasten inhibiert LIF die Differenzierung zum invasiven Synzytium (Bischof et al., 1995) und deren hCG-Produktion. LIF beeinflusst im Rahmen der Gestation auch die embryonale Entwicklung, indem es die Bildung des Entoderms hemmt und die Differenzierung des Ektoderms fördert (Shen and Leder, 1992). Man kennt eine Genmutation von LIF, welche die Fertilität bei heterozygoten Frauen reduzieren soll (Giess et al., 1999). Im Rahmen von Sterilitätsbehandlungen wie IVF und Insemination wurde beobachtet, dass niedrige LIF-Konzentrationen im Uterussektret am 26. Zyklustag mit einer erhöhten Implantationsrate assoziiert sind (Ledee-Bataille et al., 2002). Vorangegangene Untersuchungen zur Zyklusabhängigkeit der LIF-Konzentration im Uterussektret mittels ELISA ergaben relativ starke Schwankungen der Messwerte von Proben aus der Proliferationsphase bei einem leichten präovulatorischen Anstieg. Nach der Ovulation zeichnete sich ein nahezu linearer Anstieg der sezernierten LIF-Menge bis in die späte Sekretionsphase ab. Wir stellten eine Zunahme der LIF-Konzentration in den Überständen von Epithelzellkulturen nach Stimulation mit Estradiol in physiologischer oder 10-fach höherer Dosierung fest (Kap. 3.3.1), was für eine wesentliche regulatorische Funktion des Steroidhormones spricht. Die Resultate aus unseren immunhistochemischen Untersuchungen (Kap. 3.4.6) mit einem Expressionsmaximum von LIF in Epithel und Stroma der mittleren

Sekretionsphase weisen auf eine wichtige Rolle des Zytokines zum Zeitpunkt der Implantation hin.

Mit dem strukturverwandten Zytokin IL-6 (Piquet-Pellorce et al., 1994) teilt LIF den als gp 130 bezeichneten Signaltransduktor. IL-6 ist ein pleiotropes und multifunktionelles Zytokin, das sich an physiologischen (Tovey et al., 1988) und pathologischen (Sehgal et al., 1989) Prozessen beteiligt. Es wird überwiegend von Leukozyten (Wolvekamp et al., 1990) freigesetzt und ist daher hauptsächlich in inflammatorische Vorgänge involviert. Aber auch Nicht-Immunzellen produzieren IL-6, das unter anderem wachstumshemmend auf Stromazellen (Zarmakoupis et al., 1995) und epithelialen Neoplasien der Brust (Chen et al., 1988) wirkt. In vitro stimuliert das Zytokin dosisabhängig die Leptinsekretion bei Zytotrophoblasten und erhöht die Aktivität von Metalloproteinasen (Meisser et al., 1999).

Die endometriale IL-6-Regulation unterliegt komplexen, erst teilweise geklärten Regulationsmechanismen. Bekannt ist die Modulation der Expression proinflammatorischer Zytokine untereinander. IL-1 und IL-6 stimulieren gegenseitig ihre Freisetzung durch immunologisch aktive und endometriale Zellen (Laird et al., 1994, Vandermolen und Gu, 1996). Die Expression von IL-6 ist schwach im proliferierenden Epithel und kontinuierlich stärker in endometrialen Drüsen während der Sekretionsphase (Tabibzadeh et al., 1995a; Vandermolen et al., 1996). Auch die uterine Sekretion von IL-6 ist zyklusabhängig (von Wolff et al., 2000). Sie bleibt bis zur mittleren Sekretionsphase auf einem tiefen Niveau, um dann ab dem 25. Zyklustag, also in der späten Sekretionsphase, sprunghaft anzusteigen.

IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , deren Level während der späten Sekretionsphase hoch sind (von Wolff et al., 2000), induzieren im endometrialen Stroma die IL-6-Expression. Wegen deren Zusammenhang mit der Expression des Apoptose-induzierenden Faktors TNF- $\alpha$  ist anzunehmen, dass hohe IL6-Level direkt oder über weitere Zytokine zur Menstruationsblutung beitragen. Nicht nur Stroma (Tabibzadeh et al., 1989), auch Deziduazellen produzieren IL-6 infolge der Stimulation durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Dudley et al., 1992). Oben erwähnte Zytokine modulieren vermutlich auch lokale Effekte (Vandermolen und Gu, 1996) wie beispielsweise die hCG-Sekretion bei humanen Trophoblasten (Nishino et al., 1990). Die Gestationsabhängigkeit der Expression von IL-6 und seinem Rezeptor (Jauniaux et al., 1996) sowie deren Nachweis auf menschlichen Blastozysten (Sharkey et al., 1995) sind für eine Rolle beim embryo-maternalen Dialog suggestiv. IL-1RII, ein spezifischer Inhibitor von IL-1, zeigt eine überwiegend epitheliale Expression, seine luminale Sekretion wird in der mittleren Sekretionsphase passager downreguliert (Boucher et al., 2001). Dies weist sowohl auf eine implantationsfördernde Funktion als auch auf die proinflammatorische Aktivität von IL-1 hin. Immunhistochemisch zeigte sich bei dieser Arbeit eine beginnende



epitheliale Expression von IL-6 in der frühen Sekretionsphase, die bis zum Zyklusende hin weiter zunahm (Kap 3.4.5). Das endometriale Stroma war ausnahmslos schwach gefärbt. Wegen der Zyklusabhängigkeit mit einem gleichzeitigen Maximum endometrialer IL-6-Level und des Steroidhormonpeaks im Serum in der mittleren Sekretionsphase, ist ein direkter oder indirekter Einfluss durch Estradiol und Progesteron wahrscheinlich (Jacobs et al., 1992). Dafür spricht außerdem die signifikante Suppression des endometrialen IL-6 und IL-1 $\beta$  in der mittleren Sekretionsphase bei Frauen mit rezidivierenden Frühaborten (Lim et al., 2000; von Wolff et al., 2000). Allerdings liegen bei denselben Patientinnen normale Östrogen- und Progesteronspiegel im Serum vor. Analogien zum Tiermodell bestehen nicht: IL-6-defiziente Mäuse sind fertil (Tabibzadeh und Babaknia., 1995b). Frauen mit ungeklärter Infertilität (Tseng et al., 1996), Endometriose (Rier et al., 1995; Tseng et al., 1996) und IUD-Trägerinnen (Ämmälä et al., 1995) zeigen insgesamt deutlich erhöhte IL-6-Konzentrationen im weiblichen Reproduktionstrakt. Obwohl ein Zusammenhang zwischen einer gestörten IL-6-Expression im weiblichen Reproduktionstrakt und Infertilität offensichtlich ist, besteht keine Klarheit darüber, wie weibliche Sexualhormone die endometriale IL-6-Expression regulieren und welchen Stellenwert Co-Faktoren haben.

Bisherige Aussagen zur steroidabhängigen IL-6-Expression *in vitro* sind kontrovers. Bei endometrialem Epithel stimuliert die Gabe von Progesteron mit oder ohne 17- $\beta$ -Estradiol die IL-6 Sekretion (Laird et al., 1993). Zellen aus der späten Sekretionsphase reagieren sowohl bei Mensch und Maus auf die kombinierte Stimulation allerdings mit einer Downregulation von IL-6. Bei Stromazellen führt 17- $\beta$ -Estradiol in zwei Fällen zur IL-6-Downregulation: wenn eine Induktion durch IL-1 $\alpha$  vorausging (Tabibzadeh et al., 1998) oder bei Zellen aus der späten Sekretionsphase (Laird et al., 1993). Andererseits wurde eine Hochregulation von IL-6 nach Gabe von 17- $\beta$ -Estradiol bei Stromazellen beschrieben (Tseng et al., 1996). Aber auch bei Stromazellen aus anderen Geweben wie murinem Knochen (Girasole et al., 1992) inhibiert 17- $\beta$ -Estradiol die IL-6-Expression. Bei Stroma aus der Sekretionsphase führen hohe IL-6 Konzentrationen zur Proliferationshemmung (Yokiasha et al., 1999).

Die Sekretionsphase ist gekennzeichnet durch die Invasion immunologisch aktiver Zellen ins Stroma (Smarason et al., 1986). Dies spiegelt sich in einer stärkeren Kontamination mit Immunzellen bei unseren Zellkulturen wieder, die aus sekretorischem Gewebe gewonnen wurden im Vergleich zum Endometrium aus der Proliferationsphase. Viele dieser Leukozyten sind potente Produzenten von IL-6 (Wolvekamp et al., 1990) und einen hohen Anteil stellen die Makrophagen als Hauptquellen für IL-6 und IL-1 dar (Numerof et al., 1988). Ein wichtiger Aspekt ist daher die Reinheit der Kulturen, denn die Kontamination mit Fremdzellen kann durch deren Interaktion mit endometrialen Zellen und/oder durch

leukozytäre Zytokinproduktion zu falschen Ergebnissen führen. Zur Klärung der Frage, wie stark in-vitro Untersuchungen zur Steroidabhängigkeit der endometrialen IL-6-Sekretion durch die von Immunzellen sezernierten Zytokinen beeinflusst werden, führten wir zunächst immunzytochemische Untersuchungen durch. Diese ergaben, dass der Anteil an Leukozyten sowohl bei Epithel- als auch bei Stromazellkulturen etwa 3% beträgt. Zunächst gilt es zu klären, welche Auswirkung die weiblichen Sexualhormone auf die Zytokinsekretion bei isolierten Immunzellen haben. Möglicherweise ist die steroidhormoninduzierte IL-6-Sekretion den im Endometrium quantitativ unterrepräsentierten, jedoch als Zytokinauptquellen bekannten Leukozyten zuzuschreiben. Da wir unser Kultursystem zugunsten der endometrialen Epithel- und Stromazellen optimierten, ist ausserdem fraglich, inwiefern kontaminierende Leukozyten zum Zeitpunkt unserer Hormonstimulation tatsächlich immunologisch aktiv waren.

Bei vorhergehenden Untersuchungen führte die Stimulation von Epithelzellen aus der Proliferationsphase mit Progesteron zu einem Anstieg von IL-6 um 15%, mit zusätzlicher Gabe von Estradiol um 80%, während Estradiol alleine ohne Effekt bleibt (Laird et al., 1993). Im Gegensatz dazu erzielten wir unabhängig von der Zyklusphase durch alleinige Stimulation mit Estradiol einen IL-6-Anstieg. Allerdings waren unsere Konzentrationen maximal 10-fach stärker als der physiologische Blutlevel, die von Laird hingegen 1000-fach höher ( $10^{-6}$  Mol). Denkbar ist ein adverser Effekt durch zu hohe Steroidhormonkonzentrationen, denn, wie bereits durch Watson beschrieben, sinkt die Expression von EGFR in endometrialen Zellkulturen, die mit Estradiol in  $10^{-7}$  molarer Konzentration stimuliert wurden. Die bereits bekannte starke interindividuelle Variabilität der IL6-Sekretion (Montes et al., 1995) ließ sich in unseren Analysen der IL-6 Level bei Kulturüberständen von Epithelzellen bestätigen und war unabhängig von der Zyklusphase.

Bei Stromazellen steigerten wir die IL-6-Level mit Estradiol in maximal physiologischer Konzentration. Laird stellte eine zyklusabhängige Stimulierbarkeit der IL-6-Sekretion fest: einen stimulatorischen Effekt hatte die Gabe von Estradiol nur in der Proliferationsphase (Laird et al., 1993). Diese diskrepanten Ergebnisse können auf die unterschiedliche Anzahl der Experimente (bei uns: n=9, Laird: n=12) oder die ausgeprägte Heterogenität der gesammelten Gewebeproben zurückgeführt werden.

Auch die stark voneinander abweichenden Kulturbedingungen könnten die Ergebnisse enorm beeinflussen. Tabibzadeh et al., 1989, führte die Stimulationsversuche an bis zu vier mal passagierten Stromazellen durch, während Laird et al 1993 und Tseng et al., 1996 Primärkulturen ohne vorhergehende Passagierung verwendeten. Diese hat den Zweck, einen Grossteil der Fremdzellen zu eliminieren. Bereits nach 2-3-facher Passagierung stellten wir

eine verminderte Fähigkeit zur Dezidualisierung fest, was sich in Form erniedrigter Level an Prolactin und IGFBP-1 in den Kulturüberständen darstellte (Abb. 3.2.4). Da Mehrfachpassagierungen nachweislich zu gravierenden Änderungen in der Zellphysiologie führen, beschränkten wir uns auf die ein- bis zweimalige Passagierung 48h nach Aussaat.

Vandermolen und Gu, 1996, benutzten Zellaggregate anstelle separierter Epithel- und Stromazellen. Laird et al., 1993, kultivierte die Epithelzellen in Plastikwells, was die Zellfunktion erheblich beeinträchtigen kann (Mullholland et al., 1988; Schatz et al., 1990; White et al., 1990). Wir wählten für endometriales Epithel ein zweikammriges Kultursystem mit Matrigel als Grundlage, wodurch die Zellpolarität und die Expression von Steroidhormonrezeptoren erhalten bleiben (Classen-Linke et al., 1997). Aufgrund der glandulären Formationen der Epithelzellen auf Matrigel war jedoch lediglich eine semiquantitative Zellzahlbestimmung möglich. Um eine exakte Aussage zur steroidhormoninduzierten IL-6-Sekretion machen zu können, müssten zellzahlunabhängige Methoden wie beispielsweise RNase protection assays angewendet werden.

Tseng et al., 1996, kultivierte Stromazellen in Medium mit 2.5% FCS. Laird et al., 1993, verwendete FCS-freies Serum. Letztere Methode reduziert zwar die Stimulation durch Serumfaktoren, induziert aber die Apoptose bei Epithelzellen. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Proliferationsaktivität endometrialer Zellkulturen bei der Verwendung von FCS-freiem und FCS-enthaltendem Medium feststellen und benutzten für weitere Untersuchungen Medium mit einem FCS-Anteil von 10%.

Da bislang auf keinen Standard für die Kultivierung endometrialer Zellen zurückgegriffen werden konnte, untersuchten wir bei unseren Modellen verschiedene Parameter, die für eine hohe Kulturqualität sprechen. Unsere Experimente fanden zwischen Kulturtag 3 und 6 statt. Viabilitätsassays und Thymidininkorporationen an Tag 6 und 12 ergaben, dass über den Zeitpunkt der Hormonstimulation hinaus Viabilität und Proliferationsrate hoch waren, wodurch eine sinkende Kulturqualität ausgeschlossen werden konnte.

Wahrscheinlich ist die Regulation und der Effekt von endometrialem IL-6 zelltypabhängig. Man fand im Rahmen der Stimulationsversuche mit Steroidhormonen tendentiell eine Induktion der IL-6-Expression bei Epithelzellen und eine Inhibition bei Stromazellen. Die Tatsache, dass IL-6 die Proliferation von Stromazellen aus der Sekretionsphase hemmt (Zarmakoupis et al., 1995; Yoshioka et al., 1999), weist darauf hin, dass dieses Zytokin eine zyklusabhängige Funktion hat und in der Proliferationsphase nur eine untergeordnete Rolle spielt. Da hohe Level von IL-6 einen adversen Effekt auf endometriale Funktionen haben könnten, ist eine Limitierung der stromalen IL-6-Sekretion durch Estradiol und Progesteron vielleicht sinnvoll.

In Anlehnung an das Modell zur kaskadenartigen Freisetzung von Zytokinen bei immunologischen Vorgängen, sollte ergänzend zu unseren Untersuchungen die Zytokinabhängigkeit der endometrialen IL-6-Sekretion analysiert werden. Bei dieser Fragestellung stehen die im menschlichen Endometrium stark exprimierten proinflammatorischen Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Vordergrund. Um zwischen deren auto- und parakrinen Wirkung unterscheiden zu können, sollten isolierte endometriale Epithel-, Stroma- und Immunzellen verwendet werden. Zur Komplettierung der noch ausstehenden Untersuchungen muss auch die Möglichkeit einer steroidhormoninduzierten Änderung der Zytokinsekretion bei endometrialen Leukozyten berücksichtigt werden.

Neben inflammatorischen Prozessen steigert Hypoxie über die Aktivierung des Tie2-Rezeptors die endotheliale Expression des angiogenetischen Faktors Angiopoietin-2 in vitro, über welchen wiederum endometriale Wachstums- und Reparaturvorgänge reguliert werden (Krikun et al., 2000). Verschiedene Zelltypen wie Plazenta, Immun- und Endothelzellen reagieren auf Hypoxie mit einer gesteigerten IL-6-Expression (Naldini et al., 1997; Benyo et al., 1997; Ali et al., 1999). Bei isolierten endometrialen Epithel- und Stromazellen führt Hypoxie zur vermehrten Sekretion von Angiogenin, welches essentiell für das vaskuläre Remodelling während des Menstruationszyklus und der Schwangerschaft ist. Die Expression der Angiogenin-mRNA findet in Epithel und Stroma gleichermaßen statt und ist verstärkt in der Sekretionsphase sowie in deziduaalem Gewebe (Koga et al., 2001). Dies spricht für eine Bedeutung bei der Implantation und der Aufrechterhaltung der frühen Gestation. Auch Steroidhormone beeinflussen die endometriale Blutversorgung entscheidend, denn die uterine Angiogenese wird in vivo durch Progesteron gefördert und durch Estrogen inhibiert (Ma et al., 2001). Letzteres verstärkt jedoch die vaskuläre Permeabilität.

#### 4.5. Schlussfolgerung

Das regulatorische Zusammenspiel zwischen angiogenetischen Faktoren, immunologisch aktiven Zellen und Zytokinen im menschlichen Endometrium scheint ebenso komplex wie bedeutungsvoll zu sein. Im Hinblick auf das endgültige Verständnis der Abläufe bei der Implantation muss einerseits die regulatorische Bedeutung der in jüngster Zeit identifizierten Faktoren wie Leptin und Hoxa-10 mit einer Systematik wie bei den Zytokinanalysen angegangen werden. Bei weiterführenden Untersuchungen, insbesondere bei der Verwendung von Zellkulturen, sind physikalisch-physiologische Aspekte wie Oxygenierung und Sauerstoffdruck zu berücksichtigen. Schließlich sollte das zyklusabhängige Verhalten geeigneter Parameter unter möglichst geringem invasivem Aufwand in die Sterilitäts- und Infertilitätstherapie- und Diagnostik integriert werden.

## 5. Zusammenfassung

Im Zentrum der aktuellen Forschungen zum Phänomen rezidivierender Frühaborte steht die Regulation der endometrialen Zytokin- und Integrinexpression. Die ungestörte Implantation der Blastozyste setzt eine zeitliche und räumliche Anpassung des embryonalen und maternalen Integrinmusters voraus. Die morphologischen und funktionellen Veränderungen von Epithel und Stroma während des Menstruationszyklus sind ein Effekt weiblicher Sexualhormone. Deren Angriffspunkt auf molekularbiologischer Ebene bewirkt eine kaskadenartige Abfolge von Signaltransduktionen, die im Detail noch nicht geklärt sind. Vieles deutet jedoch auf eine wichtige Funktion verschiedener Zytokine bei der Regulation der endometrialen Integrinexpression.

Basis dieser Arbeit war die Optimierung des Kulturmodells für endometriale Zellen. Sie resultierte in der Kultivierung von Epithel auf extrazellulärer Matrix in einem zweikammrigen System. Stromales Gewebe wurde zunächst durch Filtration und anschließende Sedimentation gereinigt. Die auf Polystyrol als Monolayer wachsenden Stromazellen wurden zur Eliminierung nichtendometrialer Zellen maximal zweimal passagiert. Dadurch blieb die spezifische Fähigkeit des endometrialen Stromas zur Dezidualisierung erhalten, gleichzeitig fand eine ausreichende Reduktion des Anteils an Fremdzellen statt.

Die Charakterisierung der Zellkulturen führte unter anderem zu dem Ergebnis, dass Untersuchungen zur Steroidabhängigkeit der endometrialen Zytokinproduktion optimalerweise zwischen dem 3. und 6. Kulturtag durchgeführt werden sollten, weil in dieser Phase die Vitalität und die Proliferationsaktivität der Zellen maximal sind. Bei der immunzytochemischen Analysierung der Zellkulturen stand die Kontamination der Zellkulturen mit Leukozyten als potente Zytokinproduzenten im Vordergrund. Der Anteil der Leukozyten war mit ca. 3% sehr niedrig.

Unsere immunhistochemischen Reihenuntersuchungen an endometrialen Kryostatschnitten bestätigten die Zyklusabhängigkeit der endometrialen Osteopontin-, Zytokin- und Integrinexpression. Der für eine ungestörte Implantation essentielle Vitronectin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  wird vom 20. Zyklustag an bis zum Zyklusende in Epithelzellen exprimiert, ebenso die Untereinheit  $\beta_3$ . Letztere wird bei Stromazellen nur während der Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase stark exprimiert. Das Integrin  $\alpha_v$  zeigte bei Epithelzellen aus allen Zyklusphasen eine mittelstarke Expression und nur bei Stromazellen aus dem letzten Zyklusdrittel eine starke Anfärbung. Das zwischen den Untereinheiten der  $\beta$ -Gruppe fungierende Brückenmolekül Osteopontin liess sich frühestens im Epithel der mittleren und mit maximaler Expression der späten Sekretionsphase nachweisen. Anders als bei den

endometrialen Integrinen imponierte bei Osteopontin das inhomogene Färbeverhalten der Drüsen und sogar der Einzelzellen. Stromazellen zeigten im gesamten Zyklus eine schwache Reaktivität.

Die hohen Konzentrationen an IL-6 in endometrialen Epithelzellen und Uterussekreten während der mittleren und späten Sekretionsphase weisen auf eine Rolle bei der Implantation und der Menstruationsblutung hin. Bisherige Untersuchungen zur Hormonabhängigkeit der endometrialen IL-6-Sekretion lieferten jedoch uneinheitliche Ergebnisse. Unsere quantitativen Zytokinbestimmungen mittels ELISA zeigten bei beiden endometrialen Zelltypen hohe Basallevel der IL-6-Sekretion. Die starke interindividuelle Variabilität war unabhängig von der Zyklusphase. Die Stimulation mit Estradiol oder Progesteron in physiologischer oder 10-fach höherer Dosierung führte bei Epithelzellen aus allen Zyklusphasen zu einer Steigerung der IL-6-Sekretion um 50%, die kombinierte Gabe um 100 %. Bei Stromazellen bewirkte nur die physiologische Dosierung der einzelnen Steroidhormone einen Anstieg um 50 %. Durch die kombinierte Stimulation in beiden Dosierungen kam es zu einem Abfall der IL-6 Sekretion um 25-60%. Dezidualisierte Stromazellen zeigten eine um 50% reduzierte IL-6-Sekretion im Vergleich zu den nicht dezidualisierten.

Da bei dem Steroideffekt auf Epithel- und Stroma auch eine serielle Involvierung mehrerer Mediatoren denkbar ist, sollte in ergänzenden Untersuchungen die Zytokinabhängigkeit der IL-6-Sekretion bei endometrialen Zellen untersucht werden. Relevant ist auch der Effekt der weiblichen Steroidhormone auf die IL-6-Sekretion bei aus Endometrium isolierten Immunzellen. Auch das lokale O<sub>2</sub>-Angebot beeinflusst die Zytokinregulation, daher sollte die endometriale IL-6-Sekretion zusätzlich unter hypoxischen Bedingungen untersucht werden.

Neben der Beteiligung an den apoptotischen und inflammatorischen Vorgängen bei der Menstruationsblutung ist eine Involvierung in die Blastozystenimplantation offensichtlich. Die zyklus- und gestationsabhängige IL-6-Expression durch unterschiedliche endometriale Zelltypen spricht für die Multifunktionalität mit einer von der Konzentration, dem Zelltyp und der Zyklusphase abhängigen Funktion. Der Nachweis einer IL-6-abhängigen Regulation der Expression eines oder mehrerer für die ungestörte Frühgravidität essentiellen Integrines würde nicht nur entscheidend zur Klärung der Pathophysiologie rezidivierender Frühaborte beitragen, sondern könnte gleichzeitig therapeutische Aspekte liefern und eventuell Grundlage einer neuen antikonzeptionellen Möglichkeit darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS et al. (1999) Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *Am J Physiol* 277 (5Pt 1): L 1057-1065

Ämmälä M, Nyman T, Strengell L et al. (1995) Effect of intrauterine contraceptive devices on cytokine messenger ribonucleic acid expression in the human endometrium. *Fertil Steril* 63: 773-778

Anderson TL, Hoffman LH (1984) Alterations in epithelial glycocalyx of rabbit uteri during early pseudopregnancy and pregnancy, and following ovariectomy. *Am J Anat* 171: 321-334

Anderson TL, Olson GE, Hoffman LH (1986) Stage-specific alterations in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. *Biol Reprod* 34: 701-720

Aplin JD, Seif MW, Graham RA, Hey NA, Behzard F and Campbell S (1994) The endometrial cell surface and implantation: expression of the polymorphic mucin MUC-1 and adhesion molecules during the endometrial cycle. In: Bulletti C, Gursipide E, Flamigni C (eds) *The human endometrium*. *Ann NY Acad Sci* 734: 103-121

Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H and Jones C JP (2001) MUC1, glycans at the cell surface and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochemical Society Transactions* 29 (2): 153-156

Arai K-i LF, Miyajima A, Miyatake S, Arai N and Yokota T (1990) Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem* 59: 783-836

Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL (1995) Modulation of leukaemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1908-1915

Armant DR, Kaplan HA, Mover H, Lennarz WJ (1996) The effect of hexapeptides on attachment and outgrowth of mouse blastocysts cultured in vitro: evidence for the involvement of the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6751-6755

Austgulen R, Arntzen KJ, Vatten LJ, Kahn J and Sunde A (1995) Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$ ) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in vitro-fertilisation. *Hum Reprod* 10: 171-176

Bamberger AM, Kleinkauf-Houcken A, Bamberger CM, Loning T (1999) Molecular and clinical endocrinology of the endometrium. *Pathol* 20: 50-55

Beier HM, Mootz U (1979) Significance of maternal uterine proteins in establishment of pregnancy. In: *Maternal recognition of pregnancy*. *Ciba Found Symp* 64: 111-140

Beier HM (1982) Uteroglobin and other endometrial proteins: biochemistry and biological significance in beginning pregnancy. In: Beier HM, Karlson P (eds) *Proteins and steroids in early pregnancy*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 39-71

Beier HM (2000) The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. *Ann N Y Acad Sci* 2000: 9239-24

Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Larsen JF, Hamberger L and Horn T (1994) Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 101: 327-332



- Benyo DF, Miles TM, Conrad KP (1997) Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1582-1588
- Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL (1991) Uterine expression of leukaemia inhibitory factor coincidences with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 38: 11408-11412
- Bischof P, Haenggeli A, Campana A (1995) Effect of leukaemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *ARJI* 34: 225-230
- Bischof P, Haenggeli A, Campana A (1995) Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion is dependant on integrin expression on human cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 10: 734-742
- Bischof P, Meisser A, Campana A (2001) Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci* 943: 157-162
- Boucher A, Kharfi A, Al-Akoum M, Bossu P and Akoum A (2001) Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biol Reprod* 65: 890-898
- Bridges JE, Prentice A, Roche W, Englefield P and Thomas EJ (1994) Expression of integrin adhesion molecules in endometrium and endometriosis. *Brit J Obstet Gynecol* 101: 696-700
- Brown LF, Berse B, Van De Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ et al. (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissue: widespread association with luminal epithelial surface. *Mol Biol Cell* 3: 1169-1180
- Bulla R, De Guarrini F, Pausa M, Fischetti F, Meroni PL, De Seta F, Guaschino S and Tedesco F (1999) Inhibition of trophoblast adhesion to endothelial cells by the sera of women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 42: 116-123
- Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E (1996) Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2: 118-36
- Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A (1991) Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann NY Acad Sci* 622: 57-68
- Butler WT (1989) The nature and significance of osteopontin. *Connective Tissue Res* 23: 123-136
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ and Aplin JD (1995) Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryos. *Hum Reprod* 10: 1571-1578
- Carlone DL, Rider V (1993) Embryonic modulation of basic fibroblast growth factor in the rat uterus. *Biol Reprod* 49: 653-65
- Carlson E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek N (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305: 609-613
- Castellucci M, De-Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P (2000) Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 6 (10): 951-958
- Chan BM, Kassner PD, Schiro JA, Byers HR, Kupper TS and Hemler ME (1992) Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmatic domain. *Cell* 68: 1051-1060
- Chardonne D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC, Bischof P (1999) Modulation of human cytotrophoblast leptin secretion by interleukin1 alpha and 17 beta-oestradiol and its effects on HCG secretion. *Mol Hum Reprod* 5: 1077-1082

- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK (1994) 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* 10: 421-426
- Chen L, Mory Y, Zilberstein A et al. (1988) Growth inhibition of human breast carcinoma and leukaemia/lymphoma cell lines by recombinant IFN- $\beta$ 2 (BSF-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8037-8041
- Chen HL, Yang Y, Yelavarthi KK, Fishback JL and Hunt JS (1991) Tumour necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation: *Am J Pathol* 139: 327-335
- Chen HL, Yelavarthi KK, Hu XL, Hunt JS (1993) Identification of transforming growth factor- $\beta$ 1 mRNA in virgin and pregnant rats by in situ hybridization. *J Reprod Immunol* 25: 221-233
- Classen-Linke I, Denker HW, Winterhager E (1987) Apical plasma membrane bound enzymes of rabbit uterine epithelium. Pattern changes during the perimplantation phase. *Histochem* 87: 517-529
- Classen-Linke I, Kusche M, Knauthe R, Beier HM (1997) Establishment of a human endometrial cell culture system and characterisation of its polarized hormone responsive epithel cells. *Cell Tissue Res* 287: 171-185
- Conforti G, Zanetti A, Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D Jr, Neyroz P and Dejana E (1990) Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition. *J Biol Chem* 265: 4011-4019
- Craig AM, Denhardt DT (1991) The mouse gene encoding secreted phosphoprotein 1 (OPN, osteopontin): Promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene* 100: 163-171
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA and Stewart CL (1996) Leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/ paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci* 93: 3115-3120
- Cullingford TE, Pollard J (1994) Growth factors as mediators of sex steroid hormone action in the uterus during its preparation for implantation. In: Kahn SA, Stancel GM (eds) *Protooncogenes and growth factors in steroid hormone-induced growth and differentiation*. Boca Raton: CRC Press 1994: 13-30
- Daiter E, Pampfer S; Yeung YG; Barard D, Stanley ER and Pollard JW (1991) Expression of colony stimulating factor-1(CSF-1) in human uterus and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 850-858
- Daiter E, Omigbodun A, Wang S, Walinsky D, Strauss III JF, Hoyer JR et al. (1996) Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3', 5'-Monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinology* 137: 1785-1790
- Damario MA, Lesnick TG, Lessey BA, Kowalik A, Mandelin E, Seppala M, Rosenwaks Z (2001) Endometrial markers of uterine receptivity utilizing the donor oocyte model. *Hum Reprod* 16: 1893-1899
- Dang W, Polan ML (1994) Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinol* 134: 521-528
- Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK and Dey SK (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the

blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120: 1071-1083

De M, Sanford TR, Wood GW (1993) Expression of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor  $\alpha$  in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. *J Reprod Fertil* 97: 83-89

Delage G, Moreau JF, Taupin JL, Freitas S, Hambartsoumian E, Oliiviennes F, Fanchin R, Letur-Könirsch H, Frydman R and Chaouat G (1995) In-vitro endometrial secretion of human interleukin for DA cells leukaemia inhibitory factor by explant cultures from fertile and infertile women. *Mol Hum Reprod* 10: 2483-2488

Denker HW (1977) Implantation: the role of proteinases, the blockage of implantation of proteinase inhibitors. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 53: 3-123

Denker HW (1993) Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool* 266: 541-558

Dudley DJ, Trautman MS, Araneo BA, Edwin SS and Mitchell MD (1992) Decidual cell biosynthesis of interleukin-6: Regulation of inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 884-889

Dunglinson GF, Barlow DH, Sargent IL (1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* 11: 191-196

Enders AC (1991) Implantation (embryology). *Encyc Hum Biol* 4: 423-430

Elices MJ, Hemler ME (1989) The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/ laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9906-9910

Elices MJ, Urry LA, Hemler ME (1991) Receptor functions for the integrin VLA-3-fibronectin, collagen and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. *J Cell Biol* 112: 169-181

Flores ME, Norgard M, Heinegard D, Reinholt FP and Andersson G (1992) RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein and fibronectin. *Exp Cell Res* 201: 526-530

Garcia JE, Acosta AA, Hsiu JG, Jones HW Jr (1984) Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin/ human chorionic gonadotropin. Proc 3<sup>rd</sup> Eur Placental Group Meeting, Dourdan, France

Garcia-Lloret M, Morrish DW, Guilbert LJ (1998) Functional expression of CSF-1 receptors on normal human trophoblast. Proc 3<sup>rd</sup> Eur. Placental Group Meeting, Dourdan, France.

Garfurri B, Airoidi L, Di Blasio AM, Viganò P, Miragoli AM, Santorsola R and Vignali M (2000) Unexplained habitual abortion is associated with a reduced endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the luteal phase of the cycle. *Eur J Endocrinol* 142: 477-480

Giess R, Tanasecu I, Steck T, Sendtner M (1999) Leukemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod* 5: 581-586

Gipson IK (2001) Mucins of the human endocervix. *Frontiers in Bioscience* 6: 1245-1255

Girasole G, Jilka RL, Passeri G et al. (1992) 17 $\beta$ -Estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogen. *J Clin Invest* 89: 883-891

- Glasser SR, Mulholland J, Julian JA, Mani SK, Munir Mi and Soares MJ (1991) Blastocyst-endometrial relationships: reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. In: Miller RK, Thiede HA (eds) *Trophoblast Res 5* Plenum Press, New York, pp 229-280
- Godkin JD, Smith SE, Johnson RD, Dore JJ (1996) The role of trophoblast interferons in the maintenance of early pregnancy in ruminants. *AJRI* 37: 137-143
- Gonzalez RR, Simon C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnnes D, Devoto L, Bischof P (2000) Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update* 6: 290-300
- Gonzalez RR, Devoto L, Campana A, Bischof P (2001) Effects of leptin, interleukin-1alpha, interleukin-6 and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases. *Endocrinol* 15: 157-164
- Graham CH, McCrae KR, Lala PK (1993) Molecular mechanisms controlling trophoblast invasion of the uterus. *Trophoblast Res* 7: 237-250
- Grossinsky CM, Yowell CW, Sun J, Parise LV and Lessey BA (1996) Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2047-2054
- Guilbert L, Robertson SA, Wegmann TG (1993) The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. *Immunol Cell Biol* 71: 49-57
- Haas TA, Plow EF (1994) Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Op Cell Biol* 6: 656-662
- Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ (1991) The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol Reprod* 44: 59-75
- Haimovici F, Anderson DJ (1993) Cytokines and growth factors in implantation. *Micr Res Techn* 25: 201-207
- Hemler ME (1990) VLA protein in the integrin family: structure, function and their role on leukocytes. *Ann Rev Immunol* 8: 365-370
- Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD (1994) The polymorphic epithelial mucin MUC-1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 337-342
- Heymann D, Harb J, Ringear S, Blanchard F, Lassort D, Raher S and Godard A (1996) Modulation de l'expression de l'integrine  $\alpha_v\beta_1$  a la surface des cellules cancéreuses humaines par le leukemia inhibitory factor (LIF) et l'oncostatine M (OSM) *Bull Cancer* 83: 13-21
- Hochfeld A, Beier HM, Denker HW (1990) Changes of intermediate filament protein localization in endometrial cells during early pregnancy. In: Denker HW, Aplin JD (eds) *Trophoblast invasion and endometrial receptivity (Trophoblast Research, Vol 4)* Plenum Press, New York, pp 357-374
- Hunt JS (1989) Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J Reprod Immunol* 16: 1-17
- Hunt JS, Pollard JW (1992) Macrophages in the uterus and placenta. *Curr Top Microbiol Immunol* 181: 39-63
- Hunt JS (1993) Expression and regulation of the tumour necrosis factor- $\alpha$  gene in the female reproductive tract. *Reprod Fertil Dev* 5: 141-153
- Hunt JS, Roby KF (1994) Implantation factors. *Clin Obstet Gynecol* 37: 635-645

- Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF (1996) Modulation of cell migration by Integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 134: 1551-1562
- Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554
- Jacobs AL, Sehgal PB, Julian J, Carson DD (1992) Secretion and hormonal regulation of Interleukin-6 production by mouse uterine stromal and polarized epithelial cells cultured in vitro. *Endocrinol* 131: 1037-1046
- Jauniaux E, Gulbis B, Schandene L et al. (1996) Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *Mol Hum Reprod* 2: 239-243
- Johnson PM (1994) Immunobiological characterisation of the trophoblast-decidual interface in human pregnancy. In: Hunt JS, ed. *Immunobiology of reproduction*. New York: Springer Verlag, 1994: 3-13. Sereno Symposia, Norwell, Massachusetts, USA
- Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK (2002) Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* 13: 144-150
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A and Tanaka T (2002) Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinol* 143: 1922-1931
- Klentzeris LD, Bulmer JN, Tredisiewicz LK, Morrison L and Cooke ID (1993) Beta 1-integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 8: 1223-1230
- Klentzeris LD, Fishel S, McDermott H, Dowell K, Hall J and Green S (1995) A positive correlation between expression of  $\beta_1$ -integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 10: 728-733
- Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y and Ohama K (1998) Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD 56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 13: 1036-1043
- Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Yano T, Yoshino O, Takai Y, Matsumi H, Hiroi H, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T and Taketani Y (2001) Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5609-14
- Krebs D (1991) Zur Epidemiologie der Sterilität. *Arch Gynecol Obstet* 250: 925-930
- Krikun G, Schatz P, Finlay T, Kadner S, Mesia A, Gerrets R and Lockwood CJ (2000) Expression of angiopoietin-2 by human endothelial cells: by hypoxie and inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 159-163
- Kumar S, Li Q, Dua A, Ying YK, Bagchi MK and Bagchi IC (2001) Messenger ribonucleic acid encoding Interferon-inducible guanylate binding protein-1 is induced in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrin and Metabol* 86: 2420-2427
- Laird SM, Li TC, Bolton AE (1993) The production of placental protein 14 and interleukin-6 by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod* 8: 793-798
- Laird SM, Tuckerman E, Li TC et al. (1994) Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin-6 production by interleukin-1 and placental protein 14. *Hum Reprod* 9: 1339-1343

- Lampelo SA, Ricketts AP, Bullock DW (1985) Purification of rabbit endometrial plasma membranes from receptive and nonreceptive uteri. *J Reprod Fertil* 75: 475-484
- Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R and Chaouat G (2002) Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod Oxf* 17: 213-218
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM and Buck CA (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 90: 188-195
- Lessey BA (1994) The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* 61: 812-814
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW and Sun J (1994a) Further characterisation of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 62: 497-506
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SJ, Buck CA, Schinnar R, Wilkins B et al. (1994b) Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 643-649
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SJ, Sun J (1995a) Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 63: 535-542
- Lessey BA, Yeh I-tein T, Castelbaum AJ, Fritz MA, Ilesanmi AO, Korzeniowski P et al. (1996) Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* 65: 477-483
- Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE and Chwalisz K (1996) Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception and infertility. *Am J Reprod Immunol* 35: 195-204
- Lessey BA (2002) Implantation defects in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955: 265-80; disc: 293-295, 396-406
- Li H, Chen S, Xing F (2002) Expression of HOXA 10 gene in human endometrium and its relationship with unexplained infertility. *Zhonhua-Fu-Chan-Ke-Za-Zhi* 37: 30-32
- Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF and Giachelli C (1995) Osteopontin and  $\beta_3$ -Integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 77: 665-672
- Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM et al. (1995) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. *J Clin Invest* 95: 713-724
- Lilford HJ, Dalton ME (1987) Effectiveness of treatment for infertility. *BMJ* 18: 295
- Lim KJH, Odukoya OA, Ajjan RA et al. (2000) The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 73: 136-142
- Lindenberg, S, Hyttel P, Lenz S, Holmes PV (1986) Ultrastructure of the early human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1: 533-538
- Lomax B, Tang S, Separovic E, Philips D, Hillard E, Thomson T and Kalousek DK (2000) Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Gen* 2000 May; 66: 1516-1521

- Ma L, Benson GV, Lim H, Dey SK and Maas RL (1998) Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: Regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in Müllerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Develop Biol* 197: 141-154
- Ma W, Tan J, Matsumo H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK and Dey SK (2001) Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol* 15: 1983-1992
- Martel D, Frydman R, Glissant M, Maggioni C, Roche D and Psychoyos A (1987) Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol* 114: 319-603
- Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A (1991) Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Hum Reprod* 6: 597-603
- Marx M, Winterhager E, Denker HW (1990) Penetration of the basal lamina by process of the uterine epithelial cells during implantation in the rabbit. In: Denker HW, Aplin JD (eds) *Trophoblast invasion and endometrial receptivity (Trophoblast Research, Vol 4)* Plenum Press, New York, pp 417-430
- McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK (1992) Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J Immunol* 148: 181-184
- Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P (1999) Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblast cells. *Mol Hum Reprod* 5: 1055-1058
- Meisser A, Chardonnnes D, Campana A and Bischof P (1999) Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 5: 252-260
- Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ (1993) Cytokine networking in the placenta. *Placenta* 14: 249-275
- Montes MJ, Tortosa CG, Borja C et al. (1995) Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34: 188-194
- Mullholland J, Winterhager E, Beier HM (1988) Changes in proteins synthesized by rabbit endometrial epithelial cells following primary culture. *Cell tissue Res* 252: 123-132
- Naldini A, Carraro F, Silvestri S et al. (1997) Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear blood cells. *J Cell Physiol* 173: 335-342
- Nikas G and Psychoyos A (1974) Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. *Assist Reprod Revs* 4: 26-32
- Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Tagaki T, Saji F and Tanizawa O (1990) Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *Am J Clin Endocrinol Metabol* 71: 436-441
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1: 3-25
- Noyes RW, Dickmann E, Boyle LL, Gates AH (1963) Ovum transfers, synchronous and asynchronous, in the study of implantation. In: Enders AC (ed) *Delayed implantation*. University of Chicago Press, Chicago, pp 197-212

- Numerof RP, Aronson FR, Mier JW et al. (1988) IL-2 stimulates the production of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 141: 4250-4257
- Okada Y, Asahina T, Kobayashi T, Goto J and Terao T (2001) Studies of the mechanism of edematous changes at the endometrial stroma for implantation. *Semin Thromb Hemost* 27: 67-77
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8819-8823
- Olson GE, Winfrey VP, Blaeuer GL, Palisano JR and Nagdas SK (2002) Stage-specific expression of the intermediate filament protein cytokeratin 13 in luminal epithel cells of secretory phase human endometrium and peri-implantation stage rabbit endometrium. *Biol Reprod* 66: 1006-1015
- Omigbodun A, Ziolkiewicz P, Tessler C, Hoyer JR and Coutifaris C (1997) Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinol* 138: 4308-4315
- Osteen KG, Bruner-Tran KL, Keller NR, Eisenberg E (2002) Progesterone-mediated endometrial maturation limits matrix metalloproteinase (MMP) expression in an inflammatory-like environment: a regulatory system altered in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955: 37-47; disc: 86-88, 396-406
- Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I and De Hertogh R (1993) Expression of tumour necrosis factor-alpha receptors and selective effect of TNF-alpha on the inner cell mass in mouse blastocysts. *Endocrinol* 134: 206-212
- Paria BC, Dey SK (1990) Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4756-4760
- Piquet-Pellorce C, Gey L, Mereau A, Heath JK (1994) Are LIF and related cytokines functionally equivalent? *Exp Cell Res* 213: 340-347
- Pollard JW, Bartocci A, Arceci R, Orlofsky A, Ladner MB and Stanley ER (1987) Apparent role of the macrophage growth factor CSF-1 in the placental development. *Nature* 330: 484-486
- Pollard JW (1990) Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation. *J Reprod Fertil* 88: 721-731
- Pollard JW, Hunt JS, Wiktor-Jedrejczak W, Stanley ER (1991) A pregnancy defect in the osteoporotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev Biol* 148: 273-283
- Psychoyos (1973b) Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 31: 201-256
- Psychoyos A (1974) Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 31: 201-256
- Psychoyos A (1976) Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J Reprod Fertil* 25 (Suppl.): 17-28
- Psychoyos A (1986) Uterine receptivity for nidation. *Ann NY Acad Sci* 476: 36-42
- Psychoyos A (1993) The implantation window: basic and clinical aspects. In: Mori T, Aono T, Tominaga, T and Hiroi M (eds) *Perspectives in assisted reproduction*. Ares Serono Symposia 4., pp 57-62, Ares Symposia, Rome, Italy
- Rider V, Psychoyos A (1994) Inhibition of progesterone receptor function results in loss of basic fibroblast growth factor expression and stromal cell proliferation during uterine remodelling in the pregnant rat. *J Endocrinol* 140: 239-249



- Rier SE, Zarmakoupis PN, Hu X, Becker JL (1995) Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1431-1437
- Robertson SA, Brannstrom M, Seamark RF (1992) Cytokines in rodent reproduction and the cytokine - endocrine interaction. *Curr Op in Immunol* 4: 585-590
- Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF (1992) Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod* 46: 1069-1079
- Ruoshlahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87: 1-5
- Ruoshlahti E, Pierschbacher MD (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497
- Salamonsen LA, Nie G, Dimitriadis E, Robb L and Findlay JK (2001) Genes involved in implantation. *Reprod Fertil Dev* 13: 41-49
- Schatz F, Gordon RE, Laufer N et al. (1990) Culture of human endometrial cells under polarizing conditions. *Differentiation* 42: 184-190
- Sehgal PB, Grieninger G, Tesato G (1989) Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann N Y Acad Sci* 557: 1-583
- Senger DR et al. (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the  $\alpha v\beta 3$  integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 149: 293-405
- Sharkey AM, Dellow K, Bleyney M et al. (1995) Stage - specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 53: 955-962
- Shen MM, Ledder P (1992) Leukaemia inhibitory factor is expressed by the periimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 89: 8240-8244
- Sillem M, Rabe T, Prifti S, Runnebaum B and Schmidt M (1997) Endometrial integrin expression is independent of estrogen or progestin treatment in vitro. *Fertil and Steril* 67: 877-882
- Simon C, Valbuena D, Krussel J et al. (1998) Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect in the endometrial epithelium. *Fertil Steril* 70: 896-906
- Simons K, Fuller SD (1985) Cell surface polarity in epithelium. *Ann Rev Cell Biol* 1: 243-288
- Smarason AK, Gunnarsson A, Alfredsson JH et al. (1986) Monocytosis and monocytic infiltration of decidua in early pregnancy. *J Clin Lab Immunol* 21: 1-5
- Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H and Landgren BM (2001) Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentration of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 76: 782-791
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadil I, Kontgen F and Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359: 76-79
- Stewart CL (1994) The role of leukaemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Am NY Acad Sci* 743: 157-165

- Strowitzki T, Wiedemann R, Hepp H (1991). Influence of growth factors EGF, IGF-1, and human growth hormone on human endometrial stromal cells in vitro. *Ann NY Acad. Sci* 626: 308-11.
- Strowitzki T, Capp E, von Wolff M, Muller-Hocker J (2001) Expression of glucose transporter 1 in human endometrial and decidual tissue. *Gynecol Endocrinol* 15: 219-224
- Stuiver I, O'Toole TE (1995) Regulation of integrin function and cellular adhesion. *Stem Cells* 13: 250-262.
- Srivastata MD, Lippes J, Srivastata BIS (1996) Cytokines of the human reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 36: 157-166
- Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M and Yoshimura Y (1997) Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. *Fertil Steril* 67: 799-811
- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH (1993) Development regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119: 1175-1186
- Tabibzadeh S, Santhanam U, Sehgal B et al. (1989) Cytokine-induced production of IFN- $\beta$ / IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. *J Immunol* 142: 3134-3139
- Tabibzadeh S (1992) Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 7: 876-882
- Tabibzadeh S, Sun XZ (1992) Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 7: 1214-1221
- Tabibzadeh S (1994) Regulatory roles of IFN-gamma in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 734: 1-6
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A et al. (1995b) Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Mol Hum Reprod* 1: 2793-2799
- Tabibzadeh S, Babaknia A (1995a) The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol Human Reprod* Vol. 1, *Hum Reprod* Vol. 10, pp 1579-1602
- Tabibzadeh S (1996) The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 2: 77-92
- Tabibzadeh S (1998) Molecular control of the implantation window. Review. *Hum Reprod Update* Sep-Oct 4: 465-471
- Tabibzadeh S, Satyaswaroop PG, von Wolff M, Strowitzki T (1999) Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by estrogen withdrawal. *Mol Hum Reprod* 5: 1141-1149
- Tartakovsky B, Goldstein ? , Broshi N (1991) Colony stimulation factor-1 blocks early pregnancy in mice. *Biol Reprod* 44: 906-912
- Taskin O, Brown RW, Young DC, Poindexter AN and Wiehle RD (1994) High doses of oral contraceptives do not alter endometrial  $\alpha_1$  and  $\alpha_v\beta_3$ -integrins in the late implantation window. *Fertil Steril* 61: 850-855

- Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Albers A and Denker HW (1995) Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Europ J Cell Biol* 66: 180-191
- Thomas K, Thomson AJ, Sephton V, Cowan C, Wood S, Vince G, Kingsland CR and Lewis-Jones DI (2002) The effect of gonadotropic stimulation on integrin expression in the endometrium. *Hum Reprod* 17: 63-68
- Tovey MG, Content J, Gresser I et al. (1988) Genes for IFN- $\beta$ 2 (IL-6) tumour necrosis factor and IL-1 are expressed at high levels in the organs of normal individuals. *J Immunol* 141: 3106-3110
- Tseng JF, Ryan IP, Millam TD et al. (1996) Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from woman with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1118-1122
- Van der Linden PJQ, Erkens HWH, de Goeij AFP, Evers JLH and Dunselmann GAJ (1995) Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil and Steril* 63: 1210-1216
- Vandermolen DT, Gu Y (1996) Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production and stimulation thereof by IL-1 $\beta$ . *Fertil Steril* 66: 741-747
- Van Kuppevelt THMSM, Laguino LR, Gailit JO, Suzuki S and Ruoshlati E (1989) An alternative cytoplasmatic domain of the integrin- $\beta$ <sub>3</sub> subunit. *Proc Natl Acad Sci* 86: 5415-5418
- Von Wolff M, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Karl C, Beier HM (1999). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Front Biosci* (Jul 1) 4: C1-3
- Von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W and Tabibzadeh (2000) Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod* 6: 627-634
- Waterhouse P, Parhar RS, Guo X, Lala PK and Denhardt DT (1992) Regulated temporal and spatial expression of the calcium-binding proteins calyculin and OPN (Osteopontin) in mouse tissue during pregnancy. *Mol Reprod Develop* 32: 315-3232
- Wegmann TG, Athanassakis I, Guilbert L, Branch D, Dy M, Menu E and Chaouat G (1998) The role of M-CSF and GM-CSF in fostering placental growth and fetal survival. *Transplant Proc* 21: 566-568
- Winterhager E, Kühnel W (1982) Alterations in intercellular junctions of the uterine epithel during the periimplantation phase in the rabbit. *Cell tissue Res* 224: 517-526
- Whaley AE, Meka CSR, Hunt JS, Imakawa K (1994) Identification and cellular localization of unique interferon mRNA from human placenta. *J Biol Chem* 269: 10864-10868
- White TEK, Di Sant`agnese A, Miller RK (1990) Human endometrial cells grown on extracellular matrix form simple columnar epithelia and gland. *In vitro Cell Dev Biol* 26: 636-642
- Winterhager E, Mulholland J, Glasser SR (1994) Morphological and immunohistochemical differentiation patterns of rabbit uterine epithelium in vitro. *Anat Embryol* 189: 71-79
- Wolvekamp MCJ, Marquet RL (1990) Interleukin-6: a historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* 24: 1-10

Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW et al. (1989) CDNA cloning, mRNA distribution, heterogeneity, chromosomal location and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7: 591-502

Yoshioka H, Harada T, Iwabe T et al. (1999) Menstrual cycle-specific inhibition of the proliferation of endometrial stromal cells by interleukin-6 and its soluble receptor. *Am J Obstet Gynecol* 180: 1088-1094

Zarmakoupis PN, Rier SE, Maroulis GB et al. (1995) Inhibition of human endometrial stromal cell proliferation by interleukin-6. *Hum Reprod* 10: 2395-2399

Zheng X, Saunders TL, Camper SA, Samuelson LC and Ginsnurg D (1995) Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc Natl Acad Sci* 92: 12

Zimolo Z, Wesolowski G, Tanaka H, Hyman JL, Hoyer JR and Rodan GA (1994) Soluble  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ligands raise  $(Ca^{2+})$  in rat osteoclasts and mouse-derived osteoclast-like cells. *Am J Physiol* C376-C381

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation entstand im Forschungslabor der Frauenklinik des Klinikums Großhadern in München.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Hepp für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. C. J. Thaler danke ich für die Mitgestaltung der interessanten Aufgabenstellung und die Übernahme des Erstgutachtens.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Strowitzki für die freundliche Unterstützung bei organisatorischen Fragen vor Beginn und während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Michael von Wolff möchte ich sehr herzlich für die hervorragende Betreuung danken. Seine sachkundige Hilfe und die stets freundschaftliche Atmosphäre hielten meine Begeisterung für die Thematik und meine Motivation auch nach einigen fehlgeschlagenen Versuchen aufrecht.

Herrn Prof. Dr. med. W. Jonatha, Chefarzt der Frauenklinik des Krankenhauses Harlaching, und Herrn Dr. med. Graf Buquoy, Chefarzt der Frauenklinik des Krankenhauses Dritter Orden in München sowie deren Mitarbeitern danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die stets freundliche wie auch reibungslose Kooperation bei der Sammlung von Gewebeproben.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors der Frauenklinik Großhadern danke ich für die freundliche Aufnahme und die geduldige Einführung in die Laborarbeit. Insbesondere Frau Marianne Fileki bin ich für die stets hilfreichen Anregungen im Bereich der Zellkultivierung dankbar.

Schließlich möchte ich meiner lieben Familie für ihr unermüdliches Interesse am Fortgang meiner Dissertation sehr herzlich danken. Alle haben auf ihre Weise in hohem Maße am Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Claudia Zepf

Geb. am 03.11.1973 in Spaichingen

unverheiratet, deutsch

## **Schulische Ausbildung**

1980 - 1984	Grundschule Dürbheim
1984 - 1993	Gymnasium Spaichingen
05/93	Abitur

## **Studium**

10/93 - 09/96	Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg
08/95	Physikum
08/96	Erstes Staatsexamen
10/96 - 05/00	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
03/99	Zweites Staatsexamen
05/00	Drittes Staatsexamen

## **Klinische Tätigkeiten**

04/97	Famulatur in der 1. Universitätsfrauenklinik München
08/97 - 09/97	Famulatur in der Frauenklinik des Kantonsspitals Winterthur
10/98	Famulatur in der Anästhesiol. Abteilung des KKH Waldshut
04/99 - 08/99	PJ-Tertial in der Frauenklinik des Kantonsspitals Baden
08/99 - 12/99	PJ-Tertial in der Medizinischen Klinik des Kantonsspitals Baden
12/99 - 02/00	PJ-Tertial in der Chirurgischen Abteilung des St. Vincent Hospital in New York

## **Studienbegleitende Kurse und Seminare**

10/96 - 02/97	Seminar „Pränatale Diagnostik und gynäkologische Sonographie“ PD Dr. med. T. Schramm, München
10/96 – 02/97	Kurs „Notfälle in der Gynäkologie und Geburtshilfe“, PD Dr. med. G. Debus, Städt. Krankenhaus München-Neuperlach
05/97 – 07/97	Gynäkologischer Nahtkurs, Prof. Dr. med. I. Wachter, Klinikum Großhadern, München
11/98 – 01/00	Chirurgischer Verbands- und Nahtkurs, Prof. Dr. med. G.H. Baumeister, Klinikum Großhadern, München

## **Berufliche Tätigkeit**

07/00 – 02/01	ÄiP in der Medizinischen Klinik des Kantonsspitals Baden, Schweiz
03/01 – 12/01	ÄiP an der Universitätsfrauenklinik Tübingen
01/02 – 08/03	Assistenzärztin an der Universitätsfrauenklinik Tübingen
seit 09/03	Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Herrenberg