

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

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**Untersuchungen zur Regulation von
Interleukin-1 β (IL-1 β), Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-
CSF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
in humanem Endometrium**

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

vorgelegt von
Kirsten Daniela Braunstein
aus Tübingen

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. L. J. Wurzinger
Prof. Dr. E.-M. Grischke

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

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhard

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2007

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	9
2.1	<i>Patienten und Probenmaterial</i>	9
2.2	<i>Entnahme der Proben</i>	9
2.3	<i>Datierung der Proben</i>	10
2.4	<i>Kultur endometrialer Zellen</i>	10
2.4.1	Aufbereitung der Zellen für die Kultur	10
2.4.2	Anlage der Stromazellkulturen.....	11
2.4.3	Anlage der Epithelzellkulturen	13
2.5	<i>Ablösung der Zellen aus den Kulturschalen</i>	13
2.5.1	Ablösung der Epithelzellen	13
2.5.2	Ablösung der Stromazellen.....	14
2.6	<i>Stimulation endometrialer Zellen</i>	14
2.6.1	Stimulation mittels Hypoxie.....	15
2.6.2	Stimulation mittels Interleukin-1 β und Interleukin-6	16
2.6.3	Stimulation mittels 17- β -Östradiol und Progesteron	16
2.6.4	Stimulation mittels β -Östradiol- und Progesteronentzug.....	17
2.7	<i>Endometriale RNA-Analyse</i>	18
2.7.1	RNA-Isolierung	18
2.7.2	RNAse Protection Assay	19
2.8	<i>Messung und Statistik</i>	22
3	Ergebnisse	23
3.1	<i>Charakterisierung der Zellkulturen</i>	23
3.2	<i>Stimulation epithelialer und stromaler Zellen</i>	23
3.2.1	Stimulation mittels 17 β -Östradiol und Progesteron	24

3.2.2	Stimulation mittels Entzug von β -Östradiol / Progesteron.....	28
3.2.3	Stimulation mittels Zytokinen.....	31
3.2.4	Stimulation mittels Hypoxie.....	38
4	Diskussion.....	45
4.1	<i>Endometriale Dysregulation als Ursache der Infertilität.....</i>	<i>45</i>
4.2	<i>Grundlagen der Implantation.....</i>	<i>46</i>
4.3	<i>Endometriale Expression und Funktion von VEGF.....</i>	<i>47</i>
4.4	<i>Endometriale Expression und Funktion von IL-1-β.....</i>	<i>51</i>
4.5	<i>Endometriale Expression und Funktion von G-CSF.....</i>	<i>53</i>
4.6	<i>Regulation durch 17-β-Östradiol und Progesteron.....</i>	<i>55</i>
4.6.1	<i>Regulation von VEGF, IL-1-β und G-CSF durch Hormonstimulation und Hormonentzug.....</i>	<i>56</i>
4.7	<i>Regulation durch Zytokine.....</i>	<i>57</i>
4.7.1	<i>Regulation von VEGF durch die Zytokine IL-1β und IL-6.....</i>	<i>58</i>
4.7.2	<i>Regulation von IL-1β durch die Zytokine IL-1β und IL-6.....</i>	<i>59</i>
4.7.3	<i>Regulation von G-CSF durch die Zytokine IL-1β und IL-6.....</i>	<i>60</i>
4.8	<i>Regulation durch Hypoxie.....</i>	<i>61</i>
4.8.1	<i>Regulation von VEGF durch Hypoxie.....</i>	<i>61</i>
4.8.2	<i>Regulation von IL-1β und G-CSF durch Hypoxie.....</i>	<i>63</i>
5	Zusammenfassung.....	64
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Danksagung.....	77
8	Lebenslauf.....	78

1 Einleitung

Das menschliche Endometrium unterliegt einer Reihe sorgfältig kontrollierter Veränderungen, die zu Proliferation, Sekretion und schließlich zum Abstoßen der Schleimhaut während der Menstruationsblutung führen. Im Rahmen dieses physiologischen Prozesses wird das Endometrium durch das Zusammenspiel einer Reihe verschiedener Mechanismen auf die Implantation vorbereitet (Tabibzadeh und Babaknia 1995). Die Implantation stellt einen für den Erhalt der Schwangerschaft essentiellen, jedoch äußerst komplexen Vorgang dar, zu dessen Beginn eine Interaktion des sich in Entwicklung befindenden Embryos und der Plazenta mit dem Endometrium unabdingbar ist. Die Notwendigkeit eines rezeptiven Endometriums für die erfolgreiche Implantation des Embryos wurde bereits anhand tierexperimenteller Studien und empirischer klinischer Erkenntnisse postuliert (Psychoyos 1986 und 1993), welche gezeigt hatten, dass das Endometrium verschiedene Entwicklungsstadien durchläuft. Im Einzelnen sind dies eine rezeptive, eine nicht rezeptive, eine refraktäre, sowie eine neutrale Phase.

Einige Autoren gehen dabei davon aus, dass, wie im Tiermodell bereits nachgewiesen werden konnte, auch beim Menschen ein sogenanntes Implantationsfenster existiert, während dessen das Endometrium empfänglich für die Einnistung der Blastozyste wird (Navot et al. 1984, 1986, 1991; Paulson et al. 1990, Psychoyos 1993, Tabibzadeh und Babaknia 1995). Darauf folgt eine sogenannte nicht rezeptive Phase, während der das Endometrium refraktär für den Implantationsprozess wird (Psychoyos 1993). Findet keine Implantation statt oder schlägt diese fehl kommt es zum Auftreten der Menstruation und damit zum Abstoßen des Endometriums.

Die Implantation beruht auf exakt gesteuerten Mechanismen. Durch eine große Anzahl fundierter Studien konnte die essentielle Bedeutung der endokrinen Regulation im Sinne eines steroidhormongesteuerten Primings des Endometriums für die Implantation gezeigt werden (Psychoyos 1973). Jedoch haben jüngste Erkenntnisse gezeigt, dass die Implantation des Embryos auch einen bemerkenswerten parakrinen Prozess darstellt, welcher auf reziproken embryo-

uterinen Interaktionen beruht (Simon et al. 2000). Darüber hinaus fungieren parakrine Effektoren, wie z.B. Zytokine, als Mediatoren der Steroidhormone. Diese Regulatoren steuern über komplizierte interzelluläre Regelkreise die Kommunikation zwischen Embryo und endometrialen Epithel- und Stromazellen (Simon et al. 2000).

Eine wichtige Funktion kommt hierbei dem Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu, welcher eine wichtige Funktion bei der Regulation von Wachstum und Entwicklung der endometrialen Gefäße einnimmt und somit eine Schlüsselrolle in der Ausbildung eines rezeptiven Endometriums als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Implantation spielt (Torry et al. 1996). VEGF vermittelt seine Wirkung Rezeptor-gesteuert, diese VEGF-spezifischen Rezeptoren konnten außer auf endometrialen Endothelzellen auch auf Monozyten, Trophoblasten und Spermatozoen nachgewiesen werden (Weston und Rogers 2000, Obermaier et al. 1999). Der zell- und zyklusspezifische Verlauf der VEGF-Expression im humanen Endometrium und in der Plazenta stellt einen weiteren wichtigen Hinweis für die Bedeutsamkeit des Wachstumsfaktors bezüglich Ausbildung eines rezeptiven Endometriums, sowie der materno-fetalen Interaktion in der Präimplantationsphase dar (Shifren et al. 1996). Wenn auch die genauen Regulationsmechanismen noch weitgehend ungeklärt sind, so existieren dennoch einige Studien, welche auf eine steroidhormonvermittelte Regulation (Weston und Rogers 2000, Shifren et al. 1996), auf eine gesteigerte Expression unter hypoxischen Bedingungen (Sharkey et al. 1999), sowie auf eine Interaktion mit verschiedenen Zytokinen hinweisen.

Das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) mit seinen beiden Untereinheiten IL-1 α und IL-1 β , ist ebenfalls in wichtige reproduktive Vorgänge involviert. Auch hier ließ sich ein zyklusspezifischer Verlauf der Expression von IL-1 β mit einem Anstieg der mRNA-Sekretion zum Zeitpunkt der Implantation nachweisen (von Wolff et al. 2000), was die Vermutung nahe legt, dass IL-1 β eine wichtige Rolle bei der Implantation der Blastozyste innehat. Bestätigt wird dies durch die Korrelation von Implantationsstörungen mit einer supprimierten Expression des Zytokins (Simon et al. 1998).

Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), ein Wachstumsfaktor, welcher aufgrund seiner hämatopoetischen Funktion v.a. in der Onkologie therapeutisch eingesetzt wird, scheint ebenfalls eine wichtige Funktion im Bereich der utero-plazentaren Regulationsvorgänge zu spielen, wobei einige Arbeiten eine enge Verknüpfung von G-CSF mit IL-1 β andeuten.

Um eine Aussage über den Einfluss wichtiger endometrialer Regulationsmechanismen auf die Sekretion der drei beschriebenen Zytokine treffen zu können, untersuchten wir am Kulturmodell die Auswirkungen von Steroidhormonstimulation und -entzug, Stimulation mittels der Zytokine IL-1 β und IL-6, sowie hypoxischer Bedingungen auf die Expression der verschiedenen mRNAs.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Probenmaterial

Die Entnahme von Probenmaterial erfolgte im Rahmen von Hysterektomien bei 20 Patientinnen im Alter zwischen 35 und 52 Jahren.

Die ausschließlich prämenopausalen Patientinnen wurden am Vortag der Operation, entsprechend des Votums der Ethikkommission über das Projekt aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Probenentnahme, deren Voraussetzung ein regelmäßiger Menstruationszyklus war. Patientinnen, bei denen der Verdacht auf Malignität bzw. neoplastische Prozesse gegeben war, wurden von der Studie ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren eine Hormonsubstitutionstherapie in den vergangenen drei Monaten sowie ein Intrauterinpeessar.

2.2 Entnahme der Proben

Die Proben wurden in Absprache mit dem zuständigen Pathologen unmittelbar im Operationssaal unter sterilen Bedingungen entnommen. Dabei wurde zunächst mit einem Previcalkatheter (Nourypharma, Oberschleißheim, Deutschland) das Cavum uteri sondiert. Dieser diente im Folgenden als Leitschiene für die Eröffnung des Uterus. Es erfolgte die Entnahme von Gewebe für die Zellkultur. Das Endometrium wurde mittels eines Skalpells kürettiert und in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben, das bereits 4 ml Kulturmedium enthielt. Das Kulturmedium bestand für alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturen aus DMEM/F12 HAM Nährmedium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (Gibco, Eggenstein, Deutschland), 0,2% Imipenem und Cilastatin (Zienam 500, MSD Sharp & Dome, Haar, Deutschland) und 4% Nystatin (100.000IE/l) (Lederle Arzneimittel, Wolfratshausen, Deutschland).

Der Transport ins Labor zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei 20°C und dauerte ca. eine Stunde.

Des Weiteren wurde der Patientin durch Punktion einer Vene 10 ml Blut abgenommen, aus welchem im Institut für Klinische Chemie die Bestimmung der Serumspiegel von Östrogen und Progesteron erfolgte.

2.3 Datierung der Proben

Die Datierung der Gewebeproben erfolgte mit Hilfe der vorliegenden Daten aus der Zyklusanamnese der betreffenden Patientinnen, sowie mittels histologischer Kriterien und mittels der Hormonspiegel im Serum der Patientin zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Die bei der Probenentnahme gewonnenen Gewebelöckchen wurden in Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet. Hieraus wurden mit dem Kryotom Schnitte mit einer Dicke von 10 µl angefertigt, welche nachfolgend mit Toluidinblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angefärbt wurden. Eine histologische Datierung der Proben erfolgte nach Noyes et al. (1950).

Weiterhin erfolgte im Institut für Klinische Chemie anhand der ebenfalls bei der Materialentnahme gewonnenen Serumproben der Patientinnen eine Hormonspiegelbestimmung von Östradiol, Progesteron und luteinisierendem Hormon.

2.4 Kultur endometrialer Zellen

2.4.1 Aufbereitung der Zellen für die Kultur

Zuerst wurde der gesamte Inhalt des Transportgefäßes in eine sterile Petrischale aus Glas überführt. Dann erfolgte die mechanische Zerkleinerung des endometrialen Gewebes mittels Skalpell in ca. 1mm³ große Stücke. Anschließend wurde Kollagenase Typ IA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit einer Aktivität von 400 U/mg zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,153 % erreicht wurde. Nach gründlicher Durchmischung und einer Überführung der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche erfolgte die einstündige enzymatische Andauung im Wasserbad bei 20°C.

Im Anschluss an die mechanische Auftrennung erfolgte die Filtration der Zellen. Im ersten Filtrationsschritt wurde zunächst unverdautes Gewebe, sowie Überreste von Schleim und Myometrium entfernt. Hierbei wurde die Zellsuspension auf ein Nylonsieb der Porengröße 180 μm (Millipore, Bedford, MA, USA) gegeben, anschließend wurde mit 5 ml Kulturmedium nachgespült, wodurch die Ausbeute an Epithel- und Stromazellen im Filtrat erheblich gesteigert werden konnte. Der zweite Filtrationsschritt diente der Auftrennung von Epithel und Stromazellen. Hierfür wurde ein Filter der Porengröße 40 μm (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Die epithelialen Drüsenschläuche blieben im Filter zurück, während Stromazellen, Erythrozyten, sowie verschiedene Immunzellen diesen passieren konnten.

Die abgetrennten Epithelzellen wurden durch mehrfache Waschschrte mit Kulturmedium von Kollagenaseresten befreit und schließlich in Kulturmedium resuspendiert.

Die Stromazellen, die sich im Filtrat befanden, wurden ebenfalls mehrfach mit Kulturmedium gewaschen und anschließend resuspendiert.

2.4.2 Anlage der Stromazellkulturen

Unmittelbar im Anschluss an die Filtration wurden die Stromazellen mit Hilfe eines immunmagnetischen Verfahrens von verschiedenen Immunzelllen gereinigt. Hierfür wurden Dynabeads (DynaI, Hamburg, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um magnetische Polystyrolteilchen, die mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern beschichtet sind.

Die Reinigung erfolgte durch die Isolierung von Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, Makrophagen und Monozyten. Hierfür wurden spezifische antikörperbeschichtete Beads eingesetzt, wie aus unten stehender Tabelle (Tab. 1) hervorgeht.

Dynabeads	CD 14	CD 31	CD 45	MAB Ber-EP 4
Isolierte Zellart	Monozyten/ Makrophagen	Endothelzellen	Leukozyten	Epithelzellen

Tabelle 1: verwendete Antikörper zur Beschichtung der Beads

Vor jedem Isolierungsschritt wurden die Beads in sterilem PBS-Puffer (Gibco, Eggenstein, Deutschland) gewaschen, anschließend am Magneten getrocknet und in ihrer ursprünglichen Konzentration in PBS resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 12,5 µl der Beadssuspension in zwei sterile Reaktionsgefäße gegeben und erneut am Magneten getrocknet.

Um eine Bindung der Antikörper an die Antigene der zu isolierenden Zellen zu erreichen, wurden jeweils 25 µl der Beadssuspension mit einer Konzentration von 10^8 Beads/ml zu der vorgekühlten Zellsuspension in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 10 Minuten rotierend bei 4°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Abtrennung der verschiedenen Zellen. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst durch Zugabe von 1 ml PBS-Puffer verdünnt und anschließend in das magnetische Feld gebracht. Dabei lagerten sich die an magnetische Beads gebundenen Zellen zusammen mit diesen magnetischen Teilchen an der Wand des Reaktionsgefäßes ab. Die gereinigten Stromazellen verblieben im Überstand. Dieser wurde in ein weiteres steriles Gefäß überführt. Durch erneute Positionierung der Zellsuspension am Magneten konnte der Reinheitsgrad der Stromazellen noch erhöht werden. Die gereinigten Stromazellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgestreut. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

Durch einen ersten Mediumwechsel 24 Stunden nach Einstreuen der Zellen in die Kulturflasche konnte bereits ein Großteil der im Kulturmedium befindlichen Erythrozyten und Epithelzellen eliminiert werden.

Zur weiteren Reinigung der Kultur von Fremdzellen wurde 48 Stunden nach Kulturanlage eine Passagierung der Stromazellen durchgeführt.

Begonnen wurde mit dem Abpipettieren des Mediums, worauf zwei Spülschritte mit sterilem PBS-Puffer folgten. Die Ablösung des konfluenten Zellrasens vom Boden der Kulturflasche erfolgte schließlich durch Benetzen des Bodens mit 1,5 ml Trypsin (10%) (Gibco, Eggenstein, Deutschland) und einer nachfolgenden Inkubation über 10 Minuten bei 37°C. Zum Zeitpunkt der vollständigen Ablösung des Zellrasens wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 8,5 ml FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt. Während der anschließenden Zentrifugation wurde die Zellzahl in der Neubauer-Kammer ermittelt. Nach Verwerfung des trypsinhaltigen Überstandes und einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in einer

Zelldichte von 100.000 Zellen pro Vertiefung in eine 24-Well-Platte (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) eingestreut.

Der Kultivierungsbeginn der Stromazellen (Tag 0) ist für alle weiteren Untersuchungen mit dem Zeitpunkt der Passagierung gleichzusetzen.

2.4.3 Anlage der Epithelzellkulturen

Zur Vermeidung einer vorzeitigen Gelierung des phenolrotfreien Matrigels (Beckton-Dickinson, Bedford, NJ, USA) wurde stets mit bei 4°C gekühlten Instrumenten und Medien gearbeitet. Zunächst wurden mit einer sterilen Pinzette Kultureinsätze des Typs Millicell CM (Millipore, Bedford, NJ, USA), in welche Filter der Porengröße 0,4 µm eingelassen waren, in eine 24-Well-Kulturplatte (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gelegt. Das 4°C kalte und somit visköse Matrigel wurde mit FCS-freiem Medium im Verhältnis 1:4 verdünnt. Anschließend beschichteten wir die Einsätze mit jeweils 100 µl Matrigel. Die Gelierung des Matrigels erfolgte im Brutschrank bei 37°C über eine Zeit von 90 Minuten. Die gereinigten und filtrierten epithelialen Drüsenschläuche wurden in 3,2 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde auf jeden der Kultureinsätze 200 µl Zellsuspension aufgetragen. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf die 14 verschiedenen Kultureinsätze wurde erreicht, indem die Zellsuspension vor jeder Entnahme mit der Pipette aufgewirbelt wurde. Um ein zweikammriges Kultursystem für die Kultivierung der epithelialen Drüsenschläuche zu erhalten, wurden anschließend je 500 µl Medium in jede Vertiefung der Kulturplatte pipettiert.

2.5 Ablösung der Zellen aus den Kulturschalen

2.5.1 Ablösung der Epithelzellen

Um eine möglichst vollständige Ablösung der Drüsenschläuche aus den Kulturschalen zu erreichen, erfolgte diese mit Hilfe von Trypsin. Die Inaktivierung durch im Medium vorhandene Proteasen wurde vermieden, indem zunächst überschüssiges Medium aus den Kultureinsätzen entfernt wurde. Anschließend erfolgte die zweimalige Spülung der Einsätze mit je 250 µl PBS-Puffer. Sowohl

Medium als auch PBS-Puffer wurden nicht verworfen, sondern in einem Reaktionsgefäß aufgefangen, so dass gewährleistet war, dass hierbei keine Zellen verloren gehen konnten. Durch 10-minütige Inkubation mit jeweils 100 µl Trypsin bei 37°C konnte eine vollständige Ablösung der Epithelzellen erreicht werden. Zum Zeitpunkt der vollständigen Ablösung bewirkte die Zugabe von 400 µl Medium die Beendigung der Enzymaktivität. Die erhaltene Zellsuspension wurde danach zentrifugiert (RZB g=74). Noch anhaftende Enzymreste konnten durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt werden. Anschließend wurde mit der Präparation der RNA begonnen.

2.5.2 Ablösung der Stromazellen

Zunächst wurde das sich in der Kulturschale befindliche Medium abpipettiert. Darauf folgten zwei Spülschritte mit je 500 µl sterilem PBS-Puffer. Nun wurde der Boden der Kulturschalen mit 150 µl Trypsin benetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde durch Zugabe von 850 µl Kulturmedium eine Inaktivierung des Enzyms erreicht. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation separiert und durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer gereinigt. Daran schloss sich die Isolierung der RNA an.

2.6 Stimulation endometrialer Zellen

Sämtliche Stimulationsversuche wurden durchgeführt, sobald die kultivierten Zellen ein konfluierendes Wachstum zeigten. Dies war meist am Tag 3 nach Anlegen der Kultur gegeben. Um einen stimulierenden Effekt von im FCS enthaltenen Hormonen auf die Zellen auszuschließen, wurden diese vor Beginn der Stimulationsversuche zunächst 24 Stunden lang mit Medium kultiviert, das FCS lediglich in einer Konzentration von 1% enthielt.

2.6.1 Stimulation mittels Hypoxie

Von sechs Gewebeproben wurden jeweils sechs Epithel- und sechs Stromazellkulturansätze angelegt, die mittels Hypoxie stimuliert wurden. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen in speziellen Kulturschalen (petriPerm 50 hydrophil, InVitro Systems & Services, Osterode, Deutschland), deren Boden aus gasdurchlässiger Folie bestand.

Die Zellen wurden jeweils in Doppelbestimmung über 6 Stunden bzw. 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen kultiviert (37°C, 2% O₂, 5% CO₂), gleichzeitig wurden zwei Kontrollen bei Normbedingungen (37°C, 21% O₂, 5%CO₂) mitgeführt (Tab. 2).

Hypoxie: H6: 2% O₂ über 6 Stunden
H24: 2% O₂ über 24 Stunden

Epithel	Stroma
H6	H6
H24	H24
Kontrolle	Kontrolle

Tabelle 2: Versuchsschema Hypoxie

2.6.2 Stimulation mittels Interleukin-1 β und Interleukin-6

Bei insgesamt sieben Gewebeproben erfolgte in jeweils zehn epithelialen und stromalen Kulturansätzen die Stimulation mit IL-1 β und IL-6. Die rekombinanten Zytokine (beide R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurden hierbei in genau definierter Konzentration dem Medium sowohl einzeln als auch in Kombination zugesetzt (Tab. 3)

Interleukin-1 β : 10 ng/ml

Interleukin-6: 10 ng/ml

Epithel 6 Stunden	Epithel 24 Stunden	Stroma 6 Stunden	Stroma 24 Stunden
IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β
IL-6	IL-6	IL-6	IL-6
	Kontrolle		Kontrolle

Tabelle 3: Versuchsschema Zytokinstimulation

2.6.3 Stimulation mittels 17- β -Östradiol und Progesteron

Von zehn Gewebeproben wurden Epithel- und Stromakulturen zu je 14 Ansätzen angelegt, die anschließend mit 17- β -Östradiol und Progesteron (beide Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hormonell stimuliert wurden.

Zu Beginn der Stimulationsversuche wurden die Hormone dem Kulturmedium mit 1% FCS sowohl einzeln als auch in Kombination zugesetzt, so dass folgende Konzentrationen erreicht wurden:

17- β -Östradiol: **Ö** 272 pg/ml = 10⁻⁹M

Progesteron: **P** 31 ng/ml = 10⁻⁷M

Die Stimulation der Kultureinsätze erfolgte nun über sechs bzw. 24 Stunden, wobei jeder Versuch in Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Tab. 4).

Epithel 6 Stunden	Epithel 24 Stunden	Stroma 6 Stunden	Stroma 24 Stunden
Ö	Ö	Ö	Ö
P	P	P	P
Ö+P	Ö+P	Ö+P	Ö+P
	Kontrolle		Kontrolle

Tabelle 4: Versuchsschema Hormonstimulation

Nach Ablauf der Stimulationsversuche wurden die Überreste abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Die Zellen wurden aus den Kulturschalen abgelöst, wie in Kapitel 2.5 beschrieben.

2.6.4 Stimulation mittels β -Östradiol- und Progesteronentzug

Von sechs weiteren Gewebeproben wurden Epithel- und Stromazellkulturen zu je 14 Ansätzen angelegt. Hierbei wurde zur initialen Kultivierung der Zellen bereits ein Kulturmedium verwendet, welches $17\text{-}\beta\text{-Östradiol}$ (10^{-9}M) (Ö) und Progesteron (10^{-7}M) (P) enthielt. Zu Beginn des Entzugversuchs wurden die Kultureinsätze mehrmals mit Medium ohne hormonelle Zusätze gespült, um die Zellen von Hormonrückständen zu befreien. Der hormonelle Entzug fand daran anschließend über sechs bzw. 24 Stunden statt (Tab. 5).

Epithel 6 Stunden	Epithel 24 Stunden	Stroma 6 Stunden	Stroma 24 Stunden
∅ Ö	∅ Ö	∅ Ö	∅ Ö
∅ P	∅ P	∅ P	∅ P
∅ ÖP	∅ ÖP	∅ ÖP	∅ ÖP
	Kontrolle		Kontrolle

Tabelle 5: Versuchsschema Hormonentzug

2.7 Endometriale RNA-Analyse

2.7.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion der RNA erfolgte gemäß eines Protokolls zur RNA-Isolierung unter Verwendung von Trizol.

Dabei wurden pro Probe folgende Chemikalien verwendet:

500 µl Trizol (Gibco, Eggenstein, Deutschland)

320 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (49:1), (beides Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

1,6 µl Glykoblue (Ambion, Austin, Texas, USA)

400 µl Isopropanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

200 µl Ethanol 96%, reinst (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

60 µl RNase freies Wasser (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Zu Beginn der RNA-Isolierung wurden die aus den Kulturschalen abgelösten Zellen zunächst durch Zugabe von 800 µl Trizol lysiert. Anschließend wurde das Material durch zweimaliges Aufziehen mit einer Kanüle (25 G) homogenisiert. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch wurden die Proben kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert (RZB $g=12000$, 4°C, 10 Minuten). Dabei bildeten sich drei verschiedene Phasen aus: obere wässrige Phase, mittlere Interphase, untere Phenol und Chloroform enthaltende Phase. Die extrahierte RNA befand sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase, welche vorsichtig abpipettiert, in ein frisches RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 2-3 Stunden auf eine Temperatur von -20°C gebracht wurde. Anschließend erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 400 µl eiskaltem Propanol. Dabei wurden dem Gemisch zusätzlich 1,6 µl Glykoblue zugesetzt, wodurch die RNA nach erneuter Zentrifugation (RZB $g=12000$, 4°C, 15 Minuten) als blaues Pellet am Boden des Gefäßes sichtbar wurde. Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurde das Pellet erneut in 60 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 60 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm. Dabei war die Extinktion bei 260 nm der Menge der in der Probe enthaltenen RNA direkt proportional. Die Bildung des

Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm diente zur Beurteilung der Reinheit der RNA.

2.7.2 RNase Protection Assay

Die Durchführung des RNase Protection Assays erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen RiboQuant-Multi-Probe RNase Protection Assay System (PharMingen, San Diego, CA, USA) (Abb. 1).

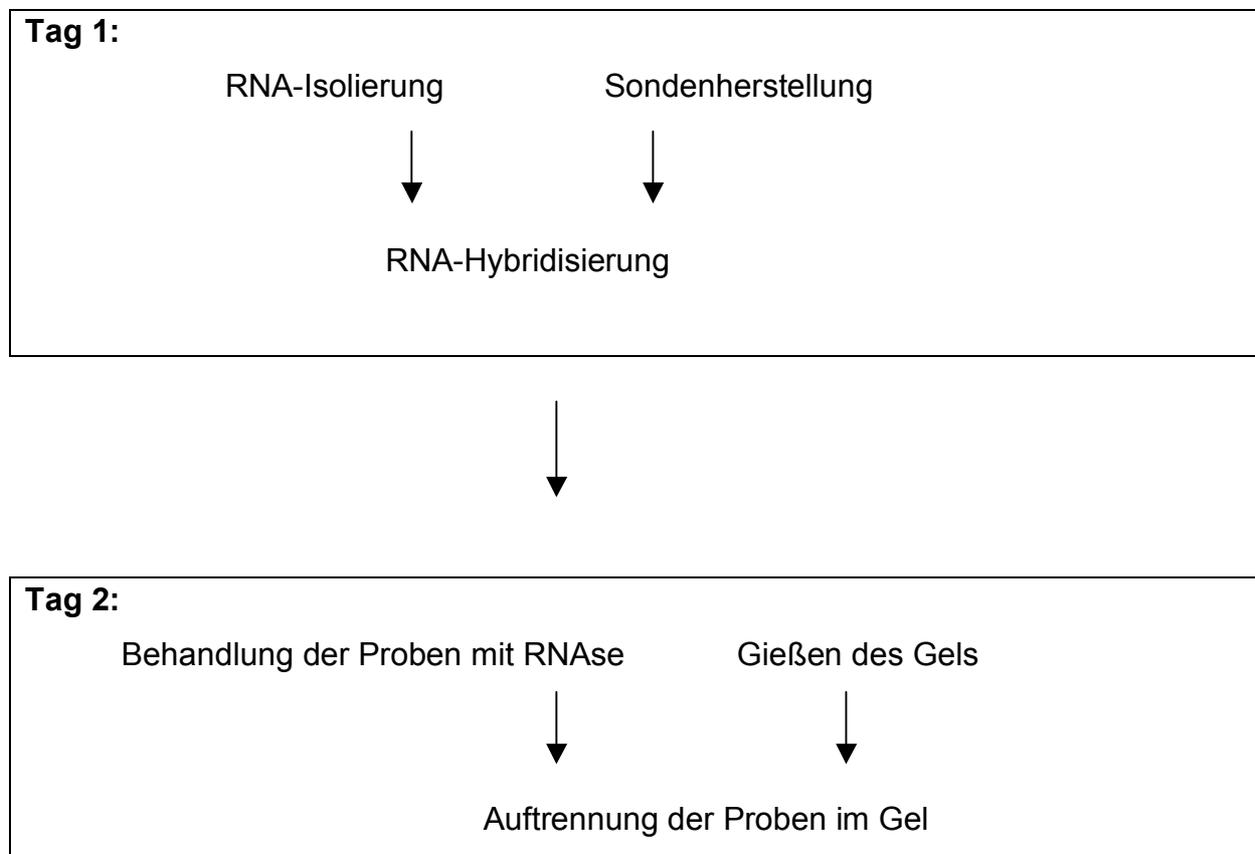


Abbildung 1: Ablauf des RNase Protection Assays

2.7.2.1 Sondenherstellung

Die folgenden Reagenzien werden in ein 1,5 ml Reagenzgefäß gegeben, mit der Pipette vermischt und kurz anzentrifugiert:

- 1 µl RNAsin
- 1 µl GACU pool
- 2 µl DTT
- 4 µl 5X Transkriptionspuffer
- 1 µl RPA Template Set
- 10 µl [α -³²P]UTP
- 1 µl T7 RNA Polymerase

Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 2 µl DNase. Die Probe wurde ebenfalls vermischt und anzentrifugiert, worauf ein neuer Inkubationsschritt von 30 Minuten bei 37°C folgte.

Anschließend wurden folgende Reagenzien nacheinander zugegeben, zu einer Emulsion vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert:

- 26 µl 20mM EDTA
- 25 µl dreifach gesättigtes Phenol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 25 µl Chloroform-Isoamylalkohol (50 :1) (beides Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 2 µl Hefe- RNA

Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 50 µl 4M Ammoniumacetat und von 250 µl eiskaltem 100%igem Alkohol wurden die Gefäße kurz geschüttelt, für 30 Minuten bei -70°C inkubiert und erneut zentrifugiert (15 Minuten, 4°C). Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und durch 100µl 90%igen Alkohol ersetzt. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 4°C) und Entfernung des Überstands wurde das Pellet 5-10 Minuten luftgetrocknet, anschließend in 50 µl Hybridisierungspuffer gelöst und kurz anzentrifugiert. Bis zum endgültigen Verbrauch wurde die Sonde bei -20°C aufbewahrt.

2.7.2.2 RNA Hybridisierung

Zunächst wurde die RNA Probe in der Vakuumzentrifuge getrocknet, anschließend in 8 µl Hybridisierungspuffer gelöst und kurz zentrifugiert.

Die Sonde wurde mit Hybridisierungspuffer 1:6 verdünnt, wovon 2 µl zu jeder RNA Probe hinzugefügt wurden. Nach Zugabe eines Tropfens Mineralöl pro Probe erfolgte eine weitere kurze Zentrifugation, bevor die Proben in einem vorgeheizten Heizblock bei 56°C über Nacht (12-16 Stunden) inkubiert wurden.

2.7.2.3 Behandlung der Proben mit RNase

Durch das Hinzufügen von RNase wurden nicht hybridisierte RNA sowie freie Sondenreste gespalten. Die zuvor hybridisierte RNA konnte hingegen nicht verdaut werden und blieb somit erhalten.

Zur Herstellung des RNase Gemischs wurden zunächst 2,5µl RNase Puffer und 6µl RNase A+T1 Mix vermischt und jeweils 100 µl des Gemischs zu den RNA Proben zugegeben. Anschließend wurden die Proben 30 Sekunden zentrifugiert und 45 Minuten bei 30°C inkubiert.

Durch Zugabe von Proteinase K wurde die RNase Reaktion gestoppt.

Dazu wurde ein Gemisch aus folgenden Reagenzien hergestellt:

390 µl Proteinase K Puffer

30 µl Proteinase K

30 µl Hefe t-RNA

Nach Zugabe von jeweils 18 µl Proteinase K-Gemisch pro RNA Probe wurden diese zunächst kurz anzentrifugiert und schließlich 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Isolierung der nicht gespaltenen, RNase geschützten RNA, wurden 65 µl Phenol, sowie 65 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch zugefügt. Die Proben wurden dann 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 120 µl 4M Ammoniumacetat und von 650 µl eiskaltem 100%igem Ethanol wurden die Proben erneut 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend 30 Minuten bei -70°C inkubiert. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 100 µl

eiskaltem 10%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abpipettiert und das Pellet vollständig luftgetrocknet. Schließlich wurden die Proben in 5 µl Loading-Puffer gelöst, unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel 3 Minuten auf 90°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt.

2.7.2.4 Auftrennung im Gel

Mit Hilfe eines Sequenziergel-Apparates (Sequi-Gen GT Sequenzing Cell, Biorad, San Diego, CA, USA) erfolgte die Auftrennung der Probe im Gel.

Unter Verwendung von FBE-Puffer und Harnstoff wurde ein Sequenziergel mit einer Konzentration von 5% Acrylamid gegossen. Nach einem Gelvorlauf von einer Stunde in einfach konzentriertem TBE-Puffer bei 40 Watt wurde das Gel mit den Proben beladen und für weitere zwei Stunden laufen gelassen (Lauflänge ca. 30cm). Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier gezogen und bei 80°C eine Stunde getrocknet.

Anschließend wurde das Gel für jeweils einen, drei und sieben Tage auf einen Röntgenfilm (BioMax MS, Kodak, Rochester, NY, USA) gelegt, wobei zur Expositionsverstärkung eine Verstärkerfolie verwendet wurde.

2.8 Messung und Statistik

Zur Quantifizierung der RNase geschützten Banden wurden diese densitometrisch erfasst (BioRad, San Diego, CA, USA) und mittels Flächenberechnung quantifiziert.

Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erreichen und unterschiedliche RNA-Mengen auszugleichen, wurde eine Semiquantifizierung durch die Division der Bandengröße mit der im Assay mitgeführten Housekeeping Gene GAPDH und L32 durchgeführt. Die relativen Werte wurden für die Auswertung herangezogen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2000. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz diente der Wilcoxon-Test. Hierbei wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zellkulturen

Um die Qualität unserer Kultursysteme zu sichern wurde eine profunde immunhistochemische Charakterisierung der epithelialen und stromalen Zellkulturen vorgenommen (von Wolff et al. 2002).

Diese ergab eine Kontamination der Kulturen mit 0-5% Immunzellen, sowie mit 0-2% Endothelzellen. Eine Reinigung der Zellen mittels eines immunmagnetischen Verfahrens führte zu einer Reduktion der Kontamination um ca. 50%.

Um die Verunreinigung der Stromazellen weiter zu reduzieren, werden diese normalerweise mehrere Male passagiert. Da jedoch in mehreren Vorversuchen eine reduzierte Zellfunktion der Stromazellen infolge mehrmaliger Passagierungen nachgewiesen werden konnte, erfolgte nur eine einmalige Passage der Zellen.

Am sechsten sowie am zwölften Kulturtag wurde die Zellvitalität der Epithel- und Stromazellen bestimmt. Diese betrug am sechsten Tag 94-98%, am zwölften Tag 91-97%, hierdurch war für die Versuchstage (Tag 2-5) eine ausreichende Zellvitalität gewährleistet.

3.2 Stimulation epithelialer und stromaler Zellen

Die Auswirkungen der oben beschriebenen Stimulationsversuche auf die Expression der Zytokine IL-1 β , G-CSF und VEGF wurde am Zellkulturmodell durch die Untersuchung der Konzentrationsänderung der entsprechenden m-RNA bestimmt. Der hierfür verwendete RNase Protection Assay ist eine Methode, die als äußerst sensitiv und sehr gut reproduzierbar gilt. Da hierbei mehrere Sonden mitgeführt werden können, ist eine Darstellung mehrerer Faktoren in einem Assay gleichzeitig möglich. Unterschiedliche RNA-Beladungen der Proben wurden durch Semiquantifizierung mit Hilfe der im Assay mitgeführten Housekeeping-Gene GAPDH und LP32 ausgeglichen.

3.2.1 Stimulation mittels 17 β -Östradiol und Progesteron

Nachdem die kultivierten Zellen ein konfluierendes Zellwachstum zeigten, was nach drei bis vier Tagen der Fall war, erfolgte die Stimulation mit 17- β -Östradiol (10^{-9} M) sowie mit Progesteron (10^{-7} M). Die Stimulationsdauer betrug bei allen Versuchsansätzen sechs bzw. 24 Stunden.

3.2.1.1 Expression von VEGF, IL-1 β und G-CSF

Durch eine Stimulation mit 17- β -Östradiol und Progesteron zeigten die kultivierten Zellen weder nach sechsständiger, noch nach 24-stündiger Stimulation eine signifikante Änderung der Expression der untersuchten Zytokine (Abb. 2 bis Abb. 7).

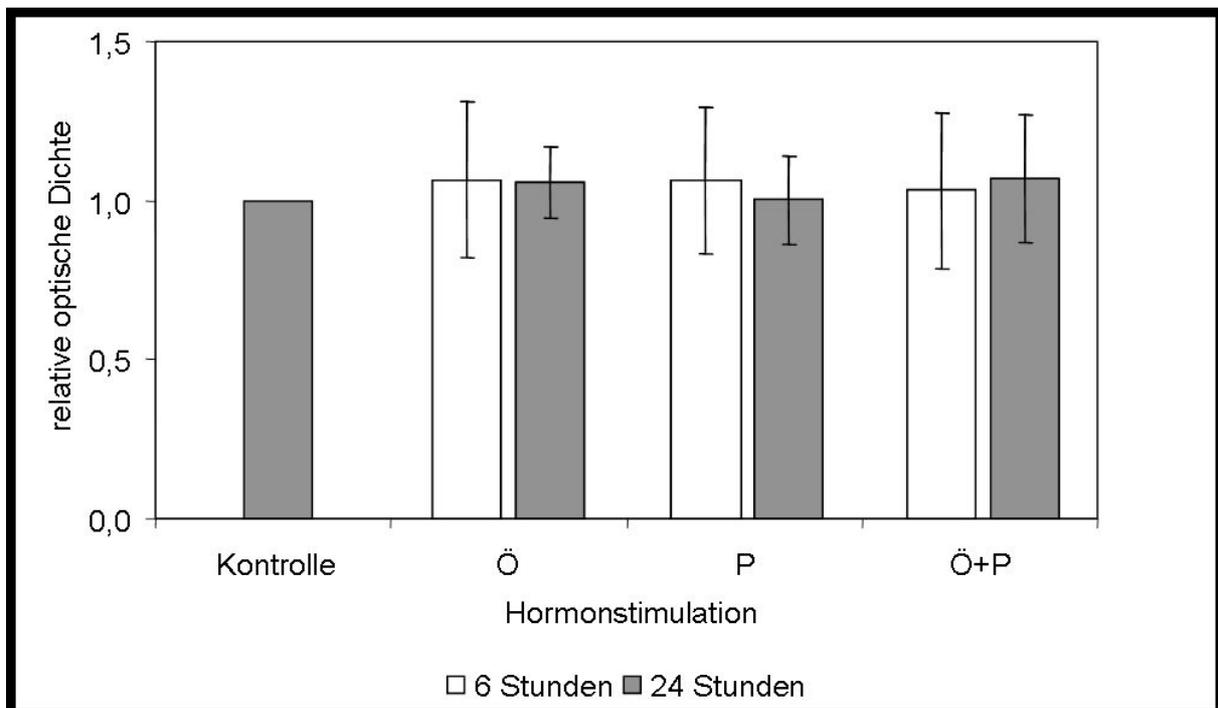


Abbildung 2: Anstieg von VEGF in Epithelzellen bei Hormonstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

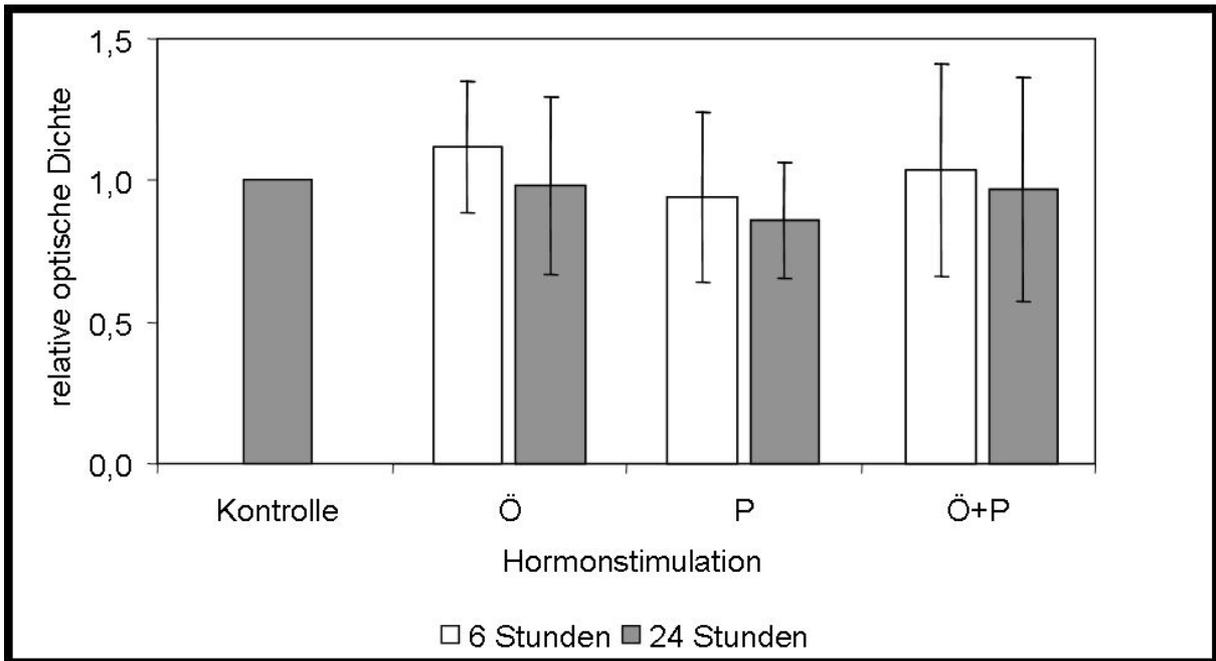


Abbildung 3: Anstieg von VEGF in Stromazellen bei Hormonstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

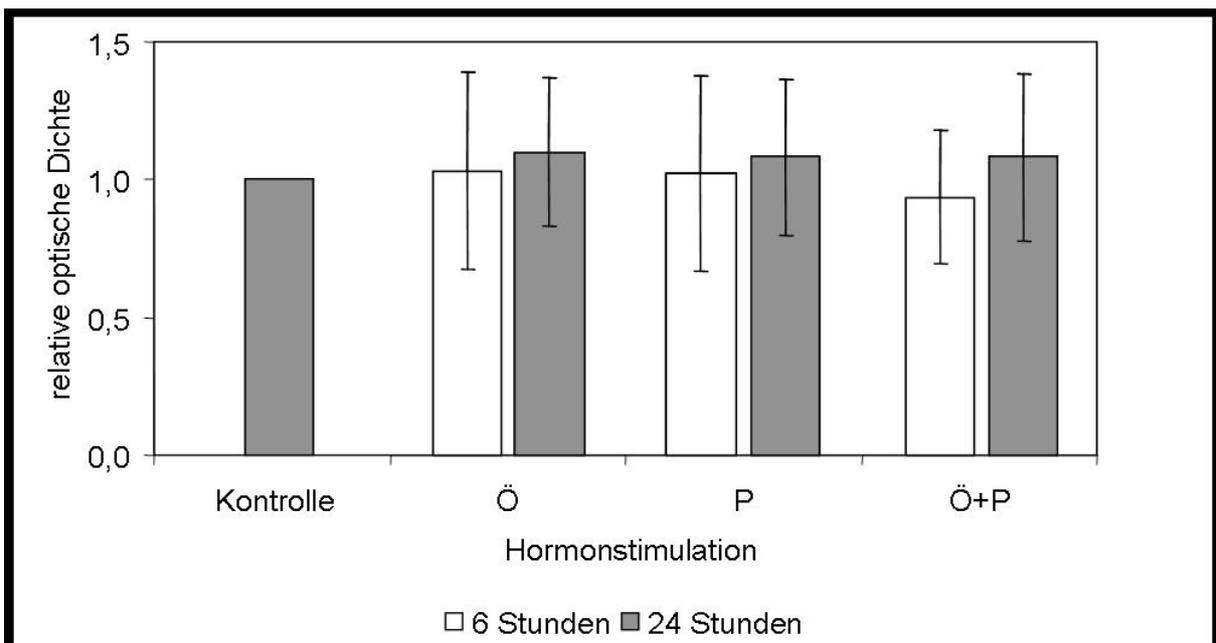


Abbildung 4: Anstieg von IL-1β in Epithelzellen bei Hormonstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

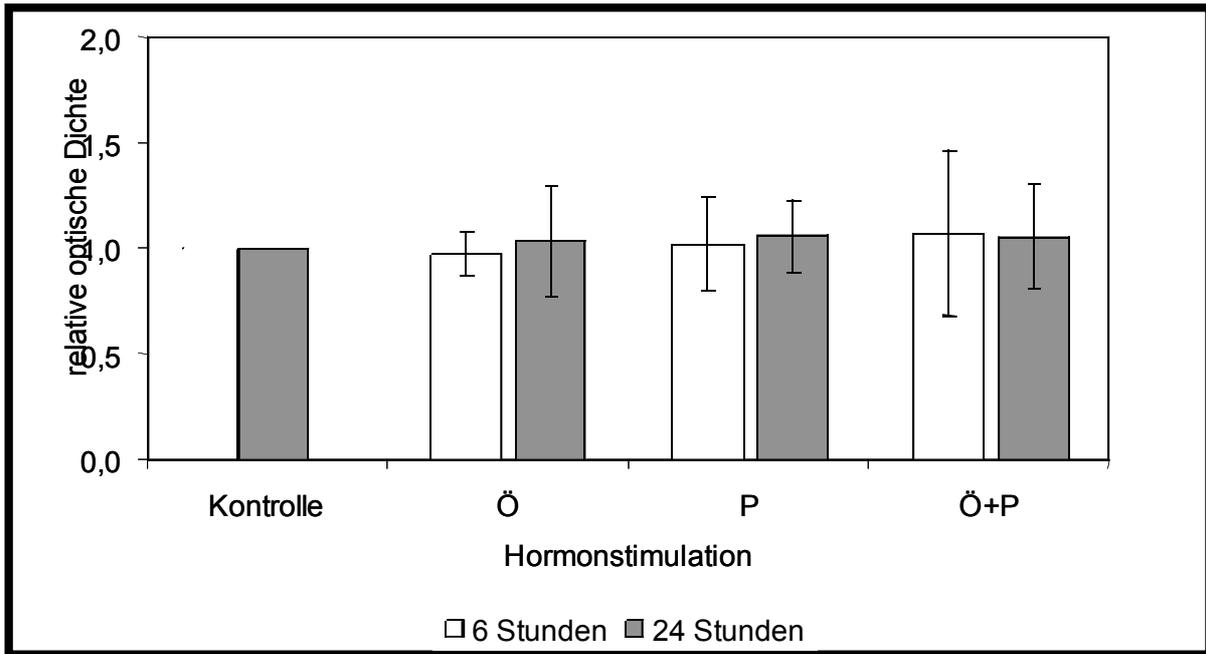


Abbildung 5: Anstieg von IL-1 β in Stromazellen bei Hormonstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

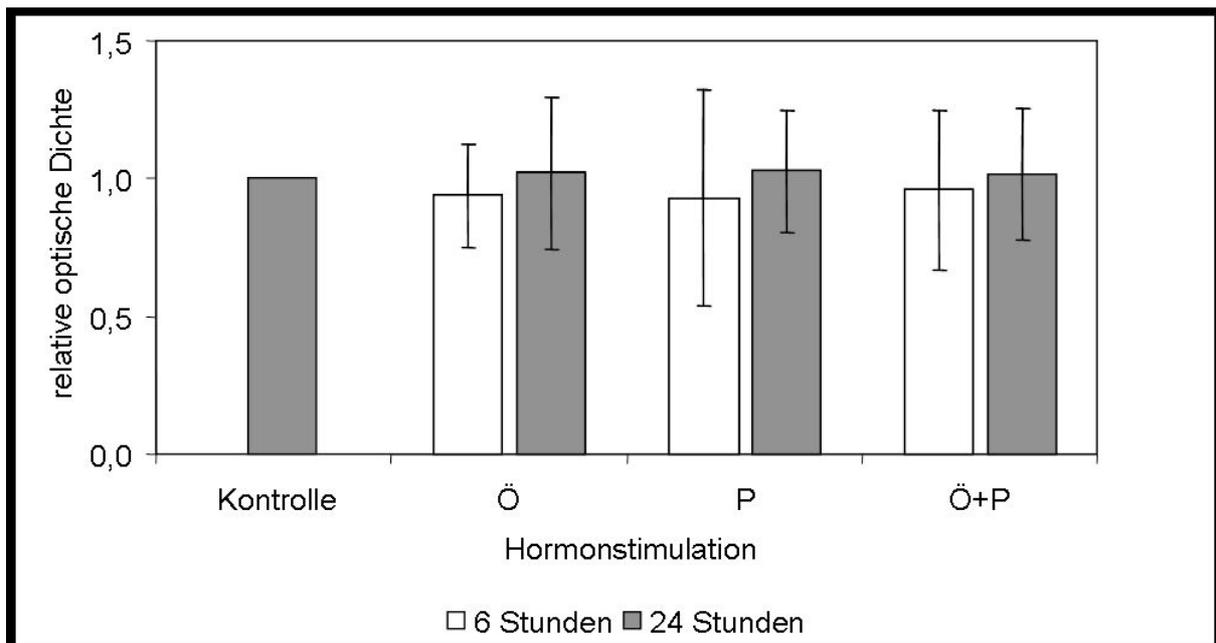


Abbildung 6: Anstieg von G-CSF in Epithelzellen bei Hormonstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

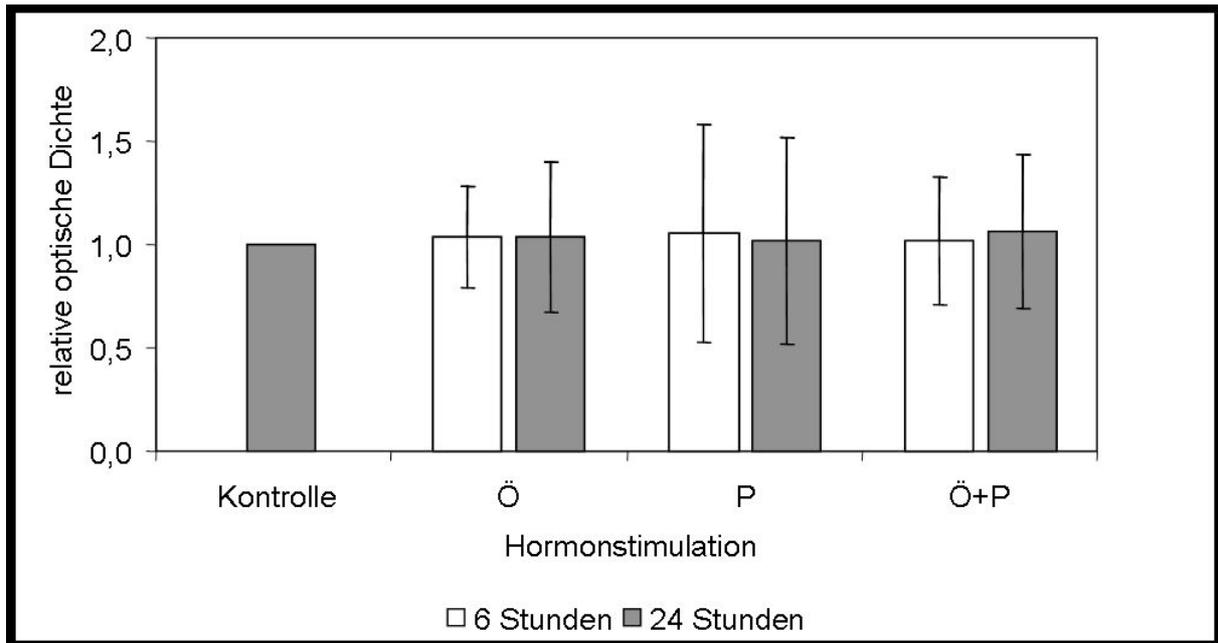


Abbildung 7: Anstieg von G-CSF in Stromazellen bei Hormonstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

3.2.2 Stimulation mittels Entzug von β -Östradiol / Progesteron

Analog zu den Hormonstimulationsversuchen untersuchten wir zusätzlich die Auswirkungen eines β -Östradiol und Progesteronentzugs auf die endometrialen Zellen der Kulturen.

Nach einer Kultivierungsdauer von 3-5 Tagen mit β -Estradiol- sowie Progesteronhaltigem Medium (10^{-9} M bzw. 10^{-7} M) erfolgte bei konfluierendem Wachstum der Zellen der Entzug von β -Östradiol (n=6), Progesteron (n=6), sowie beiden Hormonen (n=6).

3.2.2.1 Expression von IL-1 β , G-CSF und VEGF

Sowohl bei den epithelialen Drüsen-schläuchen, als auch bei den Stromazellkulturen konnte durch den sechs- bzw. 24-stündigen Hormonentzug kein signifikanter Anstieg der untersuchten Zytokine IL-1 β , G-CSF und VEGF im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb.8 bis 13).

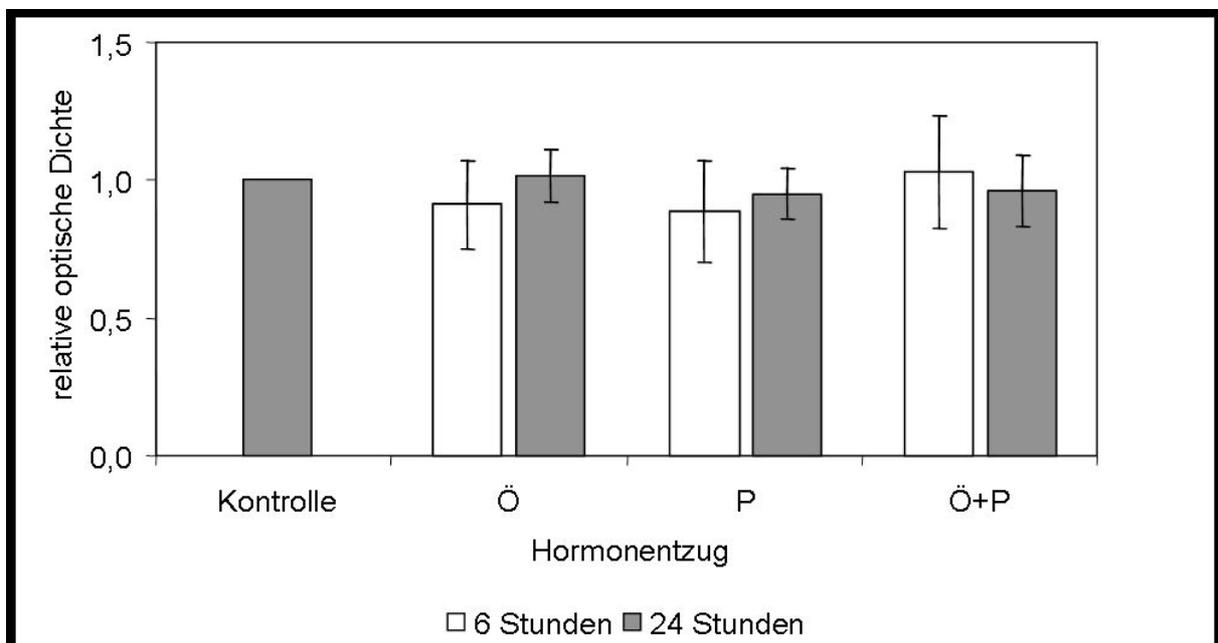


Abbildung 8: Anstieg von VEGF in Epithelzellen bei Hormonentzug (Darstellung der Mittelwerte)

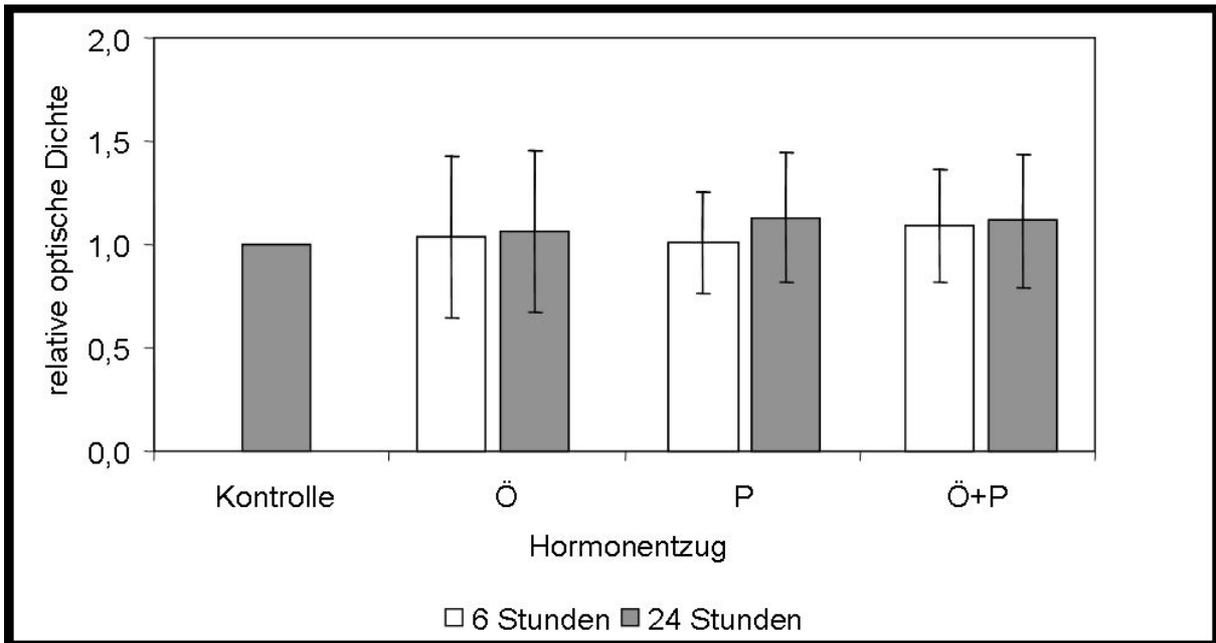


Abbildung 9: Anstieg von VEGF in Stromazellen bei Hormonentzug (Darstellung der Mittelwerte)

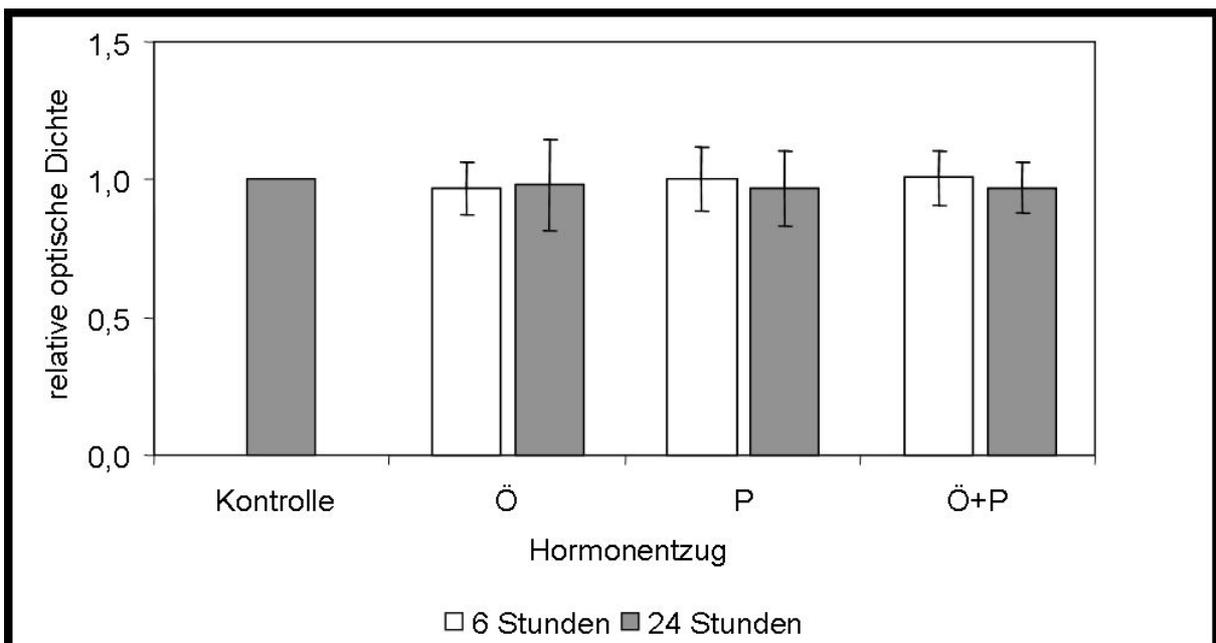


Abbildung 10: Anstieg von IL-1β in Epithelzellen bei Hormonentzug (Darstellung der Mittelwerte)

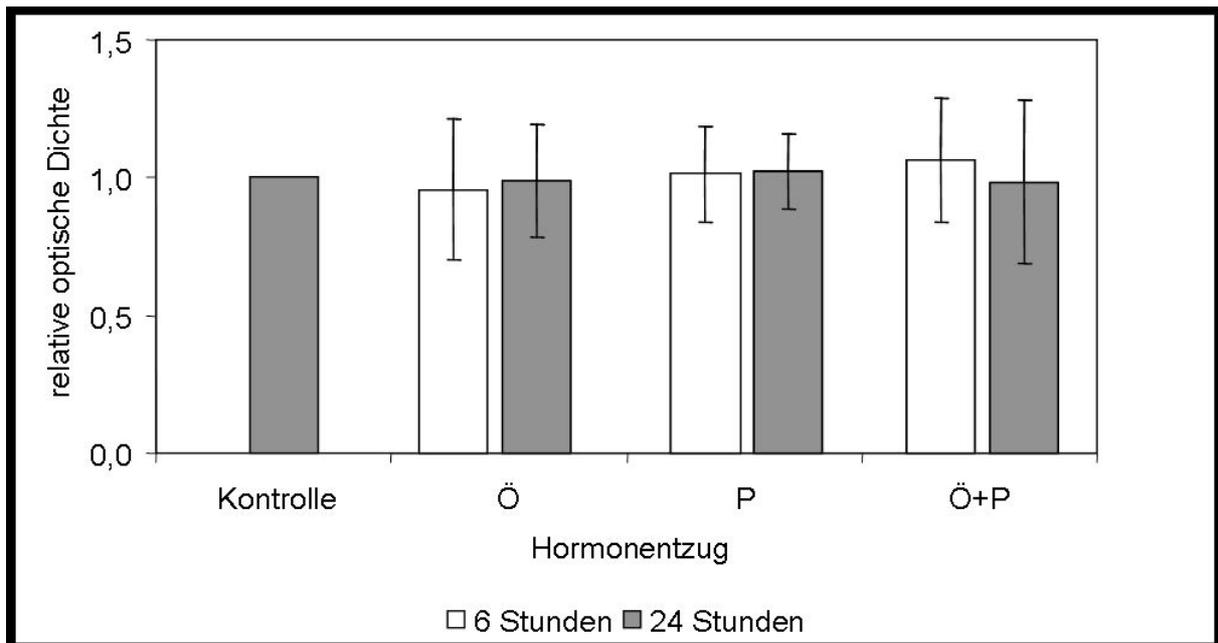


Abbildung 11: Anstieg von IL-1 β in Stromazellen bei Hormonentzug (Darstellung der Mittelwerte)

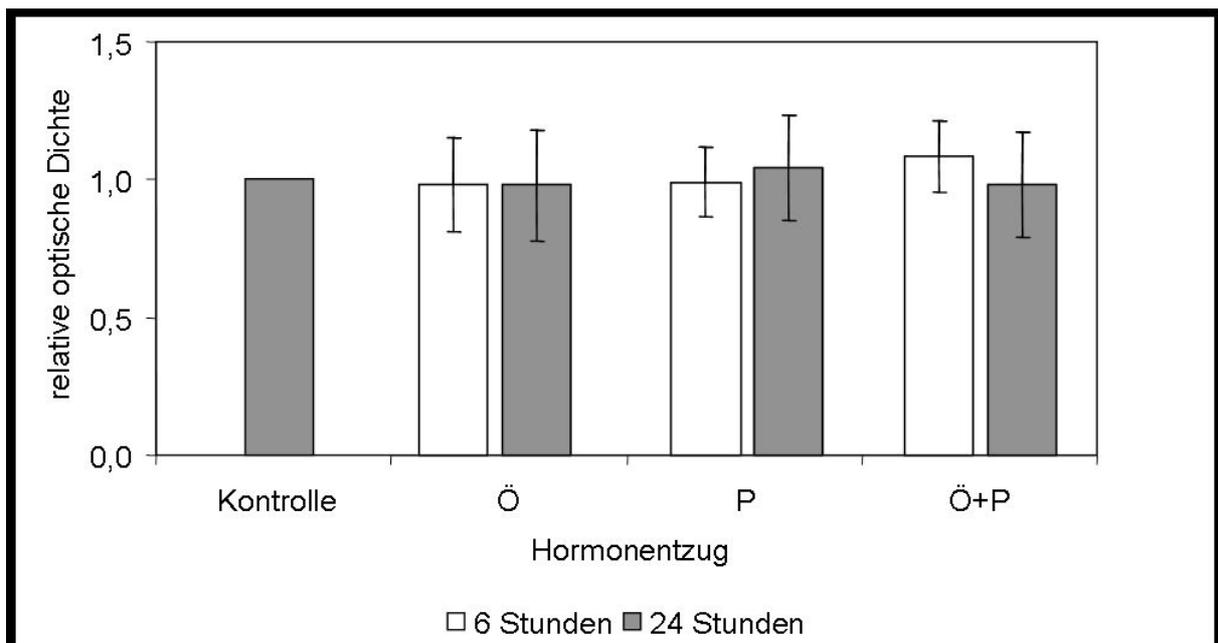


Abbildung 12: Anstieg von G-CSF in Epithelzellen bei Hormonentzug (Darstellung der Mittelwerte)

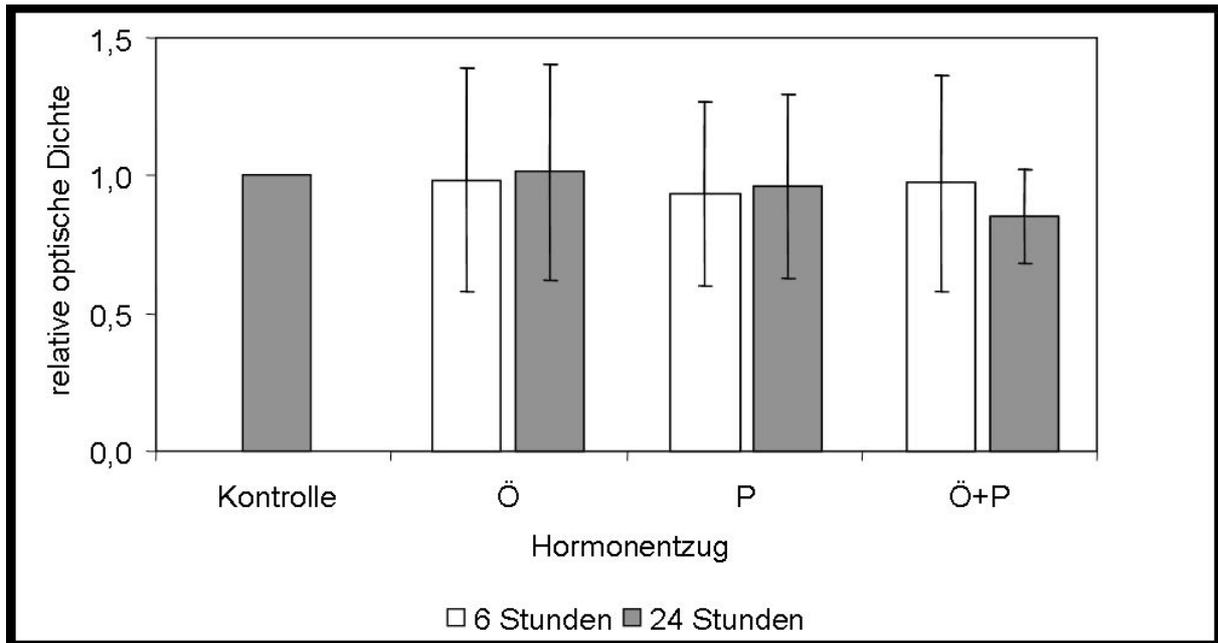


Abbildung 13: Anstieg von G-CSF in Stromazellen bei Hormonentzug (Darstellung der Mittelwerte)

3.2.3 Stimulation mittels Zytokinen

Der Einfluss von IL-1 β und IL-6 auf die Zytokinexpression endometrialer Zellen war in der letzten Zeit Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Ziel unserer Experimente am Zellkulturmodell war eine genauere Analyse der Zytokin bedingten Regulationsvorgänge.

Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Zugabe von rekombinantem IL-1 β (n=6) bzw. IL-6 (n=6), sobald die Kulturen konfluentes Wachstum zeigten, was bei Epithel- und Stromazellen nach jeweils zwei bis drei Tagen erreicht war.

3.2.3.1 Expression von VEGF

Durch die Stimulationsversuche mit IL-1 β , sowie IL-6 konnte weder bei den epithelialen noch bei den stromalen Zellkulturen eine signifikante Änderung der optischen Dichte in der VEGF-spezifischen Bande des RPA erzielt werden. IL-1 β bzw. IL-6 hatten also keinen Einfluss auf die VEGF-Expression (Abb.14 und 15).

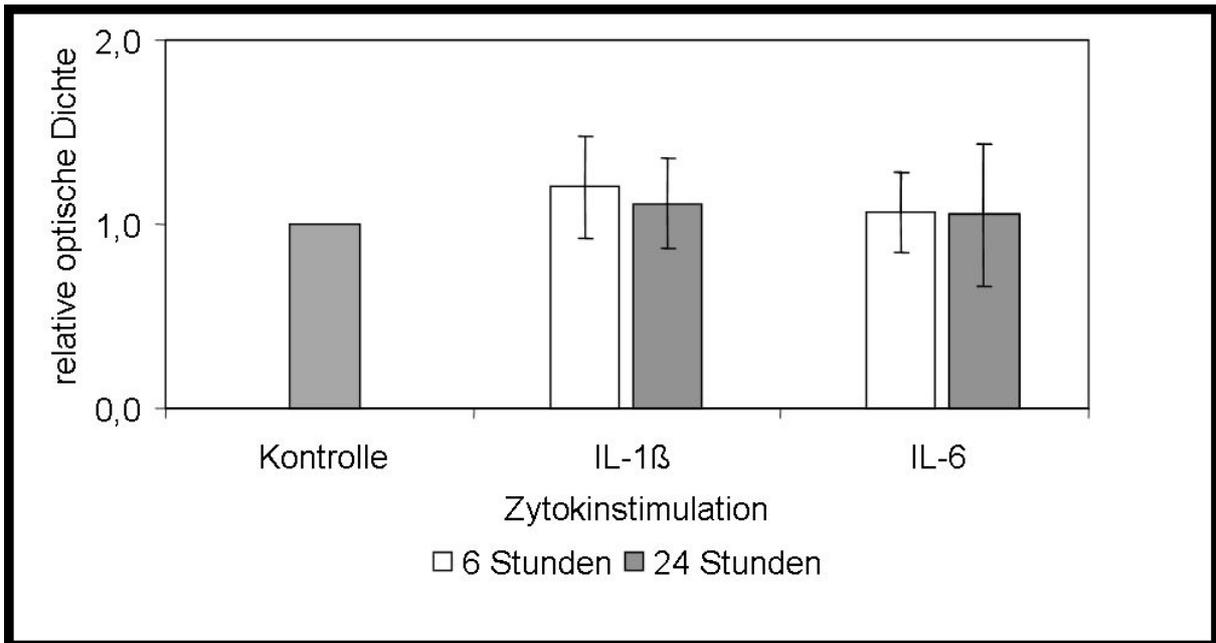


Abbildung 14: Anstieg von VEGF in Epithelzellen bei Zytokinstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

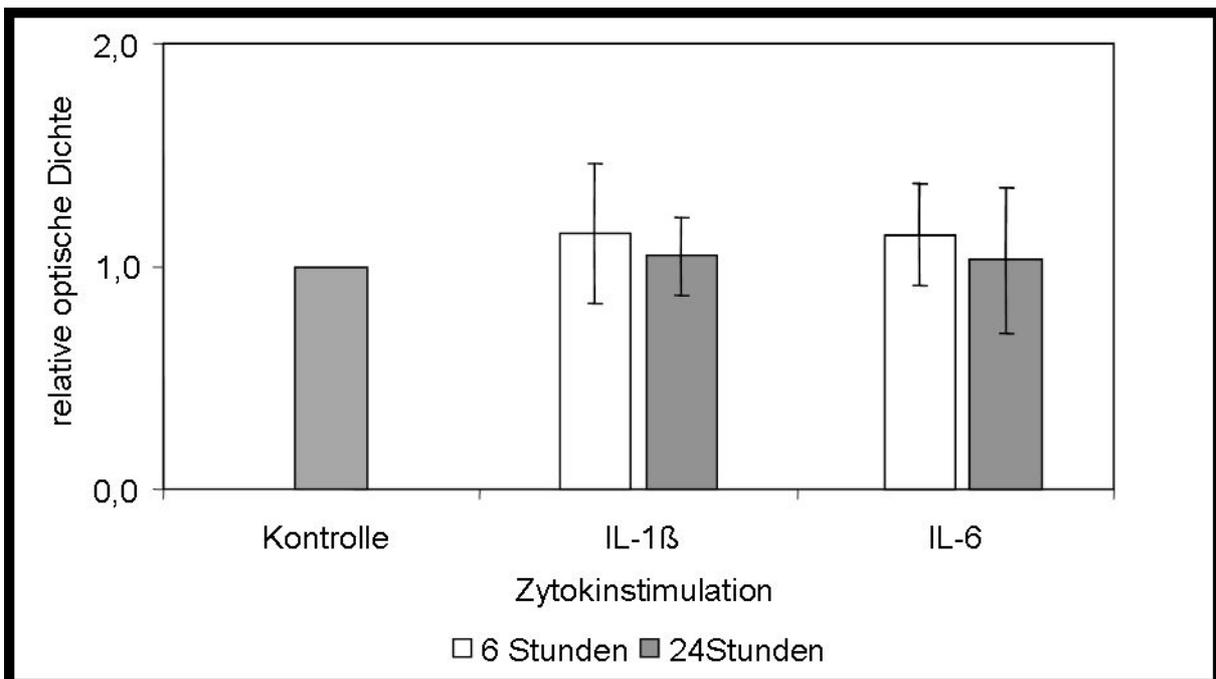


Abbildung 15: Anstieg von VEGF in Stromazellen bei Zytokinstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

3.2.3.2 Expression von IL-1 β

In den Epithelzellkulturen konnte kein signifikanter Anstieg der IL-1 β spezifischen m-RNA als Reaktion auf die Stimulation durch IL-1 β bzw. IL-6 festgestellt werden (Abb.16).

Die Stimulation der endometrialen Zellen durch die oben genannten Zytokine führte bei den Stromazellkulturen im RPA zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der optischen Dichte, was in vitro einem Anstieg der IL-1 β spezifischen m-RNA entspricht (Abb.17).

Durch Zugabe von IL-1 β konnte nach sechsständiger Stimulationsdauer ein Anstieg auf etwas mehr als das vierfache ($4,3 \pm 2,4$), nach 24 Stunden auf etwas mehr als das achtfache ($8,3 \pm 4,2$) des Kontrollwertes erreicht werden (Abb.18).

Stimulation mit IL-6 führte bei den Stromazellen zu einem deutlich geringeren Anstieg der optischen Dichte auf das doppelte ($2,14 \pm 0,7$) bzw. das 3,5-fache ($3,5 \pm 1,7$) des Kontrollwertes (Abb.19).

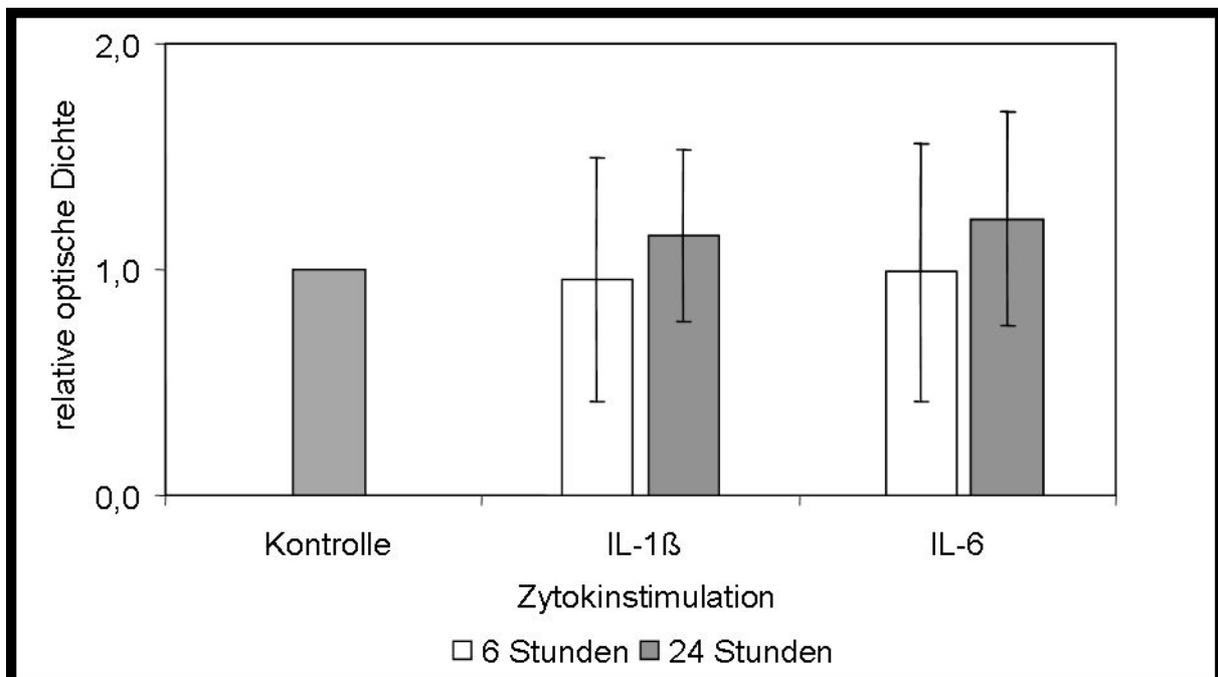


Abbildung 16: Anstieg von IL-1 β in Epithelzellen unter Zytokinstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

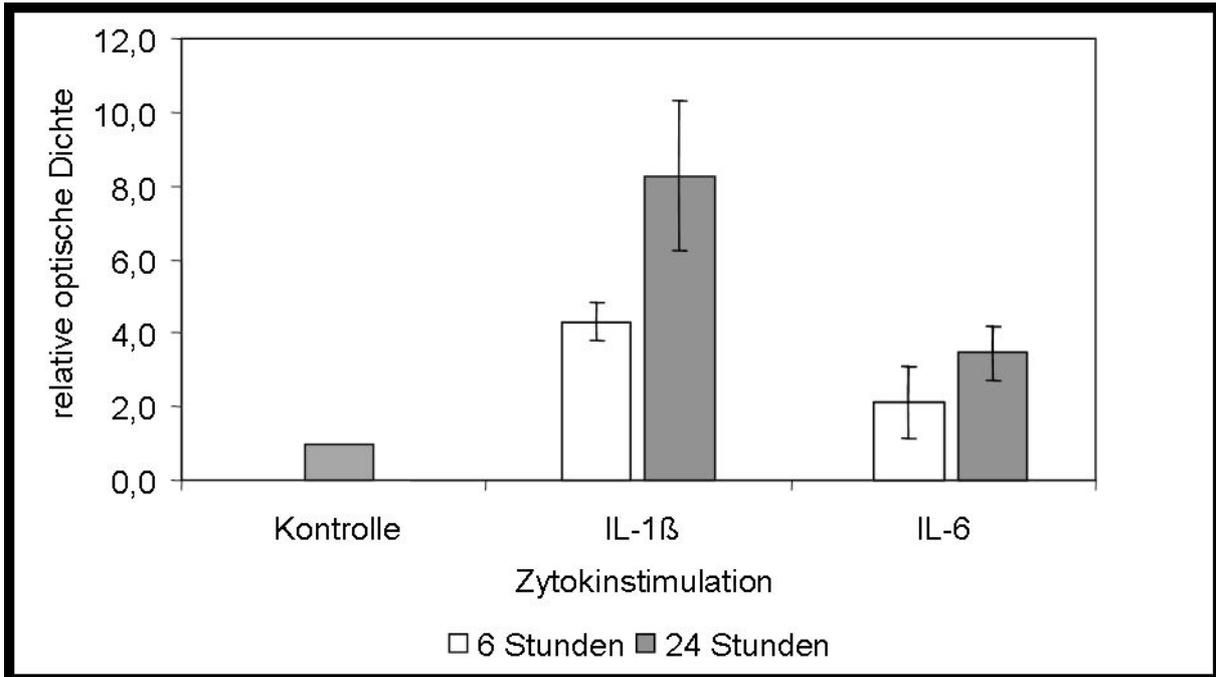


Abbildung 17: Anstieg von IL-1 β in Stromazellen unter Zytokinstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

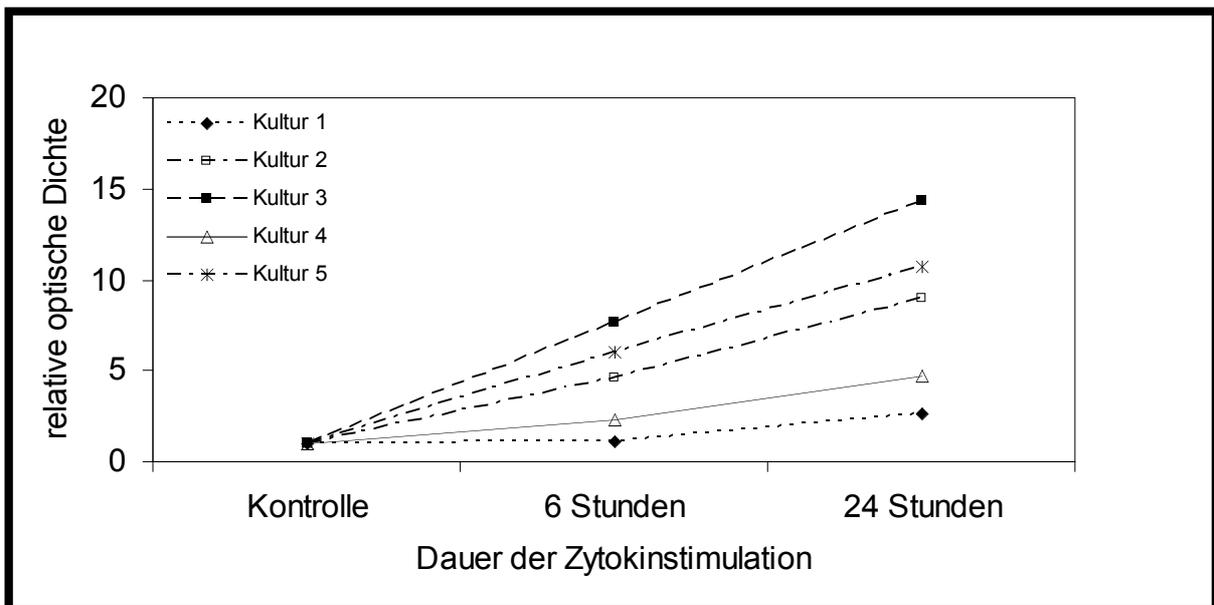


Abbildung 18: Anstieg von IL-1 β in Stromazellen unter Stimulation mit IL-1 β (Darstellung der Einzelwerte)

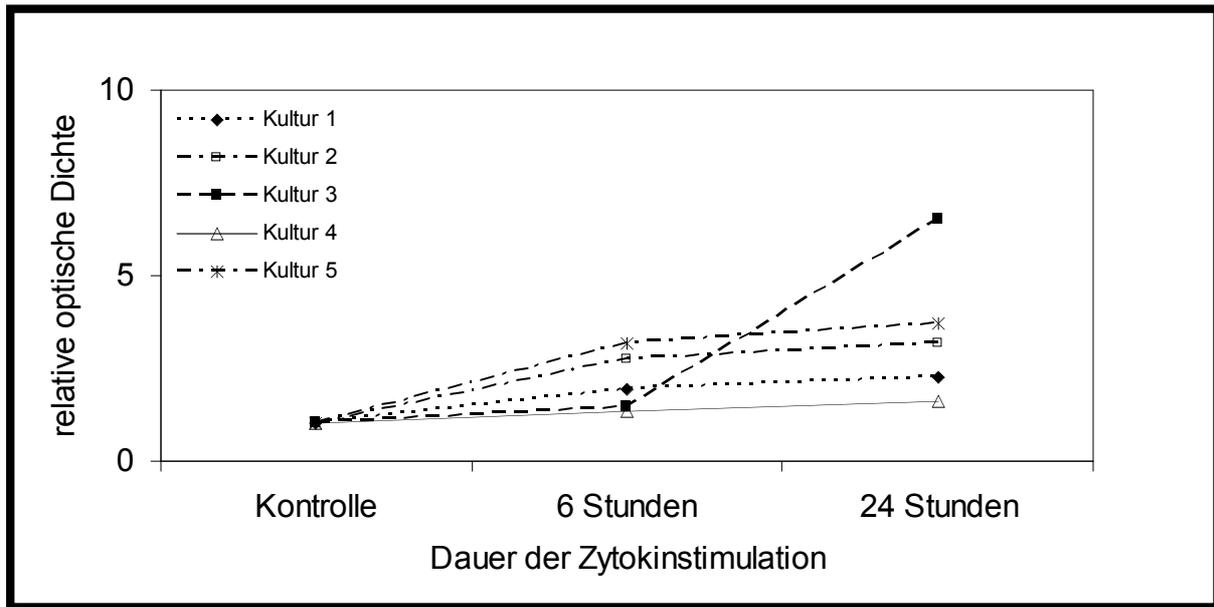


Abbildung 19: Anstieg von IL-1 β in Stromazellen unter Stimulation mit IL-6 (Darstellung der Einzelwerte)

3.2.3.3 Expression von G-CSF

Bei den Epithelzellen konnte kein signifikanter Anstieg der G-CSF Expression im Rahmen der Stimulationsversuche mit IL-1 β und IL-6 festgestellt werden (Abb. 20).

Bei Untersuchung der spezifischen Banden für G-CSF im RPA konnte bei den IL-1 β stimulierten Stromazellkulturen bei sechsstündiger Zytokinexposition ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der optischen Dichte um den Faktor 20 ($19,2 \pm 7,4$) festgestellt werden. Dies entspricht einem Anstieg der spezifischen m-RNA für G-CSF auf das 20-fache des Kontrollwertes (Abb. 21).

Nach 24-stündiger Stimulationsdauer kam es bei zwei von insgesamt fünf Stromazellkulturen wieder zu einem Abfall der m-RNA-Expression, wobei jedoch höhere Werte gemessen wurden als in den nicht stimulierten Kontrollkulturen (Abb. 22).

Durch sechsstündige Inkubation mit IL-6 ließ sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der optischen Dichte im Bereich der spezifischen Bande für G-CSF im Vergleich zum Kontrollwert erzielen (10-fach), wobei der Anstieg hier jedoch nicht so ausgeprägt ausfiel wie bei der Stimulation mit IL-1 β (Abb. 21). Eine länger

andauernde Expression über 24 Stunden führte wie bei der IL-1 β Stimulation wieder zu einem Abfall der Zytokinexpression (Abb. 23).

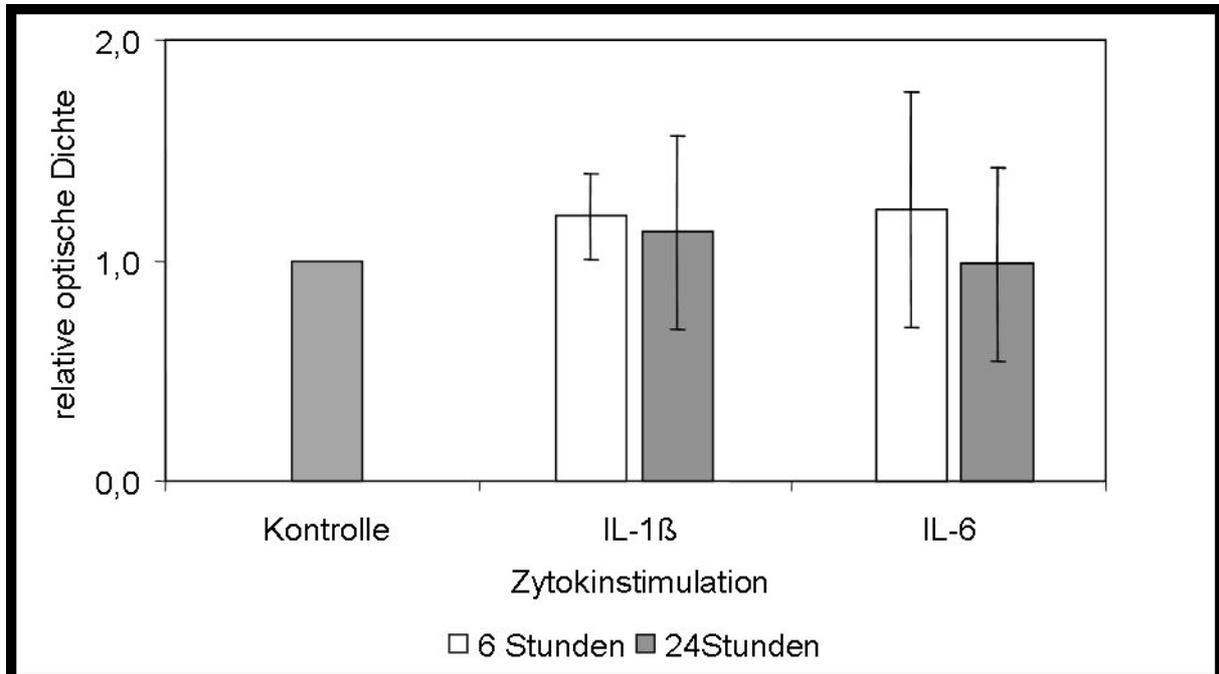


Abbildung 20: Anstieg von G-CSF in Epithelzellen unter Zytokinstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

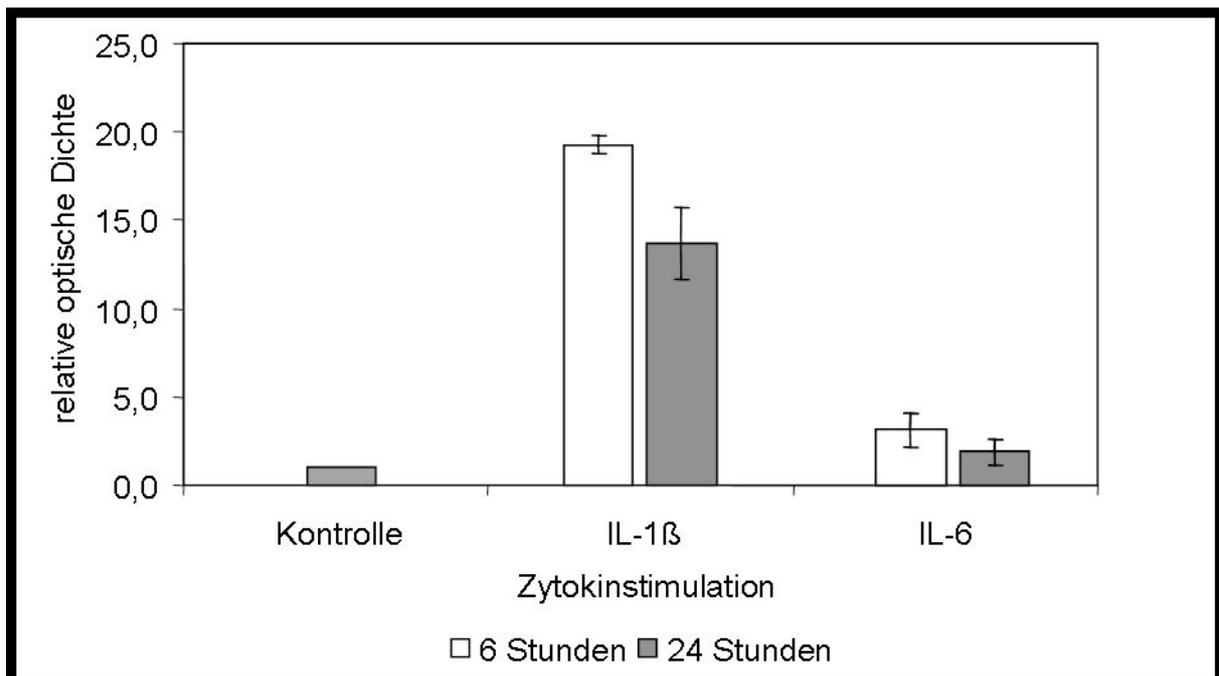


Abbildung 21: Anstieg von G-CSF in Stromazellen unter Zytokinstimulation (Darstellung der Mittelwerte)

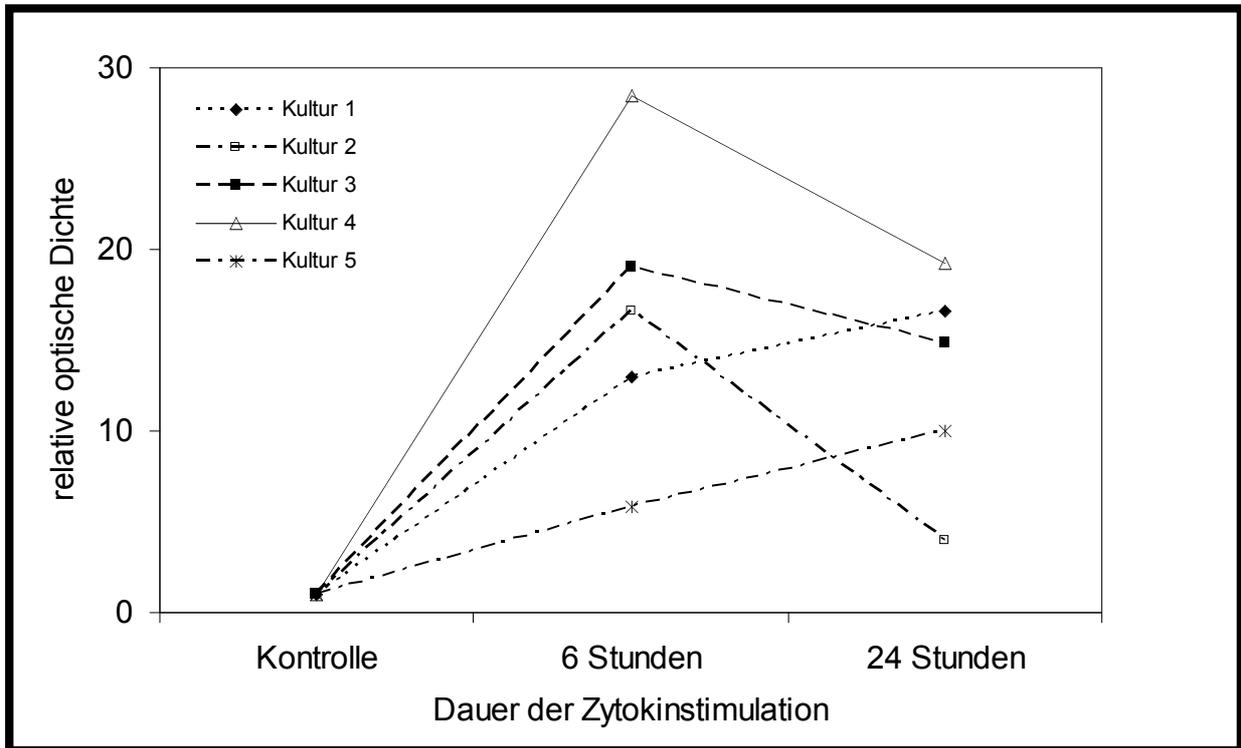


Abbildung 22: Anstieg von G-CSF in Stromazellen unter Stimulation mit IL-1 β (Darstellung der Einzelwerte).

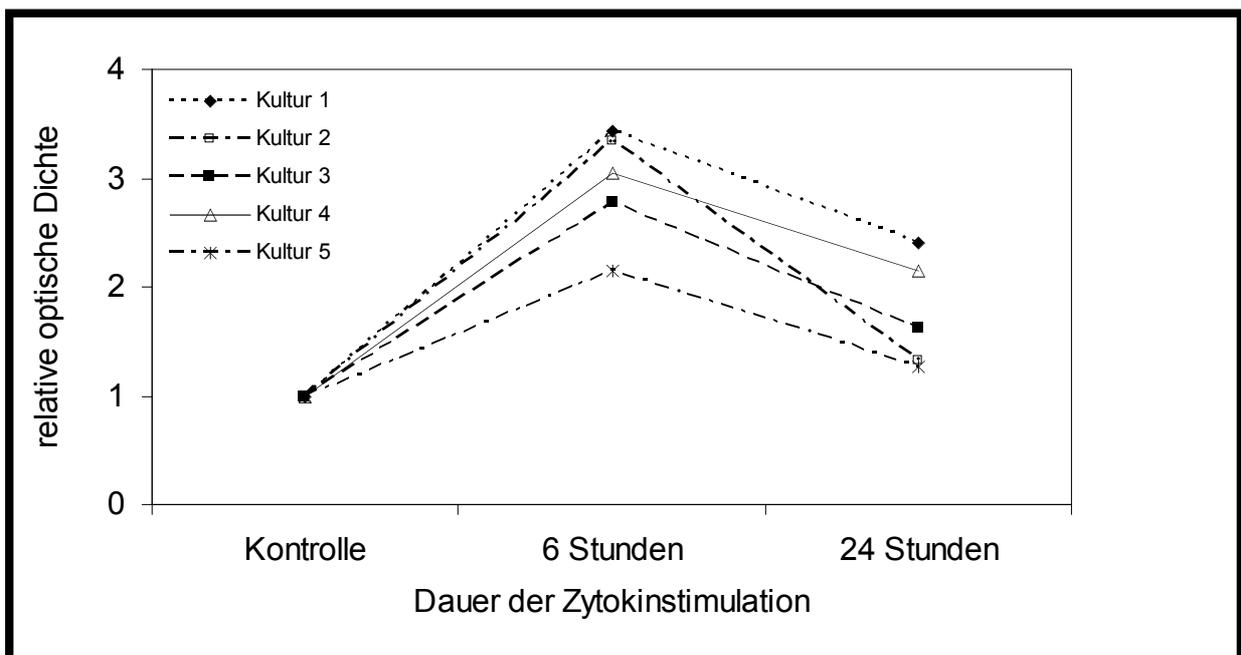


Abbildung 23: Anstieg von G-CSF in Stromazellen unter Stimulation mit IL-6 (Darstellung der Einzelwerte)

3.2.4 Stimulation mittels Hypoxie

Da bereits seit längerer Zeit ein stimulatorischer Effekt von Sauerstoffentzug auf die Expression des Zytokins VEGF in verschiedenen Zellarten bekannt ist, sollten nun die Auswirkungen hypoxischer Bedingungen während der Kultivierung endometrialer Zellen auf die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, IL-1 β und G-CSF genauer untersucht werden. Insbesondere interessierten uns die Unterschiede der Zytokinexpression in Epithel- und Stromazellen.

3.2.4.1 Expression von VEGF

Als positive Kontrolle zum Nachweis eines funktionstüchtigen Kultivierungssystems unter hypoxischen Bedingungen diente hierbei VEGF.

Nach sechsständiger Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen konnte sowohl bei den endometrialen Epithelzellen als auch bei den Stromazellen ein deutlicher Anstieg der VEGF-spezifischen m-RNA beobachtet werden. Länger anhaltende Stimulation über 24 Stunden führte bei den Epithelzellen wieder zu einem Abfallen der spezifischen mRNA.

Bei den endometrialen Epithelzellen kam es nach sechsständiger Hypoxie zu einem signifikanten Anstieg ($p > 0,05$) des VEGF um das 1,32- bis 3,46-fache ($\pm 0,7$) im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle. Bei längerandauernden hypoxischen Bedingungen über 24 Stunden kam es bei vier von sechs Kulturen wieder zu einem Abfallen des VEGF (Abb. 24 und 25).

Bei den Stromakulturen stieg die VEGF-spezifische m-RNA nach sechs Stunden signifikant ($p < 0,05$) um das 1,16- bis 2,68-fache des Kontrollwertes ($\pm 0,6$). Im Gegensatz zu den Epithelzellen kam es bei den Stromazellen bei einer Hypoxiedauer von 24 Stunden zu einem weiteren signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) und erreichte dann Werte, die dem 1,33 bis 4,31-fachen des Kontrollwertes ($\pm 1,0$) entsprachen (Abb. 26 und 27).

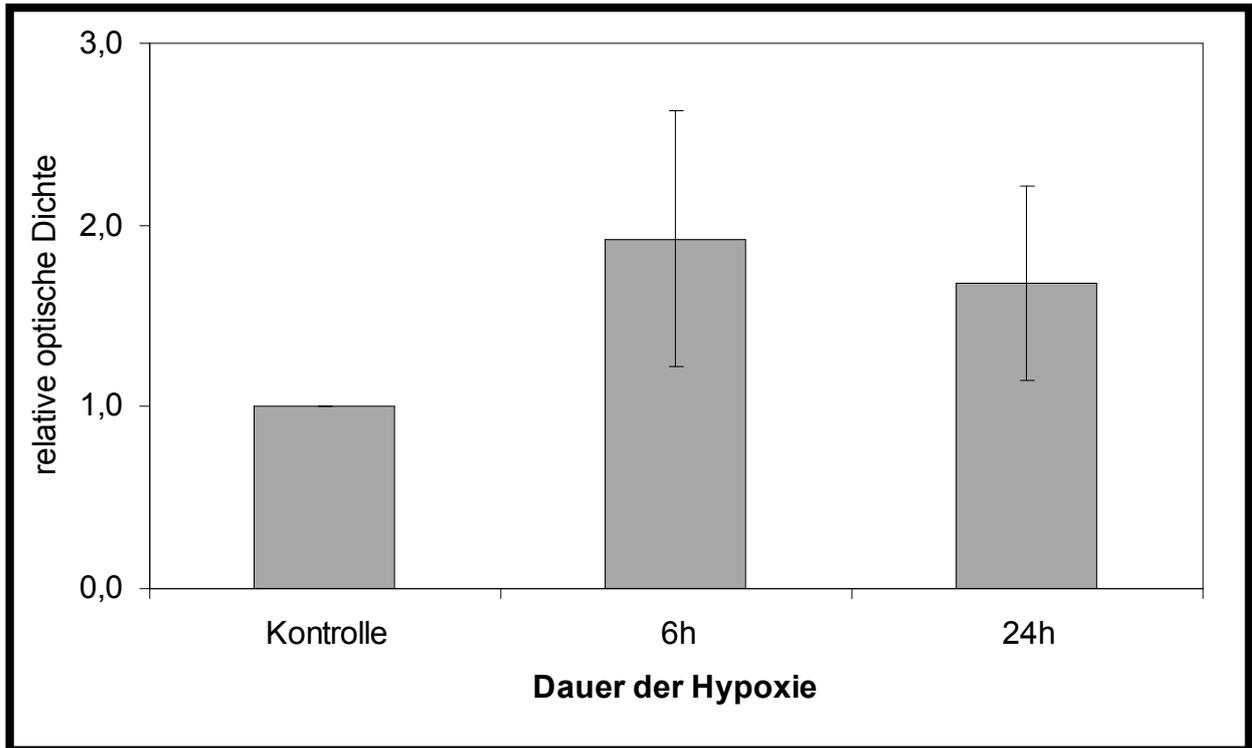


Abbildung 24: Anstieg von VEGF in Epithelzellen in Abhängigkeit von der Hypoxiedauer (Darstellung der Mittelwerte)

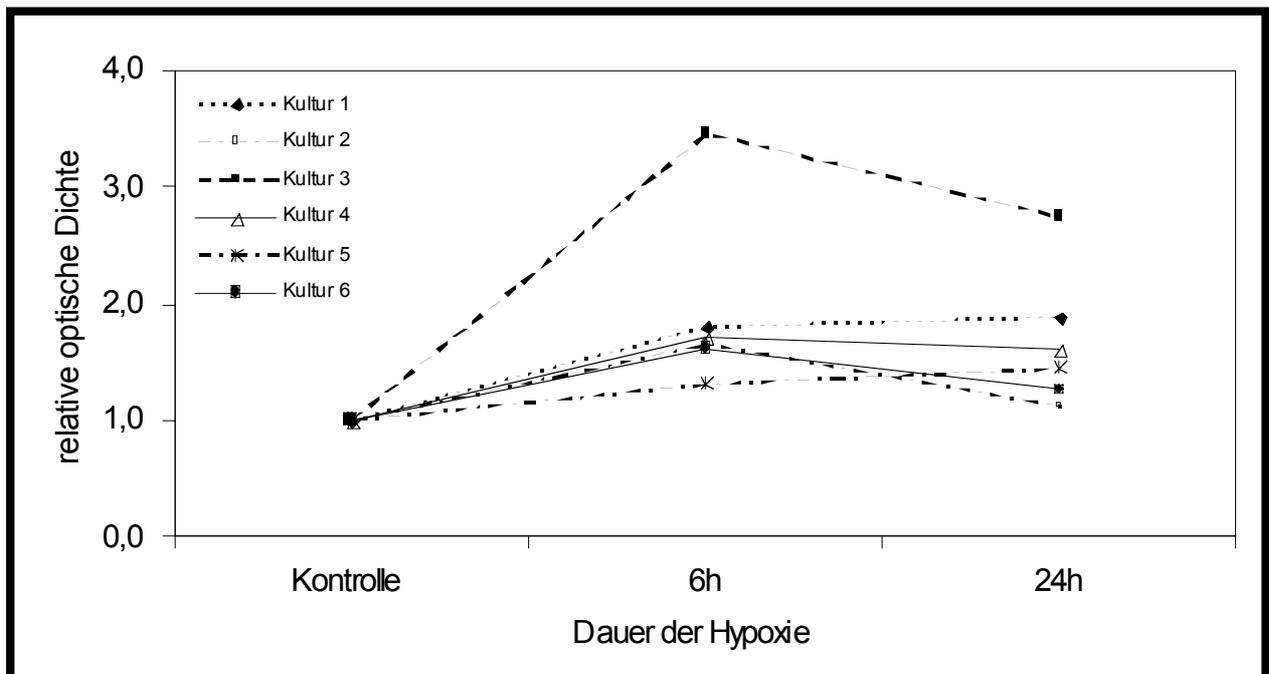


Abbildung 25: Anstieg von VEGF in Epithelzellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Einzelwerte)

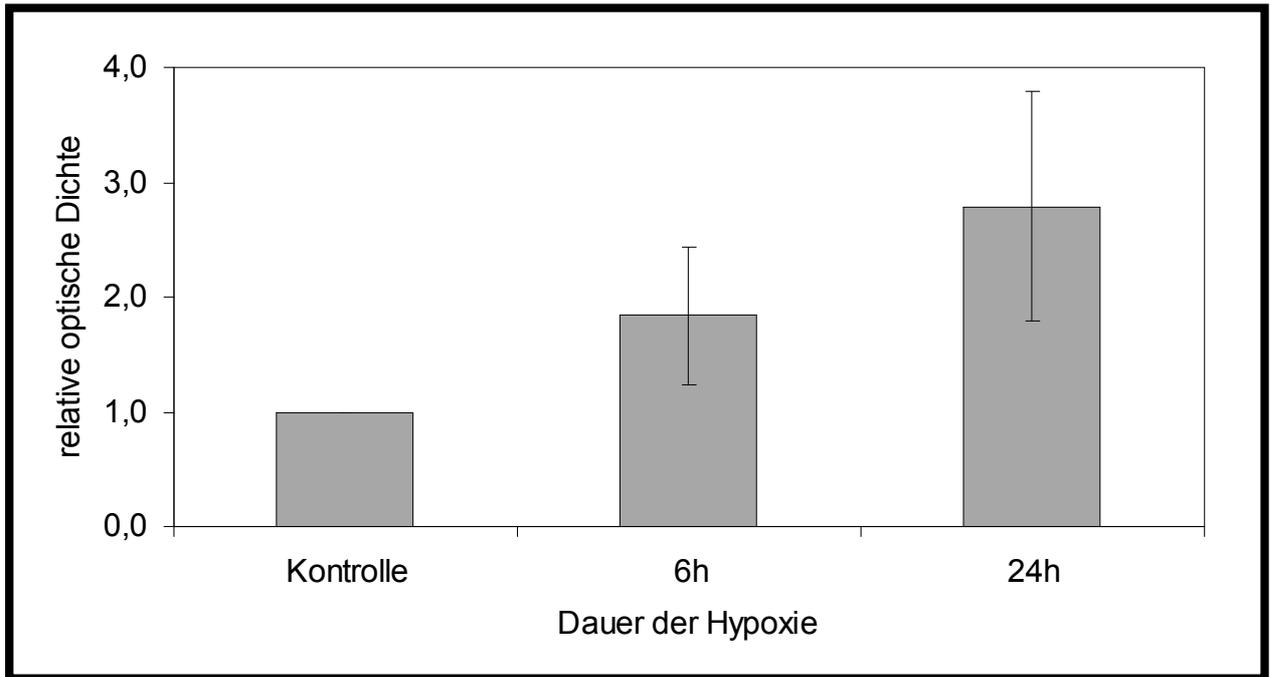


Abbildung 26: Anstieg von VEGF in Stromazellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Mittelwerte)

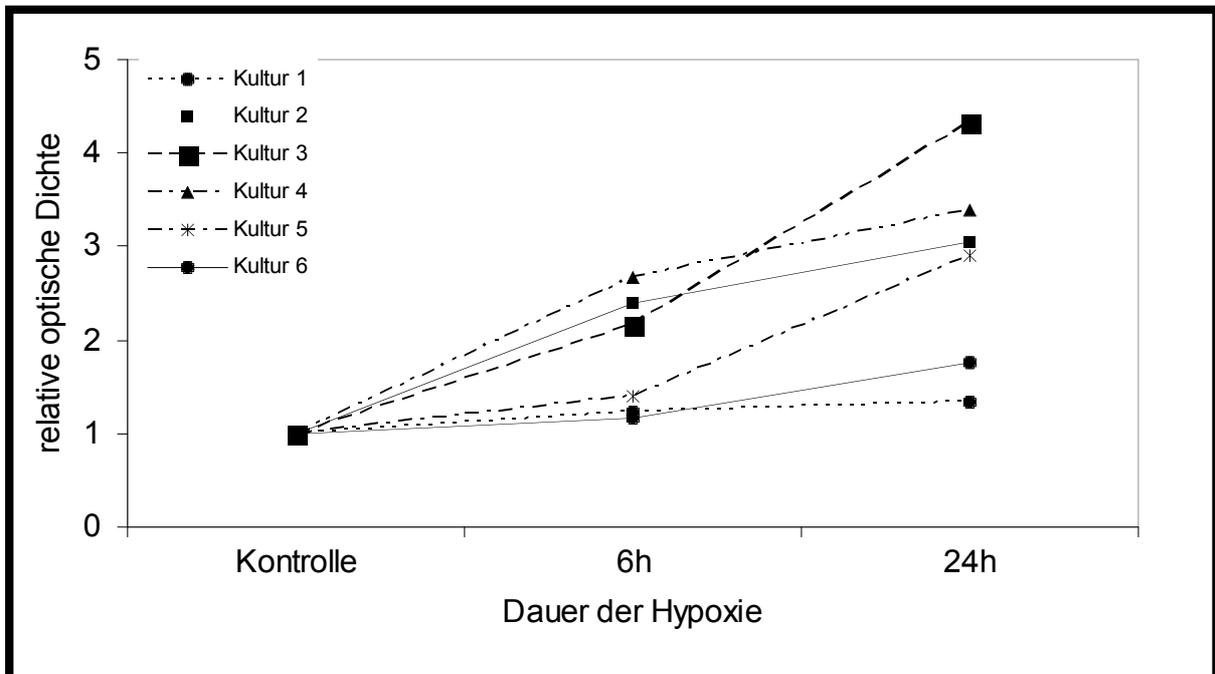


Abbildung 27: Anstieg von VEGF in Stromazellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Einzelwerte)

3.2.4.2 Expression von IL-1 β

Untersucht man die spezifischen Banden für IL-1 β im RNase Protection Assay, so konnte bei allen sechs Epithelzellkulturen unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Abnahme der relativen optischen Dichte festgestellt werden, was einer Abnahme der spezifischen m-RNA entspricht.

Eine Hypoxiedauer von sechs Stunden führte zu einer Abnahme der relativen, optischen Dichte um ein Drittel ($0,66 \pm 0,22$), eine 24-stündige Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen ergab eine Abnahme um die Hälfte ($0,49 \pm 0,19$)

(Abb. 28 bis 29).

Eine Korrelation mit der Zyklusphase, in der die Kulturproben entnommen worden waren, war nicht möglich.

Bei den Stromazellen führte die Hypoxie zu keinem signifikanten Veränderung des IL-1 β bzw. dessen spezifischer m-RNA (Abb. 30).

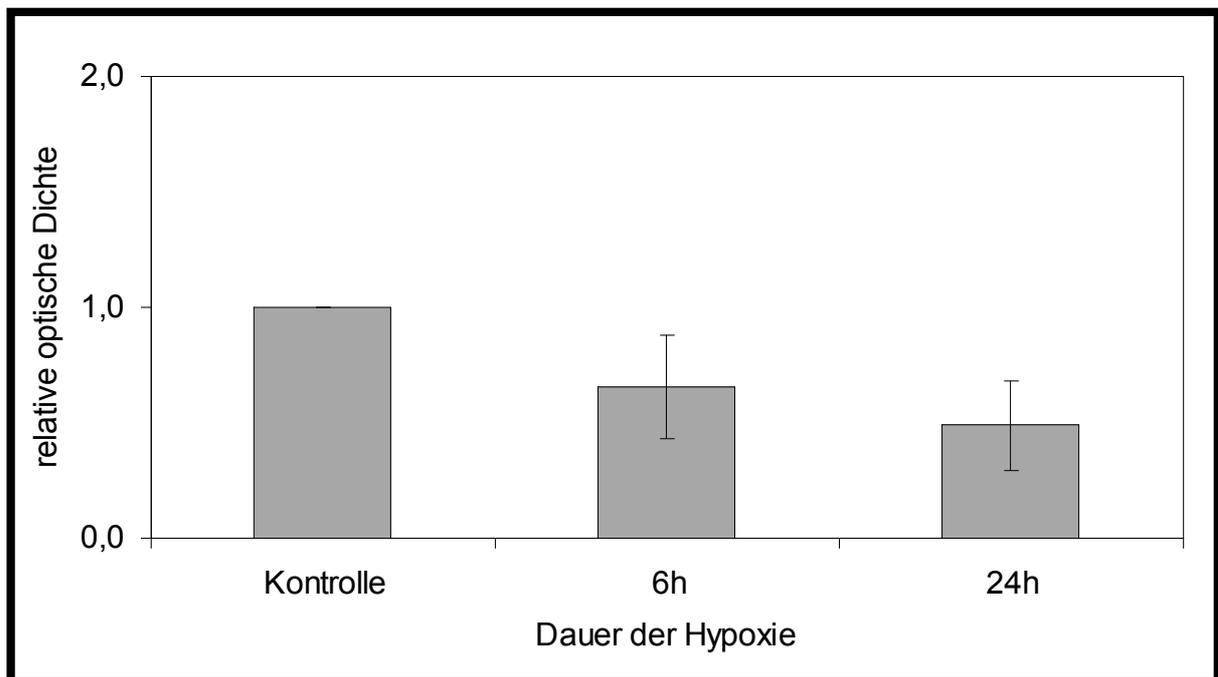


Abbildung 28: Abnahme von IL-1 β in Epithelzellen bei hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Mittelwerte)

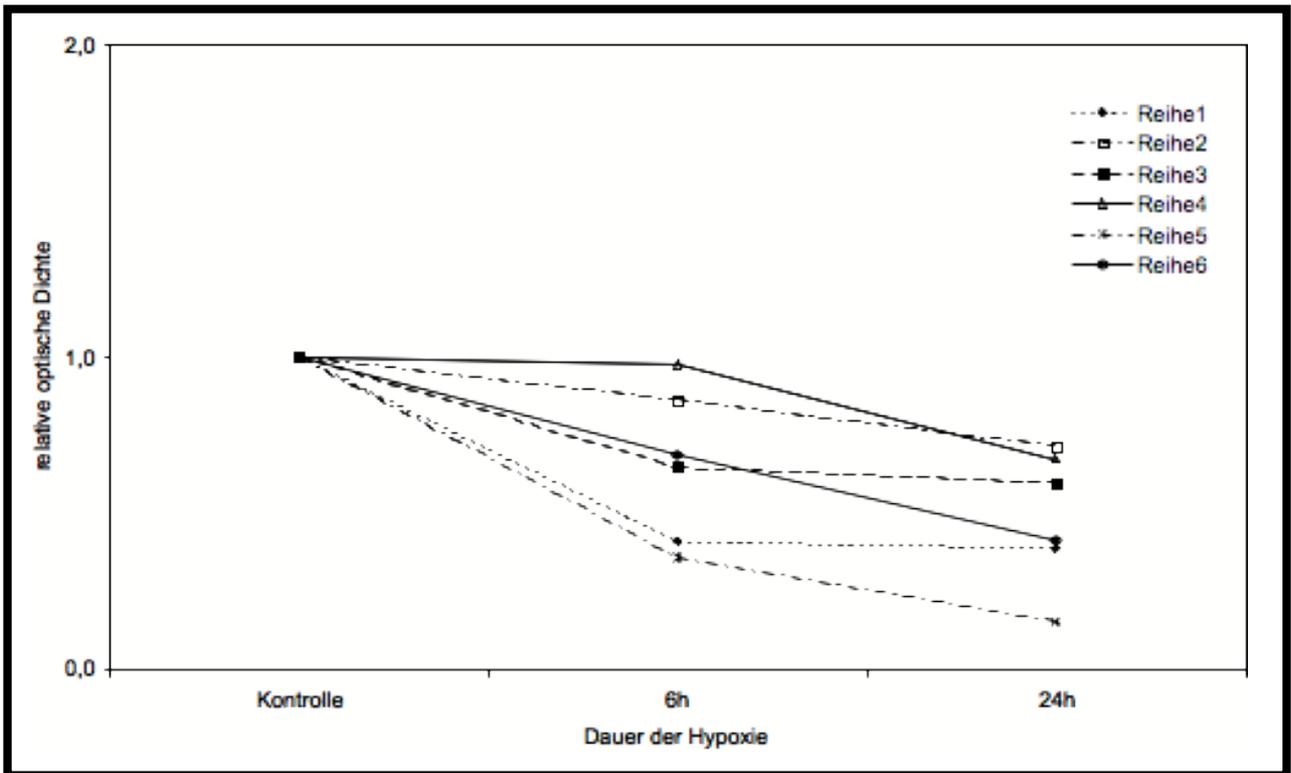


Abbildung 29: Abnahme von IL-1 β in Epithelzellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Einzelwerte)

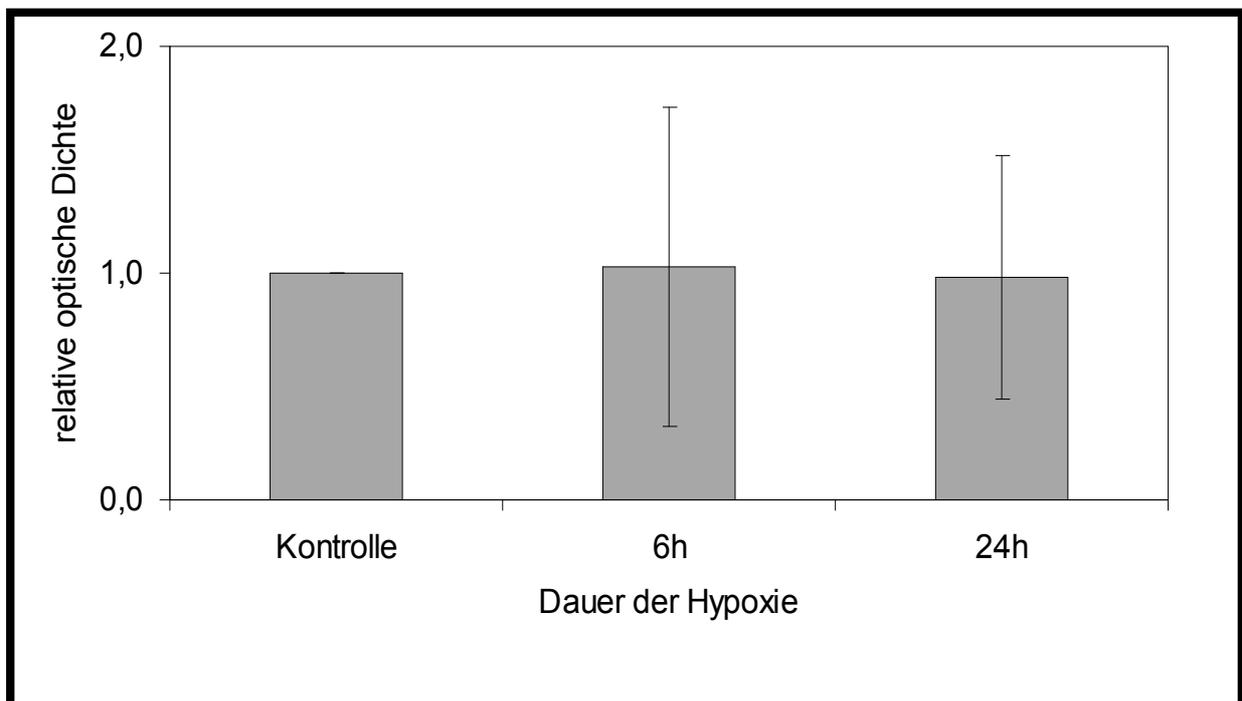


Abbildung 30: Abnahme von IL-1 β in Stromazellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Mittelwerte)

3.2.4.3 Expression von G-CSF

Auch die Expression des Zytokins G-CSF durch die Epithelzellen wurde durch Hypoxie beeinflusst. Die optische Dichte der spezifischen Bande für G-CSF nahm nach einer Hypoxiedauer von 6 Stunden signifikant ($p < 0,05$) durchschnittlich um den Faktor 0,8 ab ($\pm 0,08$), was einer durchschnittlichen Reduktion der G-CSF-spezifischen m-RNA um ca. 20% entspricht. Bei 24-stündiger Stimulationsdauer kam es zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$) um den Faktor 0,6 ($\pm 0,04$) auf ca. zwei Drittel des Kontrollwertes (Abb. 31 und 32).

In den Stromazellkulturen konnte keine signifikante Veränderung der G-CSF Expression nachgewiesen werden (Abb. 33).

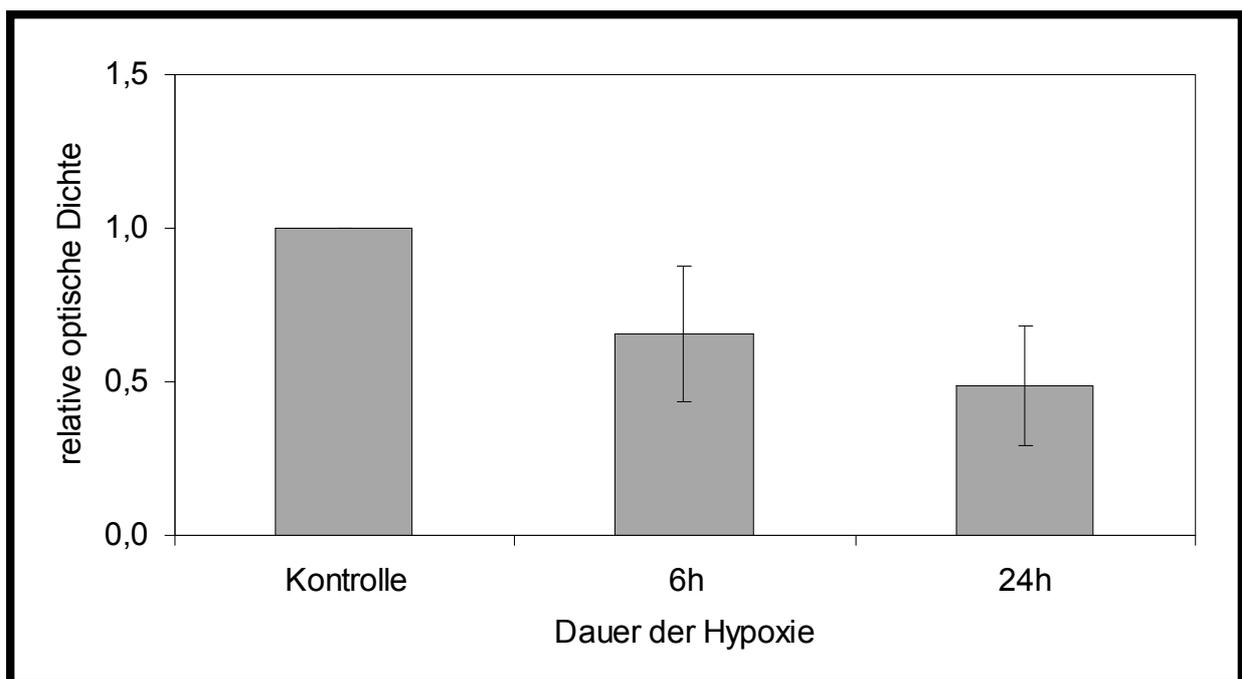


Abbildung 31: Abnahme von G-CSF in Epithelzellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Mittelwerte)

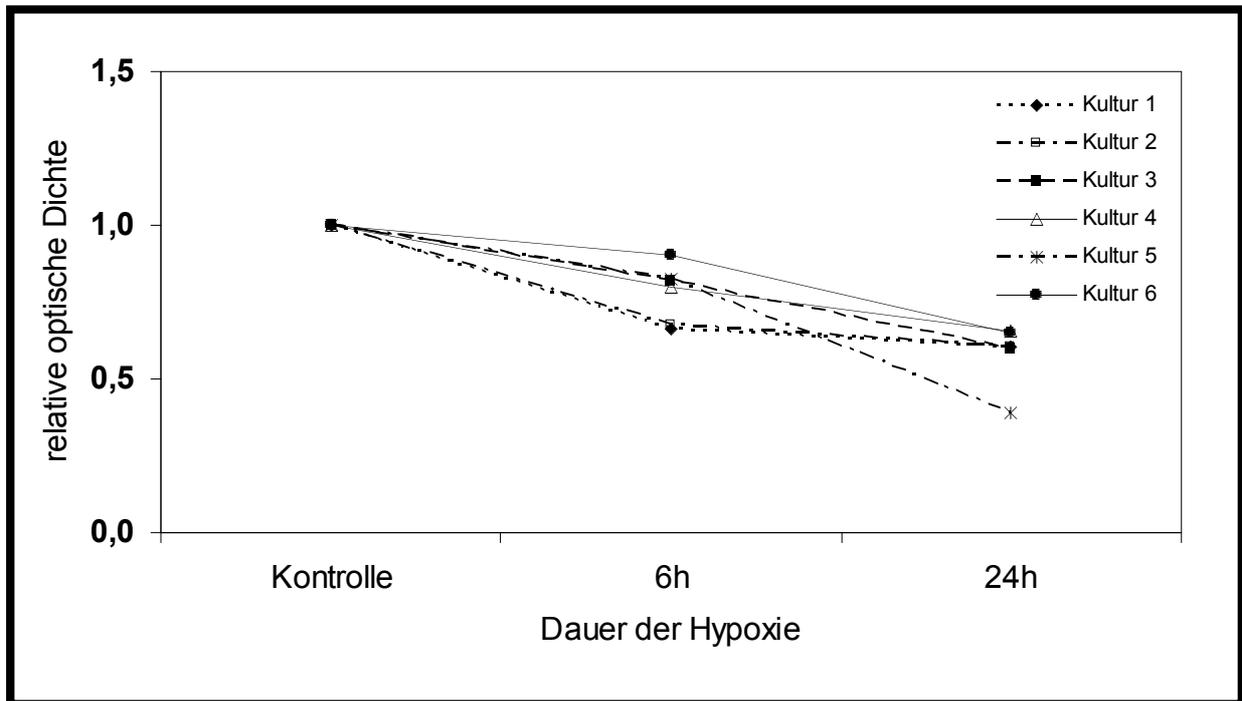


Abbildung 32: Abnahme von G-CSF in Epithelzellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Einzelwerte)

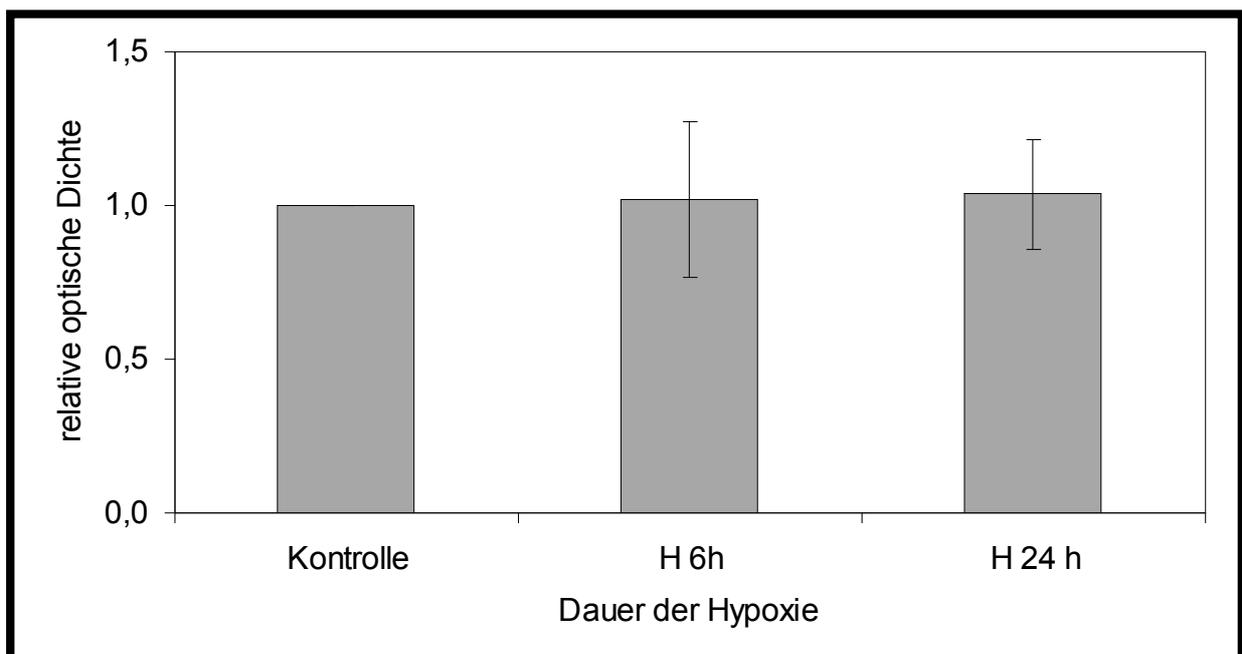


Abbildung 33: Abnahme von G-CSF in Stromazellen unter hypoxischen Bedingungen (Darstellung der Mittelwerte)

4 Diskussion

4.1 Endometriale Dysregulation als Ursache der Infertilität

Ca. 14% aller Paare suchen aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches medizinische Hilfe auf (Ochsenkühn et al. 1998), so dass das Problem der ungewollten Kinderlosigkeit und des unerfüllten Kinderwunsches in unserer Gesellschaft nach wie vor eine wichtige Rolle spielt. Bezüglich der Ursachenforschung müssen neben der Verschiebung der Familienplanung in einen späteren Lebensabschnitt der Frau antikonzepcionell wirksame Umwelteinflüsse der modernen Lebensweise berücksichtigt werden (Krebs 1991). In der Hälfte der Fälle liegt die Ursache in der männlichen Infertilität (Huleihel et al. 1999), einer dänischen Studie zufolge nahm die durchschnittliche Spermiedichte im Ejakulat in den letzten 50 Jahren um 50 % ab (Carlson et al. 1992).

Bleibt die Konzeption auf natürlichem Wege aus, kann die Anwendung verschiedener assistierter Verfahren der Reproduktionsmedizin, wie die In-Vitro-Fertilisation (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) die Wahrscheinlichkeit eines Schwangerschaftseintrittes erhöhen.

Obwohl hierbei der Transport der befruchteten Eizelle durch den Eileiter umgangen wird und dadurch potentielle tubare Störfaktoren der Präimplantationsphase vermieden werden, beträgt die durchschnittliche Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer lediglich 30% und liegt damit nur geringfügig über der Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Schwangerschaft von 25 - 30% pro Zyklus. Die Ursache dieser nach wie vor äußerst unbefriedigenden Ergebnisse scheint in einem Implantationsversagen zu liegen, welches sich aus einer Dysregulation mit nachfolgender unzureichender Rezeptivität des Endometriums zu ergeben scheint (Salamonsen et al 2002). Infolgedessen sind Apposition, Adhäsion und Invasion der Blastozyste gestört, was letztendlich zum Untergang des Embryos führt.

Der Begriff Implantationsfenster bezeichnet den zeitlich eng begrenzten Rahmen, während dessen die Rezeptivität des Endometriums gegeben ist. Dieser wird in der Literatur sowohl bezüglich seines Zeitpunktes im Verlauf des weiblichen Zyklus, als auch bezüglich seiner Dauer äußerst unterschiedlich definiert. Während die Dauer zwischen maximal 10 Tagen (Beier et al. 1998) und minimal 4 Tagen (Merviel et al. 2001) definiert ist, wird der Zeitpunkt stets auf den Tag der maximalen Konzentration

des luteinisierenden Hormons (LH) im peripheren Blut LH + x bezogen und wird je nach Autor ab LH +1 oder LH +2 (Beier et al. 1998) bis LH +10 (Tabibzadeh et al. 2002) angegeben.

In diesem engen Zeitfenster kommt es durch das Zusammenspiel von Zytokinen und anderen Mediatoren der endometrialen Epithel-, Stroma- und Immunzellen, die sorgfältigen zellulären und molekularen Regulationsmechanismen unterliegen, zur Implantation. Dieser Prozess, welcher bisher nur ansatzweise verstanden werden konnte, stellt einen für die Einnistung des Embryos essentiellen Vorgang dar. Es kommt hierbei zu einer erhöhten endometrialen Expression inflammatorischer Zytokine wie z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Die endometriale Expression dieser Zytokine als Second Messenger unterliegt einer sorgfältigen Regulation.

Da ein Prozent der Frauen trotz fehlender anatomischer, immunologischer und genetischer Abnormitäten unter rezidivierenden Aborten leiden, postulierten von Wolff et al. 2000 die These, dass rez. Frühaborte auf der Unfähigkeit des Endometriums einen Dialog mit der sich entwickelnden Blastozyste zu etablieren beruhen könnten, was seinerseits auf eine gestörte endometriale Zytokin-mRNA Expression zurückzuführen sein könnte. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der mRNA-Expression dreier verschiedener endometrialer Zytokine unter dem Einfluss relevanter endometrialer Regulationsmechanismen wie Hormonstimulation und -entzug, Stimulation durch die Zytokine IL-1 β und IL-6, sowie unter hypoxischen Bedingungen, welche im Endometrium v.a. zum Zeitpunkt der Menstruation im Bereich des distalen Endometriums vorliegen.

4.2 Grundlagen der Implantation

Die Implantation der menschlichen Blastozyste stellt einen komplexen Prozess dar, an dem zahlreiche Zytokine, Integrine und Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Obwohl diese Vorgänge in ihrer Komplexität bisher nur ansatzweise verstanden werden, bleiben beim Menschen die uterine Empfänglichkeit, das maternale Erkennen und Tolerieren der Schwangerschaft sowie die Invasivität des Keimes als die drei Hauptaspekte der Implantation unumstritten (Denker 1993).

Eine wichtige Aufgabe kommt hierbei dem embryo-maternalen Dialog zwischen diesen beiden genetisch und immunologisch differenten Entitäten zu (Dominguez et

al. 2002). Hierbei lassen sich drei verschiedene Phasen der Implantation unterscheiden: Apposition, Adhäsion und Invasion. Während der Appositionsphase liegt kein direkter Kontakt zwischen Embryo und Endometrium vor, so dass die Interaktion durch den bidirektionalen Austausch von löslichen Proteinen, wie z.B. Zytokine, Chemokine u.a. erfolgen muss. Dabei scheint die Rezeptivität des endometrialen Endometriums fest mit morphologischen Änderungen der Plasmamembran und des Zytoskeletts der endometrialen Epithelzellen assoziiert zu sein (Murphy et al. 1995). Durch eine erste Welle endometrialer Zytokine erfolgt eine Leukozytenmigration zum Ort der Implantation (Wood et al. 1997). Außerdem wird hierdurch eine zweite Zytokinwelle induziert, wobei u.a. IL-1, Leukozyteninduzierender Faktor (LIF), Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor (HB-EGF) freigesetzt werden (Cross et al. 1994), welche durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren zu lokalen, molekularen Veränderungen in der Expression der Adhäsions- und Antiadhäsionsmoleküle führen (Dominguez et al. 2002). Dies ist entscheidend für den Übergang in die Adhäsionsphase, in welcher es am sechsten und siebten Tag nach der Ovulation zum direkten Kontakt zwischen der Plasmamembran der endometrialen Epithelzellen und des embryonalen Trophektoderms kommt (Enders 1976). Schließlich penetriert der Trophoblast während der Invasionsphase die epitheliale Basalmembran und dringt bis zum Erreichen der uterinen Gefäße ins Stromagewebe vor.

4.3 Endometriale Expression und Funktion von VEGF

Das menschliche Endometrium unterliegt während der fertilen Phase einer zyklischen Entwicklung. Eine Schlüsselrolle nehmen hierbei Wachstum und Entwicklung der endometrialen Gefäße ein. Die Gefäßentwicklung kann durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen – Vaskulogenese und Angiogenese. Vaskulogenese bezeichnet die Entstehung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung durch Differenzierung von Angioblasten zu einem primitiven Gefäßsystem. Unter Angiogenese versteht man dagegen die Aussprossung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen (Risau, 1997), welche in adulten Geweben abgesehen vom Auftreten im Rahmen der Wundheilung, sowie einiger Krankheitsbilder wie diabetische Retinopathie, rheumatoide Arthritis und Tumorwachstum relativ selten vorkommen (Hanahan et Folkman, 1996). Eine

Ausnahme stellt hierbei der weibliche Reproduktionstrakt dar, wo Angiogenese im Rahmen der zyklischer Veränderungen regelmäßig stattfindet, was für die Entwicklung eines reich vaskularisierten und rezeptiven Endometriums für die erfolgreiche Implantation und nachfolgende Ausbildung der Plazenta essentiell ist (Reynolds et al., 1992, Torry et al., 1992). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass vom humanen Endometrium eine Reihe von Wachstumsfaktoren mit grundlegenden Auswirkungen auf die Angiogenese exprimiert wird.

In den letzten 20 Jahren konnte eine steigende Anzahl von angiogenen Wachstumsfaktoren identifiziert werden, welche grob in Peptide und Nicht-Peptide (Smith et al., 1998) eingeteilt werden können. Eine besonders herausragende Rolle spielt hierbei der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

VEGF ist ein Protein mit einer Molekülgröße von 46 kDa, welches aus zwei identischen Untereinheiten von je 23 kDa aufgebaut ist (Connolly et al., 1989). Durch alternatives Spleißen entstehen aus demselben Genprodukt mindestens fünf verschiedene Isoformen (Ferrara et al. 1991, Houck et al., 1991, Charnock-Jones et al., 1993), welche sich durch unterschiedliche Sekretionsmuster, signifikante Strukturunterschiede, sowie differierende isoelektrische Punkte unterscheiden (Smith et al., 1998). Vier dieser Isoformen, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₃, VEGF₁₈₉, kommen im Uterusgewebe Schwangerer und Nichtschwangerer vor, alle werden sezerniert, jedoch sind nur die Isoformen VEGF 121 und VEGF 165 löslich, während die anderen Isoformen an heparinhaltige Proteoglykane im Bereich der Zelloberfläche, der Basalmembran oder der extrazellulären Matrix gebunden vorliegen (Cooper et al., 1995). Sie werden deshalb erst durch Gewebsverletzung bzw. Zelluntergang, wie z.B. während der Menstruation oder durch Freisetzung proteolytischer Enzyme bei der Invasion und Implantation des Trophoblasten, freigesetzt.

Die Wirkung des VEGF wird über drei spezifische VEGF-Rezeptoren vermittelt, VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4) welche zur Familie der Thyrosinkinase-Rezeptoren gehören (Terman et al., 1992,). Sie sind transmembran lokalisiert und bestehen aus sieben extrazellulär lokalisierten immunglobulinähnlichen Schleifen, sowie aus einer intrazellulären Domäne für Thyrosinkinase. VEGFR-1 und VEGFR-2 haben eine hohe Bindungsaffinität zum VEGF und stellen die entscheidenden Regulatoren von Angiogenese und Vasculogenese dar. VEGFR-1 wird außer von Endothelzellen auch von Monozyten und Trophoblasten exprimiert und vermittelt die Zellmigration. VEGFR-2, auch auf

retinalen Vorläuferzellen, Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen lokalisiert, vermittelt die Endothelproliferation und ist somit der Hauptregulator der Angiogenese (Weston et al., 2000). Beide Rezeptoren konnten außerdem auch auf Spermatozoen nachgewiesen werden (Obermair et al., 1999).

Die wohl wichtigsten Funktionen des VEGF im humanen Endometrium betreffen das Gefäßendothel. Hier induzieren sie einerseits die Proliferation und Migration der endometrialen Endothelzellen und fördern damit unmittelbar die Angiogenese (Connolly et al. 1989; Keck et al. 1989). Synergistisch wirkt hierbei der Abbau der umgebenden Matrix durch Kollagenasen, deren Freisetzung aus Endothelzellen ebenfalls durch VEGF reguliert wird (Smith 1998). Andererseits fördert VEGF die Vasodilatation durch Ausschüttung von Stickstoffoxid und Prostazyklinen aus Endothelzellen (Papapetropoulos et al. 1997) und erhöht gleichzeitig die Gefäßpermeabilität. Zusätzlich wirkt VEGF fördernd auf Gerinnung und Fibrinolyse ein, und bewirkt durch Induktion bestimmter Rezeptoren bzw. Adhäsionsmoleküle eine Migration spezifischer immunologischer Zellen, wie z.B. Monozyten, Makrophagen oder natürlicher Killerzellen (Smith et al. 1998).

Eine Reihe experimenteller Untersuchungen befasste sich zudem mit der Lokalisation von VEGF und seiner Rezeptoren in der menschlichen Plazenta während der Schwangerschaft. Diese Untersuchungen legten nahe, dass VEGF an der Regulation sowohl der fetalen und maternalen Angiogenese in der Plazenta, als auch der Migration und Implantation des Trophoblasten, sowie dessen Funktion im Schwangerschaftsverlauf beteiligt ist, womit ihm eine wichtige Rolle für Entstehung und Erhalt der Schwangerschaft zukommt.

Weiterhin konnte eine Reihe neuerer Studien die Bedeutung von VEGF für die Entwicklung von Epithelzellen zeigen. So konnten Karihaloo et al. 2005 die Bedeutung von VEGF bei der Entwicklung der renalen Epithelzellen nachweisen. Im selben Zellsystem zeigte sich des Weiteren, dass mittels autokriner Stimulation VEGF sowohl zu einer Steigerung der Zellproliferation als auch zu einem Anstieg der Zellvitalität führt (Villegas et al. 2005). Somit scheinen VEGF, sowie die entsprechenden Rezeptoren und Liganden eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Drüsenzellen zu spielen (Punyadeera et al. 2006).

Die Expression von VEGF im humanen Endometrium ist sowohl zell- als auch zyklusspezifisch. Im Zyklusverlauf kommt es zu einem charakteristischen Wandel des Expressionsmusters des VEGF, was sowohl auf molekularer Ebene mittels in-situ Hybridisierung bzw. RNase Protection Assay als auch auf immunhistochemischer Ebene gezeigt werden konnte (Gordon et al. 1995, Shifren et al. 1996, Hornung et al. 1998). Mittels RNase Protection Assay konnten anhand intakter Endometriumbiopsien in der späten Sekretionsphase drei- bis sechsfach erhöhte Mengen der spezifischen messenger-RNA (mRNA) im Vergleich zur frühen Proliferationsrate nachgewiesen werden, wovon die einzelnen Isoformen des VEGF in gleichem Ausmaß betroffen waren (Torry et al. 1996).

Für die Proliferationsphase konnte mittels in-situ Hybridisierung und Immunhistochemie gezeigt werden, dass VEGF sowohl von epithelialen Drüsenzellen als auch, allerdings in weniger starkem Ausmaß, von Stromazellen exprimiert wird, in der Luteinisierungsphase kam es jedoch zu einem drastischen Rückgang der mRNA Expression in den Stromazellen, sowie zu einem sprunghaften Anstieg derselben in den Epithelzellen (Charnock-Stones et al. 1993). Stromazellen waren in der immunhistochemischen Färbung zudem durch eine diffuse Anfärbbarkeit gekennzeichnet, während die glandulären Epithelzellen eine starke fokale Anfärbbarkeit im Bereich der apikalen Zelloberfläche zeigten, was die Vermutung nahe legt, dass eine Sekretion von VEGF ins Lumen der Drüsenschläuche stattfinden könnte, um dort über verschiedene Mechanismen auf die Implantation der Blastozyste zu wirken (Hornung et al. 1998).

Obwohl bisher kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und vaskulärem Proliferationsindex im Endometrium nachgewiesen werden konnte scheint VEGF eine wichtige parakrine Regulatorfunktion für Gefäßwachstum und Entwicklung im Endometrium darzustellen (Torry et Torry 1997). Hierfür spricht insbesondere ein deutlicher zeitlicher Zusammenhang zwischen einer gesteigerten endothelialen Proliferation und zunehmender endometrialer VEGF-Expression von der späten Proliferations- zur mittleren Sekretionsphase (Li et al. 1994, Shifren et al. 1996, Torry et al. 1996).

4.4 Endometriale Expression und Funktion von IL-1- β

Das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) ist ein Polypeptid, welches von einem breitem Zellspektrum, insbesondere aber von Makrophagen produziert wird und als proinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle bei der Entstehung und im Ablauf von Entzündungsprozessen spielt (Dinarello 1996). Ähnliche Abläufe finden sich auch bei den zyklusabhängigen endometrialen Veränderungen, weshalb es wenig verwunderlich scheint, dass IL-1 ebenso in wichtige reproduktive Vorgänge involviert ist und eine tragende Rolle bei den zahllosen Veränderungen des Endometriums während des weiblichen Zyklus spielt (Tabibzadeh 1991).

Das IL-1-System des menschlichen Endometrium setzt sich aus den beiden Untergruppen IL-1 α und IL-1 β , mit einem identischen Molekulargewicht von 17,5 kDA, dem Rezeptor-Antagonisten IL-1ra, sowie zwei Rezeptoren, dem IL-1 receptor type I (IL-1 Rt I) und dem IL-1 receptor type II (IL-1 Rt II) zusammen, von denen jedoch lediglich IL-1 Rt I funktionelle Aktivität im Endometrium besitzt. Neben T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen ist er im Oberflächenepithel des Endometriums lokalisiert und wird dort mittluteal am stärksten exprimiert (Bigonnesse et al. 2001, Lindhard et al. 2002). Der IL-1 Rt II fungiert als Antagonist von IL-1 und wird am schwächsten am Tag LH +7 exprimiert (Bigonnesse et al. 2001). Darüber hinaus zeigt er eine überwiegende epitheliale Expression, seine luminale Sekretion wird in der mittleren Sekretionsphase passager downreguliert (Boucher et al. 2001), was auf eine implantationsfördernde Funktion von IL-1 hinweist. Die Korrelation der Konzentration von IL-1 β mit dem Serumöstrogenspiegel spricht zudem für eine steroidhormonregulierte Expression.

Viele Studien haben mittlerweile gezeigt, dass das IL-1 System besonders im Verlauf der Implantation und während der entzündungsähnlichen Abläufe am Ende des Zyklus bei ausgebliebener bzw. fehlgeschlagener Implantation eine wichtige Rolle spielt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 von menschlichen Embryonen sezerniert wird und somit vermutlich Teil des komplexen embryo-maternalen Kommunikationssystems ist (De Los Santos et al. 1996).

Von besonderer Bedeutung für das menschliche Endometrium scheint hierbei IL-1 β zu sein, welches im Endometrium sowohl von Epithel- und Stromazellen als auch von Makrophagen exprimiert wird (Bergquist et al. 2001). IL-1 β mRNA konnte im Endometrium während des gesamten Zyklus nachgewiesen werden, wobei die

Expression in der proliferativen Phase etwas stärker ist, als in der frühen sekretorischen Phase (von Wolff et al. 2000). Zum Zeitpunkt der Implantation kommt es zu einem Anstieg der mRNA. Dies entspricht dem Verlauf der IL-1 β Serumspiegel im peripheren Blut während des weiblichen Zyklus. Tabibzadeh et al. gelang 1989 der Nachweis, dass IL-1 β die Expression von IL-6 durch endometriale Zellen reguliert. Außerdem scheint IL-1 β eine entscheidende Regulationsfunktion auf die endometriale IL-6 Expression auszuüben (Tabibzadeh et al. 1989, Laird et al. 1994), was durch Vandermolen et al. 1996 bestätigt wurde. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass IL-1 β in vitro sowohl zeit- als auch dosisabhängig zu einem Anstieg der endometrialen IL-6 Produktion führt.

Für IL-1 β konnte eine Korrelation einer supprimierten Expression mit Implantationsstörungen nachgewiesen werden (Stewart et al. 1992; Simon et al. 1998; von Wolff et al. 2000).

Die mRNA-Expression für IL-1 β , IL-1ra und IL-1 Rt I durch humane Embryonen in der Präimplantationsphase scheint dabei eine erste Antwort der Blastozyste an das rezeptive Endometrium darzustellen und die Freisetzung einer zweiten Zytokinwelle zu bewirken (Cross et al. 1994), welche schließlich zur Einleitung der Adhäsionsphase führt. Im Tiermodell konnte zudem nachgewiesen werden, dass aus der intrauterinen Injektion von IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra), welche zur Blockade der luminalen IL-1-Rezeptoren führten, ein Implantationsversagen resultiert (Simon et al. 1994). Dabei konnte in weiterführenden Untersuchungen eine direkte Wirkung des IL-1ra auf die Plasmamembran der endometrialen Epithelzellen festgestellt werden (Simon 1998), wobei die Transformation der Plasmamembran, welche der Implantation unmittelbar vorausgeht, inhibiert wird. Darüber hinaus haben immunhistochemische Untersuchungen gezeigt, dass Mäuse, welche mit IL-1ra behandelt wurden eine verminderte Expression der Integrinuntereinheiten α_4 , α_V und β_3 zeigen, welche eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Blastozyste am endometrialen Epithel zu spielen scheinen (Lindhard et al. 2002). Embryonen dieser mit IL-1ra behandelten Mäuse zeigten jedoch eine normale Implantationsfähigkeit wenn sie auf normale, nicht behandelte Mäuse übertragen wurden. Somit hat IL1 β ra bei Mäusen keinen embryotoxischen Effekt, es scheint jedoch die Rezeptivität des Endometrium in entscheidender Weise zu beeinflussen.

IL-1 führt zwar in-vitro- zu einer Hemmung der Blastozystenadhäsion an Fibronectin, fördert jedoch das Auswachsen trophoblastärer Zellen der bereits adhären

Blastozyste (Haimovici et al. 1993), was ebenfalls für eine Funktion des IL-1 β beim Attachment der Blastozyste spricht.

Fazleabas et al. sahen 2002 in IL-1 β einen möglichen entscheidenden Faktor bei der Differenzierung der Stromazellen in Deziduazellen in der Frühschwangerschaft.

Die IL-1 β vermittelte Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in humanen endometrialen Stromazellen (Huang et al. 1998), veranlasste Simon et al. 2000 zu dem Schluss dass periimplantatorisch ein IL-1 β vermittelter parakriner Effekt in der Kontrolle der Prostaglandinsynthese vorliegt. Diese wiederum bewirken einen Anstieg der vaskulären Permeabilität (Kennedy 1985) als Zeichen der beginnenden Implantationsphase (Psychoyos 1985).

4.5 Endometriale Expression und Funktion von G-CSF

Der Granulocyten colony-stimulating-factor (G-CSF) stellt eines der am häufigsten im Rahmen der Chemotherapie-induzierten Neutropenie eingesetzten Zytokine dar (Masishi 2001, Jansen et al. 2002). Seine Wirkung beruht auf einer Mobilisierung der myeloischen Stammzellen im Knochenmark, sowie auf einer gesteigerten Zelldifferenzierung der myeloischen Reihe. Physiologischerweise wird G-CSF von Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen gebildet und wirkt im Rahmen der physiologischen Zellerneuerung auf das Knochenmark ein. Neuere Studien belegen jedoch auch eine nicht hämatopoetische Funktion von G-CSF, insbesondere scheint es bei der utero-plazentaren Kommunikation eine wichtige Rolle zu spielen.

Die biologische Wirkung von G-CSF erfolgt Rezeptor-vermittelt (Fukanaga et al. 1990 a, b). Dabei existieren mindestens vier verschiedene Rezeptoren (G-CSFR), welche zur Familie der Zytokinrezeptoren gehören, und von denen drei in membrangebundener und einer in löslicher Form vorliegen (Bazan 1990, Fukanaga et al. 1990, Larsen et al. 1990). Im Gegensatz zu den Granulozyten, welche ausschließlich den membrangebundene Klasse-I Rezeptor exprimieren (Larsen et al. 1990), konnte aus Plazentagewebe die DNA dreier verschiedener G-CSFR isoliert werden (Fukanaga 1990a,b; Larsen 1990). Zusätzlich kommt der Rezeptor auf Trophoblasten vor (Uzumaki et al. 1989), wodurch eine Einflussnahme auf Wachstum und Entwicklung der genannten Zellen möglich wäre.

Im Endometrium wird G-CSFR von Epithel- und Stromazellen, sowie von Leukozyten exprimiert (Saito et al. 1994, Mc Cracken et al. 1999).

In Deziduagewebe wurde über eine Expression durch Makrophagen (Shorter et al. 1992) und natürliche Killerzellen (Saito et al. 1994) berichtet. G-CSF scheint dabei die 8-Br-cAMP-induzierte Dezidualisierung der Stromazellen zu Prolaktin-sezernierenden Zellen zu fördern (Tanaka et al. 2000), und ist damit essentiell für eine ungestörte Implantation des Embryos. Epitheliale Stromazellen sezernieren ständig geringe Mengen G-CSF, diese Sekretion wird durch Makrophagen-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF) gesteigert (Tanaka et al. 2003). M-CSF wird in großer Menge von dezidualisierten endometrialen Stromazellen, sowie Immunzellen im Deziduagewebe produziert (Salamonsen et al. 2000). Tanaka et al. gelang 2003 der Nachweis, dass M-CSF die G-CSF Produktion durch endometriale Stromazellen dosisabhängig reguliert. Gleichzeitig zeigte sich, dass die Zellentwicklung der M-CSF sensiblen Zellen durch hohe Dosen supprimiert wird, so dass sowohl die Dezidualisierung und Entwicklungsfähigkeit der Stromazellen, als auch die G-CSF-Sekretion nicht stimulierter Stromazellen durch M-CSF reguliert wird.

Die Plazenta stellt eines der wenigen nicht-hämatopoetischen Gewebe dar, welche G-CSF exprimieren. Bei Mäusen konnte G-CSF in Spongiotrophoblasten der Plazenta und in Trophoblasten des Labyrinths gefunden werden (Saito et al. 1994), in humanen Plazentaexplantaten gelang der G-CSF-Nachweis sowohl im ersten, als auch im dritten Trimenon (Shorter et al. 1992, Li et al. 1996). McCracken et al. zeigten 1999, dass G-CSF von Stromazellen der Plazenta und der mütterlichen Dezidua exprimiert wird. Außerdem konnten sie nachweisen, dass es im Rahmen der Plazentaentwicklung zu einer strikten zelltyp- und entwicklungsstadienspezifischen Expression des G-CSF Rezeptors (G-CSFR) kommt. Obwohl die genaue Funktion des Zytokins noch nicht näher bekannt ist, stützt das spezifische Expressionsmuster der plazentaren Rezeptorexpression die Hypothese, dass G-CSF eine wichtige Funktion bei Invasion und Erhalt des Trophoblasten während der Plazentaentwicklung hat.

In jüngeren Studien konnte eine Reihe immunologischer Vorgänge identifiziert werden, welche durch G-CSF reguliert werden. Dazu gehört beispielsweise die Suppression natürlicher und Lymphokin-aktivierter Killerzellen und die Induktion einer Th2-Antwort (Kitabayashi et al. 1995, Sloan 2000, Taga 1993, Miller et al 1997).

Die genaue Rolle von G-CSF im menschlichen Endometrium bleibt weiterhin unklar, jedoch existieren eine Reihe potentieller Funktionen. Beispielsweise könnte G-CSF im Rahmen der prämenstruellen Einwanderung von Granulozyten in das

Endometrium (Noyes et al. 1950) durch Verstärkung deren bakterizider Wirkung protektiv gegen die Entstehung einer Endometritis wirken (Clark et al. 1987). Die gleichmäßige Sekretion während der frühen und späten Proliferationsphase ist mit einer Rolle bei der Gefäßentwicklung des proliferativen Endometriums vereinbar, da nachgewiesen werden konnte, dass G-CSF die Proliferation und Migration der Endothelzellen stimuliert (Bussolino et al. 1989).

4.6 Regulation durch 17- β -Östradiol und Progesteron

Eine intakte zyklusabhängige endometriale Differenzierung bildet die Basis für eine normale uterine Empfänglichkeit nach der Konzeption. Hierbei koordinieren die Steroidhormone Östradiol und Progesteron unter Vermittlung verschiedener Wachstumsfaktoren die endometriale Expression von Proteinen, Adhäsionsmolekülen (Tabibzadeh, 1992, Denker, 1993, Lessoi et al., 1994) und Zytokinen (De et al. 1993, Paria et al., 1990), wobei Wachstumsfaktoren höchstwahrscheinlich als lokale Mediatoren dienen.

Während der Proliferationsphase kommt es unter Vermittlung des von Follikelzellen sezernierten Östradiols im Endometrium zu einer Zunahme der epithelialen Drüsenzellen, der Fibroblasten im Stroma, sowie der Gefäßendothelzellen. Die Drüsen wachsen und strecken sich in die Länge. Unter dem Einfluss des Progesteronanstiegs kommt es nach der Ovulation zu einer sekretorischen Umwandlung des Gewebes. Das Drüsengewebe nimmt im Verhältnis zum Stroma zu, Epithelzellen bilden sekretorische Proteine, außerdem kommt es zu einer intrazellulären Anhäufung von Glykoproteinen. Wie bereits von Noyes et al. 1950 im Rahmen der histologischen Datierung endometrialer Biopsien anhand histologischer Kriterien beschrieben wurde, kommt es in der mittleren bis späten Proliferationsphase zusätzlich zur Ausbildung eines Stromaödems als Zeichen einer prädezidualen Umwandlung. Unterbleibt die Implantation führt dies zu einem starken Abfall der Progesteronsekretion aus dem Corpus luteum und damit des Progesteronspiegels im Blut. Unter dem Einfluss des Hormonentzugs tritt eine Konstriktion der distalen Anteile der Spiralarterien auf (Markee et al., 1940), an den Zyklustagen 1-4 kommt es des Weiteren zu einer diffusen Gewebsnekrose, zu Gefäßthrombosen sowie zu einer generalisierten Entzündungsreaktion, was

schließlich in der Abstoßung des Stratum functionale, und somit im Auftreten der Menstruation mündet (Kurman, 1987, Noyes et al. 1950).

Obwohl Uteruszellen in vivo äußerst sensibel auf Östrogen reagieren, fehlt diese Reaktion in vitro vollständig, was nahe legt, dass die Effekte der Steroidhormone auf endometriale Zellen indirekt über auto- bzw. parakrine Stimulation durch Zytokine reguliert werden. Während sich viele Arbeiten mit der Identifizierung und Lokalisation der entsprechenden Hormonrezeptoren im Endometrium befassten (Perrot- Applanat et al. 1989) ist über das Zusammenspiel der Steroidhormone als systemische Regulatoren und der Zytokine als lokale Mediatoren noch sehr wenig bekannt. Ziel unserer Arbeit war es, genauere Erkenntnisse über die regulatorischen Effekte der Steroidhormone auf die quantitative mRNA-Expression verschiedener Zytokine der endometrialen Epithel- und Stromazellen zu gewinnen.

4.6.1 Regulation von VEGF, IL-1- β und G-CSF durch Hormonstimulation und Hormonentzug

Die Entwicklung des menschlichen Endometriums während des Menstruationszyklus untersteht der Kontrolle von Östrogen und Progesteron. Teil dieser Veränderungen ist eine umfangreiche Angiogenese mit Einsprossung neuer Blutgefäße. Dies ist unabdingbar für eine Erneuerung des Endometriums nach Abstoßung des Stratum functionale während der Menstruationsblutung. Das Gefäßwachstum stellt eine entscheidende Komponente im Prozess der endometrialen Entwicklung und Differenzierung im Hinblick auf die Implantation dar (Giudice 1994). Während der Proliferationsphase und im Verlauf der Sekretionsphase kommt es zur Ausbildung eines komplexen subepithelialen Gefäßplexus, gleichzeitig kommt es durch eine Steigerung der vaskulären Permeabilität zu einer Wandlung des dünnen und dichten Endometriums zum dicken und hoch ödematösen sekretorischen Endometrium. Diese vaskulären Veränderungen werden durch Östrogen und Progesteron gesteuert, welche die Produktion angiogenetischer Faktoren induzieren (Charnock-Stones et al. 1993, Zhang et al. 1995, Shifren et al. 1996).

Eine Reihe von Studien beschäftigte sich bereits mit der Wirkung von Östrogenen und Progesteron auf die VEGF-Sekretion der Stromazellen. So konnten beispielsweise Bausero et al. 1998 zeigen, dass eine Stimulation mit Östradiol bzw. Östradiol und Progesteron zu einem signifikanten Anstieg der endometrialen mRNA-Expression für VEGF bei in vitro kultivierten Stromazellen kam. Shifren et al. kamen

1996 unter Benutzung von Östradiol und Medroxyprogesteronacetat zum selben Ergebnis. Dies konnte durch unsere Studien nicht bestätigt werden. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression für VEGF durch Stimulation mit 17 β -Östradiol, Progesteron oder einer Kombination beider Steroide konnte weder bei endometrialen Stromazellen, noch bei den epithelialen Drüsenschläuchen beobachtet werden. Der Entzug der Steroidhormone erbrachte ebenfalls keinerlei Effekt auf die endometriale mRNA Expression von VEGF. Eine mögliche Ursache dieser differierenden Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Aufarbeitung des Zellmaterials und dem damit verbundenen unterschiedlichen Reinheitsgrad der Zellkulturen liegen. So scheint es naheliegend, dass ein hoher Leukozytenanteil im Endometrium, welcher je nach Entnahmezeitpunkt bis zu 40 % betragen kann (Salamonsen et Wooley 1999), zu einer starken Verfälschung der Ergebnisse beitragen kann. Durch die Aufreinigung unserer Zellkulturen mittels magnetischer Beads ist in unserem Fall jedoch eine Verunreinigung weitgehend auszuschließen.

Zur genauen Klärung sollten diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Implantation der Blastozyste scheint wie oben bereits ausführlich beschrieben IL-1 β zu spielen.

Hierbei scheint die Korrelation der Konzentration von IL-1 β mit dem Serum-Östrogenspiegel ebenso wie der Peak am vierten Gestationstag für eine steroidhormonregulierte Expression zu sprechen. Dies konnte jedoch in unseren Experimenten nicht bestätigt werden, weder Stimulation mit, noch Entzug von Hormonen führte zu einer signifikanten Änderung der IL-1 β mRNA-Expression in humanen endometrialen Epithel- bzw. Stromazellen, so dass eine direkte Regulation des Zytokins durch Steroidhormone unwahrscheinlich erscheint. Vielmehr scheint eine indirekte Steuerung der Expression von IL-1 β mittels verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren denkbar.

4.7 Regulation durch Zytokine

Nachdem durch eine Stimulation der kultivierten endometrialen Zellen mit Steroidhormonen kein Anstieg der Zytokinexpression verzeichnet werden konnte, stellt sich die Frage, ob die Regulation der Zytokinexpression über einen anderen

Mechanismus, beispielsweise indirekt durch Stimulation mit anderen Zytokinen, erfolgt.

4.7.1 Regulation von VEGF durch die Zytokine IL-1 β und IL-6

Obwohl VEGF bereits seit langem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist, die auf eine wichtige Funktion des Wachstumsfaktors bei der zyklischen Entwicklung des Endometriums, sowie bei Entstehung und Erhalt einer Schwangerschaft hindeuten, ist über die Regulationsvorgänge, die zu einer verstärkten oder verminderten Freisetzung von VEGF führen, noch sehr wenig bekannt. Neben einer Regulation der VEGF-Expression durch Hypoxie, wie sie in dieser Arbeit bereits ausführlich erörtert wurde, kommt eine Steuerung durch verschiedene, im Endometrium vorkommende Zytokine und deren Rezeptoren in Betracht. Aus den bisher zu diesem Thema durchgeführten Experimenten ergaben sich eine Reihe potentieller Mediatoren der VEGF-Regulation, zu denen insbesondere Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- α (TGF- α), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (Stavri et al. 1995), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) (Warren et al. 1996), sowie IL-1 β (Li et al. 1995) und IL-6 (Cohen et al. 1996) zählen.

Wie bereits an anderer Stelle beschrieben konnte IL-1 β in menschlichem Endometrium, Makrophagen, Endothelzellen, sowie in Blastocysten nachgewiesen werden (Polan et al. 1995). Li et al. gelang 1995 der Nachweis, dass es durch Stimulation glatter Muskelzellen aus der Aorta von Ratten zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der VEGF mRNA-Sekretion kam. Bereits die Zugabe von 0,1 ng/ml IL-1 β führte zu einer Verdopplung der mRNA, die Stimulation mit 10 ng/ml bewirkte sogar einen 4-fachen Anstieg. Im endometrialen Stromazellkulturen führte IL-1 β ebenfalls zu einer Induktion von VEGF (Sunder & Lenton 2000), welches wiederum Angiogenese in endometrialen Stromazellen, Integrinexpression in mikrovaskulären endothelialen Zellen, Endothelzellproliferation, sowie die Freisetzung von Stickstoffoxid und Prostazyklinen aus endothelialen Zellen, und damit Vasodilatation, zur Folge hat (Smith 1998). In unseren Untersuchungen führte weder die Stimulation endometrialer Stromazellen noch die Stimulation endometrialer Epithelzellen zu einem Anstieg der mRNA-Expression für VEGF. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in der

geringeren Kontamination unserer Kulturen mit ebenfalls Zytokin produzierenden Immunzellen liegen.

Neben VEGF als spezifischem Mitogen endothelialer Zellen liegt auch IL-6 in Geweben mit aktiver Angiogenese in erhöhter Konzentration vor. Hierbei kommt es jedoch nicht zu einer Induktion der Endothelzellproliferation. Vielmehr konnten Stimulationsversuche verschiedener Zelllinien mit IL-6 eine signifikante Induktion der spezifischen mRNA für VEGF nachweisen. Somit scheint IL-6 indirekt über eine Steigerung der Expression der spezifischen mRNA für VEGF Einfluss auf die Angiogenese zu nehmen. Molekularbiologisch bindet IL-6 nicht nur an spezielle Bereiche der Promoterregion des betreffenden Genes, sondern vermittelt seine Wirkung auch durch Interaktion mit der 5'UTR (untranslated region) der spezifischen mRNA für VEGF, so dass diese spezielle Region eine wichtige Rolle für die Modifikation der mRNA-Expression sowohl während der Transkription, als auch posttranskriptionell spielt (Cohen et al. 1996).

In unseren Zellkulturen führte jedoch die Stimulation von Stromazellen und Epithelzellen mit IL-6 zu keiner gesteigerten VEGF mRNA Expression.

4.7.2 Regulation von IL-1 β durch die Zytokine IL-1 β und IL-6

Wie bereits an anderer Stelle ausführlich erörtert (vgl. Kap.4.4), ist das IL-1 System in eine Reihe reproduktiver Vorgänge involviert und spielt insbesondere bei der Regulation des komplizierten Implantationsprozesses eine wichtige Rolle.

Insbesondere für die Invasion der Blastozyste scheint IL-1 β von entscheidender Bedeutung zu sein wie Simon et al. 1998 an Versuchen mit Mäusen nachweisen konnten. Durch die Interaktion von IL-1 β und seinem Rezeptor IL-1 Rt1 wird eine kaskadenartige Reaktion in Gang gesetzt, wobei es unter anderem zur Ausschüttung von Interleukinen und Interferonen kommt, wodurch die Apposition und Invasion des Embryos ermöglicht wird.

Während bereits mehrere Autoren eine Stimulation der IL-6 Sekretion durch IL-1 β propagierten (Tabibzadeh 1991), wurden bisher nur einige wenige Aussagen zu einer möglichen Stimulation der IL-1 β Sekretion durch IL-6 getroffen. Das et al. stellten 2002 fest, dass die Stimulation mit IL-6 zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β Sekretion humaner trophoblastärer Zellen führte.

Unsere Untersuchungen erbrachten das Ergebnis einer Steigerung der IL-1 β mRNA Synthese in endometrialen Stromazellen, so dass festgehalten werden kann, dass im humanen Endometrium eine gegenseitige Stimulation der Freisetzung von IL-1 β und IL-6 stattfindet. In Epithelzellen zeigte sich erneut kein signifikanter Anstieg der IL-1 β Sekretion.

Interessanterweise konnte auch bei Stimulation mit rekombinantem IL-1 β ein Sekretionsanstieg der endometrialen IL-1 β mRNA erzielt werden, so dass sich die Frage stellt, ob die IL-1 β Sekretion in vivo ebenso wie in vitro durch IL-1 β gesteigert werden kann. Hierzu sind in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig.

4.7.3 Regulation von G-CSF durch die Zytokine IL-1 β und IL-6

Viele Gewebe sezernieren G-CSF als Reaktion inflammatorische Proteine, wie z.B. IL-1 (Clark et al 1987), so dass G-CSF als Mediator der IL-1 Wirkung auftritt. Im Knochenmark kommt es z.B. IL-1 vermittelt zur Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie z.B. G-CSF, welche dann Wachstum und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen fördern.

Bereits 1996 konnten Vandermolen et al. nachweisen, dass IL-1 β zu einer zeit- und dosisabhängigen Stimulation der G-CSF Produktion durch humane Endometriumzellen führt. Allerdings erfolgte in diesen Experimenten keine getrennte Kultivierung von Epithel- und Stromazellen, so dass keine Aussage über die für die Sekretion von G-CSF verantwortliche Zellart möglich ist. Unsere Studien konnten eine Stimulation der G-CSF Expression durch Stromazellen bestätigen, in Epithelzellkulturen blieb die Zugabe von IL-1 β ohne signifikanten Effekt.

Aus der Tatsache, dass IL-1 β und sein Rezeptor IL-1Rt1 in implantationsfähigem Endometrium in höheren Konzentrationen vorliegen als im Endometrium von Frauen mit rezidivierendem Implantationsversagen (von Wolff et al. 2000), dass G-CSF von dezidualisiertem Endometrium produziert wird (Shorter et al. 1992) und dass G-CSF-Rezeptoren an der Oberfläche von Trophoblasten gefunden werden konnten (Uzumaki et al. 1989), ergibt sich die Frage einer G-CSF vermittelten IL-1 β Wirkung auf die Trophoblasten zum Zeitpunkt der Implantation. Bekräftigt wird dies durch die Ergebnisse von Simon et al. 1993 und 1998 (vgl. Kap. 4.4), welche die Notwendigkeit von IL-1 β für die Implantation bestätigen konnten.

4.8 Regulation durch Hypoxie

Zellen sind in der Lage niedrige Sauerstoffkonzentrationen zu registrieren und sich diesen anzupassen, so dass die entsprechenden Gewebe unter hypoxischen Bedingungen überleben können (Sandner et al. 1997). Dazu werden auf zellulärer Ebene, gesteuert durch sog. Transkriptionsfaktoren, die Gene bestimmter Wachstumsfaktoren vermehrt transkribiert, so dass die entsprechende mRNA vermehrt exprimiert wird. Andererseits hemmt die hypoxische Situation die Denaturierung, woraus eine erhöhte Stabilität der mRNA resultiert. Ein Beispiel hierfür ist das Erythropoetin, welches für die Regulation der Erythropoese verantwortlich ist, woraus schließlich eine bessere Sauerstoffbindungskapazität des Blutes, und somit eine bessere Sauerstoffversorgung der hypoxischen Gewebe resultiert (Jelkmann W. 1992). Zusätzlich werden dem Organismus durch Induktion glykolytischer Enzyme alternative Stoffwechselwege eröffnet, die auch unter anaeroben Bedingungen beschränkt werden können (Graven et al. 1994).

Neben vielen anderen Zellen des menschlichen Organismus ist auch das humane Endometrium im Zyklusverlauf hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, insbesondere herrschen diese zum Zeitpunkt der Menstruation im Bereich des distalen Endometriums vor. Aus diesem Grund untersuchten wir am Zellkulturmodell die Auswirkungen der Hypoxie auf die quantitative mRNA-Expression verschiedener Zytokine.

4.8.1 Regulation von VEGF durch Hypoxie

Die Tatsache, dass die Verabreichung eines spezifischen VEGF-Antagonisten bei weiblichen Ratten zu einer Unterbrechung der ovariellen und endometrialen Entwicklung führte, stützt die Hypothese, dass VEGF eine Schlüsselfunktion bei der zyklischen Angiogenese des weiblichen Reproduktionstraktes besitzt (Ferrara et al. 1998). Bis dato konzentrierten sich jedoch die meisten Studien auf die Rolle der Steroidhormone als Regulatoren der VEGF-Expression im endometrialen Zyklus. In unserer Arbeit untersuchten wir deshalb den Einfluss von Hypoxie auf die Expression von VEGF bzw. dessen spezifischer mRNA.

Hypoxie gilt als wichtiger Faktor für die Gefäßneubildung (Ferrara et al. 1997, Aiello et al. 1994), wodurch eine Verbesserung der Sauerstoffzufuhr zu hypoxischen

Gewebe erreicht werden kann. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die 24-stündige Kultivierung frisch isolierter endometrialer Stroma- und Epithelzellen unter hypoxischen Bedingungen sowohl zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion in die Kulturüberstände, als auch zu einer gesteigerten Expression der entsprechenden mRNA führte (Sharkey et al. 2000). In den Drüsenepithelien ergab sich ein durchschnittlicher Anstieg um den Faktor 3,2 in den Kulturen der Stromazellen betrug dieser durchschnittlich 1,8, wobei sich das Verhältnis der einzelnen Isoformen zueinander nicht änderte. Proteinbestimmungen mittels ELISA in denselben Kulturen erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchungen an unseren Epithel- und Stromakulturen bestätigt werden. Hypoxie stellt also einen relevanten Faktor für die gesteigerte VEGF-Expression in vitro dar.

Neuere Studien konnten dabei zeigen, dass die postmenstruellen Reparaturmechanismen und das nachfolgende Epithelwachstum von zwei Phasen der erhöhten Freisetzung angiogenetischer Faktoren bestimmt wird. Dabei stehen während der frühen Proliferationsphase vor allem Gefäßwachstum, Reparatur und Remodelling im Vordergrund, während in der späten Proliferationsphase die Zellreifung im Mittelpunkt steht (Nayak et Brenner 2002, Nikolaus et al. 2003, Charnock-Stones et al. 2004, Punyadeera et al. 2006).

Zum Zeitpunkt der Menstruation kommt es zu einer Vasokonstriktion der Spiralarteriolen und zum Einsetzen der Blutung. Die Sauerstoffsättigung im Gewebe sinkt rapide, was zu einem Anstieg der VEGF-codierenden mRNA führt. Die Induktion der mRNA verläuft Hypoxie-gesteuert über einen Transkriptionsfaktor, den sog. Hypoxia-Inducible-Factor-1 α (HIF-1 α) (Smith 1998). Fraglich ist allerdings ob die Regulation in vivo unter hypoxischen Bedingungen auf gleiche Art und Weise stattfindet. So zeigten z.B. Versuche, die Sandner et al. 1996 an Ratten durchführten, dass hypoxische Zustände in vivo nur geringen Effekt auf die VEGF-Expression hatten. Hierfür wurden Ratten über einen bestimmten Zeitraum in einer hypoxischen Atmosphäre mit einer Sauerstoffsättigung von 8% gehalten, anschließend wurde der mRNA Gehalt verschiedener Organe gemessen, wobei ausschließlich in der Leber ein Anstieg um 50% beobachtet werden konnte. Lunge, Herz, sowie Nieren zeigten keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als Grund für diese Diskrepanz in vitro und in vivo käme möglicherweise die Existenz von Inhibitoren der VEGF Produktion in vivo in Betracht.

Zusätzlich konnten Sandner et al. 1997 zeigen, dass es in vitalem Lebergewebe von Ratten in hypoxischer Atmosphäre zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression für den Tyrosinkinase-Rezeptor flt-1 kommt, während ein solcher Anstieg in isolierten Hepatocyten-Kulturen unter Inkubation mit 1% O₂ ausbleibt. Die Genexpression des VEGF-Proteins verhielt sich genau umgekehrt. Hier zeigte sich bei Kultivierung unter 1% O₂ bei den Hepatozyten ein Anstieg um das fünffache im Vergleich zur Kontrolle, während dieser in vivo nicht signifikant war. Ein Anstieg der Genexpression der anderen VEGF-Rezeptoren konnte in keinem der Ansätze nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Stimulation der Protein- und Rezeptorexpression in vivo und in vitro unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Obwohl diese Versuche an Hepatozyten durchgeführt wurden, stützen sie dennoch die Hypothese, dass die Funktion von VEGF in hypoxischem Gewebe nicht nur durch die gesteigerte Bildung des Proteins, sondern auch durch vermehrte Expression des Rezeptors gesteuert wird. Zur genaueren Klärung dieser Frage sind in Zukunft sicherlich weitere Studien notwendig.

4.8.2 Regulation von IL-1 β und G-CSF durch Hypoxie

Der stimulatorische Effekt von Hypoxie auf die IL-6 Produktion verschiedener Zelltypen, wie z.B. mononukleärer Blutzellen (Naldini et al. 1997) und Endothelzellen (Yan et al. 1997) ist unumstritten. Außerdem konnten von Wolff et al. 2002 zeigen, dass hypoxische Kulturbedingungen zu einem Anstieg der IL-1-Expression in endometrialen Epithel- und Stromazellen führen. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass Hypoxie eine wichtige Rolle bei der Regulation der genannten Zellen spielt.

Aus diesem Grund untersuchten wir den Einfluss von Hypoxie auf die endometriale mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β und G-CSF, welche beide eine wichtige Rolle im Rahmen der Implantation spielen. Für beide Zytokine konnte hierbei ein signifikanter Anstieg unter hypoxischen Kulturbedingungen festgestellt werden, wodurch die Bedeutung der Hypoxie für die endometrialen Regulationsvorgänge weiter bestärkt wird. Durch weiterführende Untersuchungen sollte die genaue Funktion hypoxischer Bedingungen im endometrialen Gewebe geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Die Regulation der endometrialen Zytokin- und Integrinexpression steht im Zentrum der aktuellen Forschungen zum Phänomen rezidivierender Frühaborte. Grundvoraussetzung für einen ungestörten Ablauf der Implantation scheint hierbei neben der Rezeptivität des Endometriums das maternale Erkennen und Tolerieren der Schwangerschaft, sowie die Invasivität der Blastozyste zu sein. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der embryo-maternale Dialog, welcher durch den bidirektionalen Austausch von löslichen Proteinen, wie z.B. Zytokinen, Chemokinen u.a. zwischen diesen beiden genetisch und immunologisch differenten Entitäten erfolgen kann. Die gestörte endometriale Zytokinexpression stellt somit eine mögliche Ursache für Implantationsversagen und rezidivierende Aborte in der Frühschwangerschaft dar.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der Auswirkungen der endometrialen Regulationsmechanismen Hormonstimulation und Hormonentzug, Zytokinstimulation und Stimulation mittels Hypoxie auf die mRNA-Expression verschiedener Zytokine am Kulturmodell endometrialer Zellen, wobei eine getrennte Kultivierung von Epithel- und Stromazellen erfolgte.

Eine wichtige Rolle im Rahmen der zyklischen endometrialen Veränderungen spielt die Angiogenese, welche u.a. durch den Wachstumsfaktor VEGF reguliert wird, zusätzlich scheint VEGF auch auf die Implantation der Blastozyste zu wirken. Im humanen Endometrium konnte durch eine Reihe von Studien eine zell- und zyklusspezifische Expression, mit einem deutlichen Anstieg der VEGF-Sekretion von der frühen Proliferationsphase zur mittleren Sekretionsphase, nachgewiesen werden, wobei gezeigt werden konnte, dass VEGF v.a. von epithelialen Drüsenschläuchen und nur in geringem Umfang von Stromazellen exprimiert wird.

Viele Studien belegen den wichtigen Effekt von IL-1 β auf die Implantation und die Rezeptivität des Endometriums, außerdem scheint es im Rahmen der embryonalen Sekretion essentiell für die embryo-maternale Kommunikation zu sein. Die Expression der mRNA erfolgt zyklusabhängig mit einem Anstieg zum Zeitpunkt der Implantation.

Neben seiner wichtigen hämatopoetischen Funktion spielt G-CSF auch bei der utero-plazentaren Kommunikation eine wichtige Rolle. So scheint die endometriale

Produktion von G-CSF essentiell für eine Dezidualisierung der Stromazellen und damit für eine normale Implantation des Embryos zu sein.

Die ungestörte endometriale Differenzierung ist als Basis einer normalen uterinen Rezeptivität ein Effekt weiblicher Sexualhormone, welche durch Einwirkung auf die Epithel- und Stromazellen eine kaskadenartige Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induzieren, welche wiederum eine wichtige Rolle bei der endometrialen Integrinexpression spielen. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Steroidhormone 17- β -Östradiol und Progesteron auf die endometriale mRNA-Expression der Zytokine VEGF, IL-1 β und G-CSF untersucht.

Eine Reihe vorausgegangener Studien kam bereits zu dem Ergebnis, dass Stimulation der endometrialen Stromazellen mit 17- β -Östradiol zu einem Anstieg der VEGF-mRNA führt, was in unserer Studie nicht bestätigt werden konnte. Ebenso wenig führte die Stimulation der Epithelzellen mit den genannten Steroidhormonen bzw. der Entzug derselben zu einer signifikanten Änderung der entsprechenden mRNA-Expression.

Die Übereinstimmung der Serumkonzentration von IL-1 β mit dem Serumöstrogenspiegel, sowie dessen Peak am vierten Gestationstag legten die Vermutung einer steroidhormongesteuerten Expression nahe. Allerdings ergaben sich in unseren Kulturversuchen keinerlei statistisch erfassbare Veränderungen der IL1 β mRNA-Expression, was eine direkte Regulation des Zytokins durch Steroidhormone unwahrscheinlich macht.

Zur Auswirkung der Steroidhormone auf die Expression von G-CSF liegen zurzeit noch keine Daten vor, in unseren Kulturversuchen hatten weder Zugabe nach Entzug der genannten Steroide einen signifikanten Einfluss auf die Expression der endometrialen mRNA.

Nachdem Hormonstimulation und Hormonentzug keinen Effekt auf die endometriale Expression der untersuchten Zytokine hatte, stellte sich die Frage einer unmittelbaren Beeinflussung durch andere autokrine oder parakrine Faktoren wie zum Beispiel durch Zytokine. Ziel unserer Arbeit war deshalb den Einfluss von IL-6 und IL-1 β auf die Expression der entsprechenden mRNA zu untersuchen.

Neben einer Reihe anderer wichtiger Faktoren spielt in der Literatur IL-1 β und IL-6 eine wichtige Rolle bei der Regulation von VEGF. Entsprechend konnte in unserer

Studie eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression bei Stromazellen sowohl durch IL-1 β als auch durch IL-6 erzielt werden. In den Epithelzellkulturen konnte kein Effekt beobachtet werden.

Eine Stimulation der IL-6 Sekretion durch IL-1 β wurde bereits in vielen Studien beschrieben, unklar ist jedoch die Frage, ob umgekehrt auch eine Steigerung der IL-1 β Expression durch IL-6 stattfindet. In unseren Untersuchungen konnte dies für endometriale Stromazellen nachgewiesen werden. Ebenso führte die Stimulation mit rekombinantem IL-1 β zu einem Anstieg der mRNA Expression in den Stromazellen.

Einen weiteren wichtigen Regulationsfaktor für die endometriale Entwicklung stellt die Gewebshypoxie dar.

Unsere Untersuchungen konnten hierbei die bereits vorliegenden Ergebnisse, worin Hypoxie als entscheidender Faktor für eine gesteigerte endometriale VEGF Expression gesehen wurde, bestätigen. Dies diente zudem als Beweis der Funktionsfähigkeit unserer Kulturmodelle bei hypoxischen Bedingungen.

Darüber hinaus konnte auch für die Zytokine IL-1 β und G-CSF unter Hypoxie ein statistisch signifikanter Expressionsanstieg beobachtet werden, wodurch die Bedeutung der Hypoxie für die Regulationsvorgänge im humanen Endometrium weiter bestärkt wird.

Durch unsere Untersuchungen am Zellkulturmodell konnten neue Erkenntnisse über die physiologischen Regulationsvorgänge im humanen Endometrium gewonnen werden. Aufgrund der Komplexität der Abläufe, welche für die uterine Rezeptivität, das maternale Erkennen und Tolerieren der Schwangerschaft, sowie die Invasivität der Blastozyste verantwortlich sind, muss das erklärte Ziel weiterer intensiver Forschungsarbeit die vollständige Aufdeckung der komplexen Regulationsmechanismen sein, welche zur Klärung der Pathophysiologie rezidivierender Frühaborte und zur Entwicklung therapeutischer Konzepte dringend benötigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Aiello L.P., Avery R.L., Arrig P.G., Keyt B.A., Jampel H.D., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E. et al. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy or other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 331: 1480-1487.

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

Bausero P., Cavaille F., Meduri G., Freitas S., Perrot-Appianat M. (1998) Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. *Angiogenesis* 2: 167-182.

Bazan J. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6934–6938.

Beier H.M., Beier-Hellwig K. (1998) Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum. Reprod. Update* 4: 448-458.

Bergqvist A., Bruse C., Carlberg M., Carlström K. (2001) Interleukin-1- β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in endometrial tissue and in endometrium. *Fertil. Steril.* 75: 489-495.

Bigonnesse F., Marois M., Maheux R., Akoum A. (2001) Interleukin-1 receptor accessory protein is constitutively expressed in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* 7: 333-339.

Boucher A., Kharfi A., Al-Akoum M., Bossu P., Akoum A. (2001) Cycle dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biol. Reprod.* 65: 890-898.

Bussolino F. (1999) Tumor angiogenesis. *Recenti. Prog. Med.* 90: 28-36.

Carlson E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305: 609-613.

Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M., Rajput-Williams J., Burch D., Schofield J.P., Fountain S.A., Boocock C.A., Smith S.K. (1993) Identification and localisation of alternately spliced mRNA for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol. Reprod.* 48: 1120-1128.

Charnock-Jones D.S., Kaufmann P. and Mayhew T.M. (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 25: 103–113.

Cheung N., Wong M.P., Yuen S.T., Leung S.Y., Chung L.P. (1998) Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum. Pathol.* 29: 910-914.

Clark S.C, Kamen R. (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236: 1229-1237.

Classen-Linke I., Kusche M., Knauth R., Beier H.M. (1996) Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell. Tissue Res.* 287: 171-185.

Cohen T., Nahari D., Cerem L.W., Neufeld G., Levi B.Z. (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 271: 736-741.

Connolly D.T., Heuvelman D.M., Nelson R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino J.J., Siegel N.R., Leimgruber R.M., Feder J. (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 84: 1470-1478.

Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock-Jones DS, Smith SK. (1995) Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J. Reprod. Fertil.* 105: 205-213.

Cross J.C., Werb Z., Fischer S.J. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266: 1508-1517.

Das C., Kumar V.S., Grupta S., Kumar S. (2002) Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 53: 257-268.

De M., Sanford T.R., Wood G.W. (1993) Expression of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor α in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 1997: 83-89.

De los Santos M.J., Mercader A., Frances A., Portoles E., Remohi J., Pellicer A., Simon C. (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleucin-1 system during embryonic development. *Biol. Reprod.* 5: 563-574.

Denker H.W. (1993) Implantation: a cell biological paradoxon. *J. Exp. Zool.* 266: 541-558.

Dinarelo C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87: 2095-2147.

Dominguez F., Remohi J., Pellicer A., Simon C. (2002) Paracrine interactions during human implantation. *Rev. Endocrin. Metabol. Dis.* 3: 97-105.

Enders A.C. (1976) Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fertil.* 25 (Suppl.): 1-15.

Ferrara N., Houck K.A., Jakeman L.B., Winer J., Leung D.W. (1991) The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J. Cell. Biochem.* 47: 211-218.

Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997) The Biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18: 4-25.

- Ferrara N., Chen H., Davis-Smyth T.D. (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 4: 336-340.
- Fraser, H.M., Lunn, S.F. (2000) Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br. Med. Bull.* 56: 787-797.
- Fukunaga R. Ishizaka I.E. Seto Y., Nagata S. (1990a) Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell* 61: 341–350.
- Fukunaga R., Seto Y., Mizushima S., Nagata S. (1990b) Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8702–8706.
- Garcia-Valasco J.A., Arici A. (1999) Chemokines and human reproduction. *Fertil. Steril.* 71: 983-993.
- Giudice, L.C. (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 61: 1-17.
- Gordon J.D., Shifren J.L., Foulk R.A., Taylor R.N., Jaffe R.B. (1995) Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and gynaecological survey* 50: 688-697.
- Graven K.K., Troxler R.F., Kornfeld H., Panchenko M.V., Farber H.W. (1994) Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 269: 2446-2453.
- Haimovici F., Anderson D.J. (1993) Cytokines and growth factors in implantation. *Micr. Res. Techn.* 25: 201-207.
- Hanahan D. and Folkman J. (1996) Pattern and emerging mechanisms of the angiogenetic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.
- Hornung D., Lebovic D.I., Shifren J.L., Vigne J.L., Taylor R.N. (1998) Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertil. Steril.*, 69: 909-915.
- Houck K.A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D.W. (1991) The vascular endothelial growth factor family; identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing. *Mol. Endocrinol.* 5: 1806-1814.
- Huang, J.-C., Liu, D.-Y., Dawood, M.Y. (1998) The expression of vascular endothelial growth factor isoforms in cultured human endometrial stromal cells and its regulation by 17 β -oestradiol. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 603-607.
- Huleihel M., Lunenfeld E., Horowitz S., Levy A., Potashnik G., Mazor M., Glezerman M. (1999) Expression of IL-12, IL-10, PGE₂, sIL-2R and sIL-6R in seminal plasma of fertile and infertile man. *Andrologia* 31: 283-288.

- Jansen J., Thompson J.M., Dugan M.J., Nolan P., Wiemann M.C., Bhiray R., Henslee-Downey P.J., Akard L.P. (2002) Peripheral blood progenitor cell transplantation. *Ther. Apher.* 6: 5-14.
- Jelkmann W. (1992) Erythropoietin: Structure, control of production and function. *Physiol. Rev.* 72: 449-489.
- Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D.T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312.
- Lim, K.J.H., Odukoya, O.A., Ajjan, R.A., Li, T.-C., Weetman A.P., Cooke I.D. (2000) The role of T-helper cytokins in human reproduction. *Fertil. Steril* 73: 136-142.
- Karihaloo A., Karumanchi S.A., Cantley W.L., Venkatesha S., Cantley L.G. and Kale S. (2005) Vascular endothelial growth factor induces branching morphogenesis / tubulogenesis in renal epithelial cells in a neuropilin-dependent fashion. *Mol. Cell. Biol.* 25: 7441–7448.
- Kitabayashi A., Hirokawa M., Hatano Y., Lee M., Kuroki J., Niitsu H., Miura A.B. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogeneic immune responses by post-transcriptional inhibition of tumor necrosis factor- α production. *Blood* 86: 2220-2227.
- Krebs D. (1991) Zur Epidemiologie der Sterilität. *Arch. Gynecol. Obstet.* 250: 925-930.
- Kurman R.J. (1987) *Blaustein Pathology of the female genital tract*, 3rd edition, New York, Springer Verlag.
- Laird S.M., Tuckerman E., Li T.C., Bolton A.E. (1994) Stimulation of human endometrial epithelial cells interleukin-6 production by interleukin-1 and placental protein. *Hum. Reprod.* 9: 1339-1343.
- Larsen A., Davis T., Curtis B.M., Gimpel S., Sims J.E., Cosman D., Park L., Sorensen E., March C.J., Smith C.A. (1990) Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J. Exp. Med.* 172: 1559–1570.
- Lea, R.G., Clark D.A. (1991) Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. *Baillere's Clin. Obstet. Gynaecol.* 5: 25-59.
- Lessey, B.A., Castelbaum A.J., Sawin S.W., Jinghai S. (1995) Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 63: 535-542.
- Lessey B.A. (1994) The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil. Steril.* 62: 497-506.
- Li X.F., Gregory J., Ahmed A. (1994) Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in human endometrium. *Growth Factors* 11, 277-282.

Li J., Perrella M.A., Tsai J.C., Yet S.F., Hsieh C.M., Yoshizumi M., Patterson C., Endege W.O., Zhou F., Lee M.E. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 308-312.

Li Y., Calhoun D.A., Polliotti D.M., Sola M.C. Al-Mulla Z., Christensen R.D. (1996) Production of granulocyte colony-stimulating factor by the human placenta at various stages of development. *Placenta* 17: 611-617.

Licht P., Losch A., Dittrich R., Neuwinger J., Siebzehnruhl E., Wildt L. (1998) Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. *Hum. Reprod. Update* 4: 532-538.

Lindhard A., Bentin-Ley U., Ravn V., Islin H., Hviid T., Rex S., Bangsboll S., Sorensen S. (2002) Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil. Steril.* 78: 221-233.

Markee J. (1940) Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contr. Embryol.* 28: 219-308.

Mashishi K.N. (2001) Fighting infection using immunomodulatory agents. *Expert. Opin. Biol Ther.* 1: 641-653.

McCracken S.A., Grant K.E., MacKenzie I.Z., Redman C.W., Mardon H.J. (1999) Gestational regulation of granulocyte-colony-stimulating factor receptor expression in the human placenta. *Biol. Reprod.* 60: 790-796.

Merviel P., Evain-Brion D., Challier J.C., Salat-Baroux J., Uzan S. (2001) The molecular basis of embryo implantation in humans. *Zentralbl. Gynaecol.* 123: 328-339.

Miller J.S., Prosper F., McCullar V. (1997) Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitor cells are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood* 90: 3098-3105.

Murphy C.R. (1995) The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum. Reprod. Update* 1: 567-580.

Naldini A., Carraro F., Silvestri S., Bocci V. (1997) Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J. Cell. Physiol.* 173: 335-342.

Navot D., Margalioth E.J., Laufer N., Mor-Yosef S., Schenker J.G. (1984) Asynchronous ovulation in human menopausal gonadotropin induction of ovulation for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 42: 806-807.

Navot D., Laufer N., Kopolovic J., Rabinowitz R., Birkenfeld A., Lewin A., Granat M., Margalioth E.J., Schenker J.G. (1986) Artificially induced endometrial cycles and establishment of pregnancies in the absence of ovaries. *N. Engl. J. Med.* 314: 806-811.

Navot D., Scott R.T., Droesch K., Veeck L.L., Liu H.C., Rosenwaks Z. (1991) The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil. Steril.* 55: 114-118.

Nayak N.R. and Brenner R.M. (2002) Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 1845–1855.

Niklaus A.L., Aberdeen G.W., Babischkin J.S., Pepe G.J. and Albrecht E.D. (2003) Effect of estrogen on vascular endothelial growth/permeability factor expression by glandular epithelial and stromal cells in the baboon endometrium. *Biol. Reprod.* 68: 1997–2004.

Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.* 1: 3-25.

Obermair A., Obruca A., Pöhl M., Kaider A., Vales A., Leodolter S., Wojta J., Feichtinger W. (1999) Validation of anti-vascular endothelial growth factor (Anti-VEGF) antibodies for immunohistochemical localization of VEGF in tissue sections: expressions of VEGF in the human endometrium. *Fertil. Steril.* 72: 269-275.

Ochsenkühn R., Nieschlag E. (1998) Therapeutische Möglichkeiten bei Infertilität des Mannes. *Mün. Med. Wschr.* 140: 628-633.

Papapetropoulos A., Garcia-Gardena G., Madri J.A., Sessa W.C. (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenetic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 100: 3131-3139.

Paria P.C., Dey S.K. (1990) Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4756-4760.

Paulson R.J., Sauer M.V., Rogerio A., Lobo A. (1990) Factors affecting embryo implantation after human in vitro fertilization: a hypothesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 2020-2023.

Perrot-Applanat M., Groyer-Picard M.T., Garcia E., Lorenzo F., Milgrom E. (1988) Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology* 123: 1511-1519.

Polan M.L., Simon C., Frances A., Lee B.Y., Prichard L.E. (1995) Role of embryonic factors in human implantation. *Hum. Reprod.* 10, Suppl. 2: 22-29.

Psychoyos A. (1973) Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam. Hormon.* 31: 201-256.

Psychoyos A. (1986) Uterine receptivity for nidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 476: 36-44.

Psychoyos A. (1993) The implantation window: basic and clinical aspects. In: Mori T., Aono T., Tominaga T., Hiroi M. *Perspectives in assisted reproduction. Ares Serono Symposia* 4: 57-62.

Punyadeera C., Thijssen V.L., Tchaikovski S., Kamps R., Delvoux B., Dunselman G.A.J., de Goeij A.F.P.M., Griffioen A.W. and Groothuis P.G. (2006) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor ligands and receptors during menstruation and post-menstrual repair of human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 12: 367-375.

Reynolds L.P., Killilea S.D., Remer D.A. (1992) Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.* 6: 886-892.

Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674.

Rose-John S., Heinrich P.C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* 300: 281-290.

Saito S., Fukunaga R., Ichijo M., Nagata S. (1994) Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor at the fetomaternal interface in murine and human pregnancy. *Growth Factors* 10: 135-143.

Salamonsen L.A., Woolley D.E. (1999) Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J. Reprod. Immunol.* 44: 1-27.

Salamonsen L.A., Nie G., Dimitriadis E., Robb L. (2000) Cytokines in implantation. *Semin. Reprod. Med.* 18: 299-310.

Salamonsen L.A., Nie G., Findlay J.K. (2002) Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *J. Reprod. Immunol.* 53: 215-225.

Sandner P., Gess B., Wolf K., Kurz A. (1996) Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo. *Pflugers Arch.* 431: 905-912.

Sandner P., Wolf K., Bergmaier U., Gess B., Kurtz A. (1997) Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in vivo and in vitro. *Kidney Int.* 51: 448-453.

Simon C., Piquette G.N., Frances A., Polan M.L. (1993) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 549-555.

Simon C., Valbuena D., Krüssel J., Bernal A., Murphy C.R., Shaw T., Pellicer A., Polan M.L. (1998) Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil. Steril.* 70: 896-906.

Simon C., Martin J.C., Pellicer A. (2000) Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 14: 815-826.

Sharkey A.M., Day K., McPherson A., Malik S., Licence D., Smith S.K., Charnock-Jones D.S. (2000) Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 402-409.

Shifren J.L., Tseng J.F., Zaloudek C.J., Ryan I.P., Meng Y.G., Ferrara N., Jaffe R.B., Taylor R.N. (1996) Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3112-3118.

Shorter S.C., Vince G.S., Starkey P.M. (1992) Production of granulocyte colony-stimulating factor at the materno-foetal interface in human pregnancy. *Immunology* 75: 468-474.

Sloand G.M. (2000) Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood* 95: 2269-2274.

Smith S.K. (1996) Vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum. Reprod.* 11, Suppl. 2: 56-61.

Smith, S.K. (1998) Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum. Reprod. Update* 4: 509-519.

Smith, S.K. (2000) Angiogenesis and implantation. *Hum. Reprod.* 14: 59-66.

Spyridopoulos I., Brogi E., Kearney M., Sullivan A.B., Cetrulo C., Isner J.M., Losordo D.W. (1997) Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals. *Mol. Cell Cardiol.* 29: 1321-1330.

Srivastava M.D., Lippes J., Srivastava B.I. (1996) Cytokines of the human reproductive tract. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36: 157-166.

Stavri G.T, Hong Y., Zachary I.C., Breier G., Baskerville P.A., Yla-Herttuala S., Risau W., Martin J.F., Erusalimsky J.D. (1995) Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 358: 311-315.

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

Strauss J.F. and Gurdip E. (1991) The endometrium: Regulation and dysfunction. *Reprod. Endocrinol.*: 309-356.

Sunder S., Lenton E. (2000) Endocrinology of the peri-implantation period. *Baillere's Clin. Obstet. Gynaecol.* 14: 789-800.

Tabibzadeh S., Santhanaman U., Sehgal P., May L. (1989) Cytokine-induced production of IFN- β_2 /IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. *J. Immunol.* 142: 3134-3139.

Tabibzadeh S. (1991) Cytokine regulation of human endometrial function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 622: 89-98.

Tabibzadeh S., Kong Q.F., Babaknia A., May L.T. (1995) 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. and Babaknia A. (1995) The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue destruction. *Hum. Reprod.* 10: 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. (2002) Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals. *Front. Bioscience* 7: 1475-1486.

Taga T., Kariya Y., Shimada M., Uchida A. (1993) Suppression of natural killer cell activity by granulocytes in patients with aplastic anemia: role of granulocyte colony-stimulating factor. *Immunol. Lett.* 39: 65-70.

Tanaka T., Miyama M., Masuda M., Mizuno K., Sakamoto T., Umesaki N., Ogita S. (2000) Production and physiological function of granulocyte colony-stimulating factor in non-pregnant human endometrial stromal cells. *Gynecol. Endocrinol.* 14: 399-404.

Tanaka T., Umesaki N. (2003) Regulation of the cellular subpopulation ratios of normal human endometrial stromal cells by macrophage colony-stimulating factor. *Int. J. Mol. Med.* 11: 617-620.

Terman B.I., Dougher-Vermazen M., Carrion M.E., Dimitrov D., Armellino D.C., Gospodarowicz D., Bohlen P. (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1579-1586.

Torry R.J., Rongish B.J. (1992) Angiogenesis in the uterus: potential regulation and relation to tumor angiogenesis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 27: 171-179.

Torry D.S., Holt V.J., Keenan J.A., Harris G., Caudle M.R., Torry R.J. (1996) Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil. Steril.* 66: 72-80.

Torry, D.S., Torry, R.J. (1997) Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37: 23-29.

Uzumaki H., Okabe T., Sasaki N., Hagiwara K., Takaku F., Tobita M., Yasukawa K., Ito S., Umezawa Y. (1989) Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9323-9326.

Vandermolen D.T., Yang G. (1996) Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production, and stimulation thereof by IL-1- β . *Fertil. Steril.* 66: 741-747.

Villegas G., Lange-Sperandio B. and Tufro A. (2005) Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 67: 449-457.

von Wolff M., Thaler C.J., Strowitzki T., Broome J., Stolz W. (2000) Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 627-634.

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

Warren R.S., Yuan H., Matli M.R., Ferrara N., Donner D.B. (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J. Biol. Chem.* 271: 29483-29488.

Weston, G., Rogers P.A.W. (2000) Endometrial angiogenesis. *Baillere's Clin. Obstet. Gynaecol.* 14: 919-936.

Wood G.W., Hausmann X., Choudhuri R. (1997) Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol. Reprod. Develop.* 46: 62-70.

Yan S.F., Zou Y.S., Mendelsohn M., Gao Y., Naka Y., Du Yan S., Pinsky D., Stern D. (1997) Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272: 4287-4294.

Zhang L., Rees M.C., Bicknell R. (1995) The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenetic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *J. Cell. Sci.* 108: 323-331.

7 Danksagung

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

Ich danke dem ehemaligen Direktor der Frauenklinik Herrn Prof. Dr. med. 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 Fragestellung und die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn PD Dr. med. Michael von Wolff möchte ich ganz herzlich für die engagierte Betreuung der Arbeit danken. Seine sachkundige Hilfe und seine große Begeisterung für die Thematik wirkten auf mich stets motivierend.

Herrn Prof. Dr. med. Jonatha, Chefarzt der Frauenklinik des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching und Herrn Dr. med. Graf von Buquoy, Chefarzt der Frauenklinik des Krankenhauses Dritter Orden in München danke ich herzlich für problemlose Kooperation bei der Gewinnung der Proben.

Bei den Mitarbeiterinnen im Forschungslabor der Frauenklinik Großhadern bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und die geduldige Einführung in die Laborarbeit. Insbesondere gilt mein Dank Frau Marianne Fileki für die zeitraubende Unterstützung bei der Durchführung der RNase Protection Assays.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären, und die mir erst ermöglicht haben meinen Traumberuf zu ergreifen.

Schließlich möchte ich meinem Ehemann Volker für seine große mentale und logistische Unterstützung während der experimentellen Phase und sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

8 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Kirsten Daniela Braunstein
 Wohnort: Geißinger Str. 2
 83278 Traunstein

Geburtstag: 29.02.1976
 Geburtsort: Tübingen
 Familienstand: verheiratet
 Nationalität: deutsch

1982 – 1986: Grundschule Ohmenhausen
 1986 – 1995: Isolde-Kurz-Gymnasium Reutlingen
 21.06.1995: Abitur

Freiwilliges-Soziales-Jahr:

09/1995 – 04/1996: Pflegehelferin, Chirurgische Klinik, Universität Tübingen

Berufsausbildung:

05/1996 – 03/1998: Vorklinischer Studienabschnitt – LMU München
 05/1998 – 03/1999: Erster klinischer Studienabschnitt – LMU München
 04/1999 – 03/2002: Zweiter klinischer Studienabschnitt – LMU München
 04/2002 – 03/2003: Praktisches Jahr – LMU München

Berufliche Tätigkeit:

07/2003 – 09/2004: Ärztin im Praktikum
 Medizinische Abteilung, Klinikum Traunstein

Seit 10/2004: Assistenzärztin
 Medizinische Abteilung, Klinikum Traunstein

Vorträge:

- 13.10.2005: Die LIFE-Studie – Hypertonie und Vorhofflimmern
Die Kardiologische Stunde, Traunstein
- 20.07.2006: Chronische Mitralsuffizienz -
Management des zweithäufigsten operationspflichtigen
Klappenvitiums
Die Kardiologische Stunde, Traunstein