

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

Direktor: Prof. Dr. K. Friese

**Regulation von Interleukin-6, β_3 -Integrin und Osteopontin
mittels Steroidhormonen, mononukleärer Zellen und pro-inflammatorischer Zytokine
im humanen Endometrium**

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

vorgelegt von
Sabine Hariett Stieger
aus Fogarasch
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian J. Thaler
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Simon Rothenfuß Priv. Doz. Dr. Martin K. Angele Prof. Dr. Reinhart Zachoval
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. M. von Wolff
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tage der mündlichen Prüfung:	28.01.2010

Inhalt:

1. Einleitung	6
2. Zielsetzung	10
3. Material und Methoden	11
3.1 Endometriale Zellen	11
3.1.1 Materialgewinnung.....	11
3.1.2 Zellkultur endometrialer Zellen	12
3.1.2.1 Isolierung von Epithel- und Stromazellen.....	12
3.1.2.2 Epithelzellkulturen	13
3.1.2.3 Stromazellkulturen	14
3.2 Mononukleäre Blutzellen	16
3.2.1 Isolierung von mononukleären Blutzellen	16
3.2.2 Konservierung und Bereitstellung der mononukleären Blutzellen	17
3.2.3 Zellkultur mononukleärer Blutzellen	18
3.3 Vitalitätsprüfung.....	19
3.4 Hormonbehandlung von endometrialen Zellen.....	20
3.5 Cokultur endometrialer Zellen mit mononukleären Blutzellen.....	22
3.5.1 Allgemeines.....	22
3.5.2 Cokultur von Epithelzellen mit mononukleären Blutzellen.....	22
3.5.3 Cokultur von Stromazellen mit mononukleären Blutzellen.....	24
3.6 Zytokinstimulation von endometrialen Zellen	26
3.7 ELISA.....	28
3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.8.1 Isolierung von mRNA	31
3.8.2 Synthese der cDNA	32
3.8.3 Amplifikation der cDNA-Fragmente	33
3.8.4 Analyse und Dokumentation der DNA-Amplifikate	35
3.9 Statistik.....	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Charakterisierung der Zellkultur	38
4.1.1 Charakterisierung von Epithel- und Stromakulturen	38
4.1.1.1 Vitalitätsprüfung endometrialer Zellen	38
4.1.1.2 Zusammensetzung der endometrialen Zellen.....	40
4.1.1.3 Passage von Stromazellen	40
4.1.1.4 Proliferation endometrialer Zellen	41
4.1.2 Charakterisierung der Cokultur	42
4.1.2.1 Vitalitätsprüfung mononukleärer Zellen	42
4.1.2.2 Zusammensetzung der mononukleären Zellen.....	43
4.1.2.3 Zytokinsekretion von mononukleären Zellen ohne Cokultur	44
4.1.3 Charakterisierung der PCR.....	45
4.1.3.1 Evaluierung der optimalen Zykluszahl	45
4.1.3.2 Semiquantifizierung der PCR-Amplifikate	47
4.2 Regulation von IL-6	48
4.2.1 Regulation von IL-6 in hormonstimulierten Zellen	48
4.2.2 Regulation von IL-6 in endometrialen Zellen nach Cokultur	49
4.2.2.1 Regulation von IL-6 in Epithelzellen nach Cokultur	49
4.2.2.2 Regulation von IL-6 in Stromazellen nach Cokultur	50
4.2.3 Regulation von IL-6 in zytokinstimulierten Zellen.....	52
4.2.3.1 Regulation von IL-6 in Epithelzellen.....	52
4.2.3.2 Regulation von IL-6 in Stromazellen	54

4.3 Regulation von β_3	57
4.3.1 Regulation von β_3 in hormonstimulierten Zellen	57
4.3.2 Regulation von β_3 in Zellen der Cokultur	58
4.3.3 Regulation von β_3 in zytokinstimulierten Zellen	59
4.4 Regulation von Osteopontin	60
4.4.1 Regulation von Osteopontin in hormonstimulierten Zellen	60
4.4.2 Regulation von Osteopontin in Zellen der Cokultur	61
4.4.3 Regulation von Osteopontin in zytokinstimulierten Zellen	62
5. Diskussion	63
5.1 Patientenkollektiv	63
5.2 Zellkultur	64
5.3 Hormonstimulation	67
5.4 Mononukleäre Zellen / Cokultur	68
5.5 Zytokinstimulation	71
5.5.1 TNF- α	71
5.5.2 IL-1 β	75
5.5.3 IL-6	78
5.6 Regulation von IL-6	80
5.7 Regulation von β_3	84
5.8 Regulation von Osteopontin	88
6. Zusammenfassung	93
7. Anhang	96
7.1 Patientendaten:	96
7.2 Literaturverzeichnis	97
Danksagung	113
Lebenslauf	114

1. Einleitung

Das sterile Paar ist heute in wesentlich höherem Maße im gynäkologischen Praxisalltag anzutreffen als früher. Nach Angaben der Kölner Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung bleibt jede siebte Partnerschaft in Deutschland ungewollt kinderlos¹. Für die Häufigkeit und Verteilung der Ursachen lassen sich nur Richtwerte angeben, da die Statistiken voneinander abweichen. 30-40 % der sterilen Paare sind auf eine gestörte oder fehlende Zeugungsfähigkeit des Mannes zurückzuführen. Bei ebenfalls 30-40% der ungewollt kinderlosen Paare handelt es sich um eine Störung der Konzeptionsfähigkeit der Frau. In ca. 15-30% aller Fälle liegen Sterilitätsursachen bei beiden Partnern vor. Die verbleibenden 10-15% gehen zu Lasten nicht abklärbarer Ursachenfaktoren, sind also idiopathischer Art (Knörr et al., 1989; Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2007). In Deutschland wird die Sterilität nach dem Urteil des Bundesgerichtshofes von 1986 als Krankheit im versicherungsrechtlichen Sinne bewertet².

Neben den medizinischen und biologischen Ursachen bei Männern und Frauen lässt sich die Zunahme der ungewollten Kinderlosigkeit im Verlauf der letzten Jahrhunderte auch mit einem fortgeschrittenen Durchschnittsalter von Erstgebärenden, sowie zunehmender seelischer Belastungen durch Stress oder sozialen Druck in Verbindung bringen. Eine herabgesetzte Fruchtbarkeit durch Umwelteinflüsse und hormonähnlich wirkende Rückstände in Chemikalien wird ebenfalls diskutiert (Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2007).

Da die Konzeptionserwartung in Abhängigkeit vom Lebensalter der Frau abnimmt (Felberbaum et al., 2002), ist es anzunehmen, dass physiologische Veränderungen der Fortpflanzungszyklen bei Mann und Frau eine Rolle spielen. Die weibliche Unfruchtbarkeit ist sehr vielfältig. Sie reicht von ovariell bedingter Sterilität über tubare, uterine, zervikale, vaginale bzw. immunologische Sterilität bis hin zu psychogener Sterilität oder auch durch extragenitale endokrine Erkrankungen verursachte Kinderlosigkeit.

Der Uterus selbst stellt selten die alleinige Sterilitätsursache dar. Neben Organveränderungen kommt eine Reihe von Funktionsstörungen des Endometriums in Betracht. Eine adäquate und zeitgerechte Vorbereitung der Gebärmutter Schleimhaut auf eine mögliche Implantation der befruchteten Eizelle bedarf des exakten Zusammenspiels verschiedener Organsysteme wie das des Immunsystems, Gerinnungssystems, Gefäßsystems, des endokrinen und neuroendokrinen Systems sowie einer psycho-humoralen Steuerung.

¹ Quelle: Ärzte Zeitung Nr. 154 vom 1.9.2005, Seite 10

² Quelle: BGH, Urteil vom 17.12.1986 – IV a ZR 78/85, Neue Juristische Wochenschrift, 1987, 12: 703-704

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass an der Regulation des weiblichen Endometriums die Steroidhormone 17β -Östradiol und Progesteron sowie unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren beteiligt sind (Lessey et al., 1988; Jacobs et al., 1992). Besonders zwischen Endokrinum und Immunsystem besteht eine sehr enge Interaktion. Zum zellulären Immunsystem zählen neben Lymphozyten und mononukleären Blutzellen des phagozytären Systems auch Immunglobuline, Wachstumsfaktoren und Zytokine.

Zytokine sind hormonähnliche, proteinartige Moleküle, die von vielen verschiedenen Zellen sezerniert werden (z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, B- und T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen). Sie spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei der Kontrolle von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Hämatopoese, Entzündungsreaktionen, Immunantworten und Tumorstadium (Yarden und Ullrich, 1988; Thomson, 1991).

Das humane Endometrium, das neben Epithel- und Stromazellen auch Gefäßzellen und immunkompetente Zellen umfasst, ist ein aktiver Ort der Zytokinproduktion und ihrer Wirkung (Tabibzadeh 1991a).

Zytokine können als eine Art "second messenger" verstanden werden, deren Produktion von den weiblichen Sexualhormonen sowohl in Epithel- und Stromazellen als auch in der Blastozyste stimuliert werden. Die Zytokinexpression im Endometrium ist zeitlich und quantitativ während des menstruellen Zykluses nicht konstant. Proliferations- und Sekretionsphase sowie der Zeitraum um die Implantation sind unterschiedlich mit Zytokinen ausgestattet (Kauma et al., 1990; Tabibzadeh et al., 1992).

Das Zytokin *Interleukin-6 (IL-6)* beispielsweise, das in zahlreichen Studien immer wieder im Mittelpunkt steht, wird im Endometrium während der Proliferationsphase nur sehr schwach exprimiert. Um den Zeitpunkt der Implantation herum (Implantationsfenster) steigt die Immunreaktivität für IL-6 im Endometrium drastisch an und wird schrittweise während der gesamten Sekretionsphase erhöht (Tabibzadeh et al. 1995a). Von Wolff et al. bestätigten diese Ergebnisse und zeigten außerdem, dass es bei Frauen mit habituellen Aborten zu einer abnormalen Expression von IL-6 und *Interleukin-1 β (IL-1 β)* im Endometrium während der mittleren Sekretionsphase kommt (von Wolff et al., 2000).

Außer den Zytokinen sind auch verschiedene *Integrine*, eine bestimmte Klasse von Glykoproteinen an der Zelloberfläche, am Implantationsgeschehen durch Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Substrat-Interaktionen beteiligt. Integrine bestehen aus den zwei Untereinheiten α und β (Albelda et al, 1990; Hynes, 1992). Alle Säugetier-Eizellen exprimieren Integrine an ihrer Oberfläche, um als Rezeptor für Spermien zu fungieren. Die Expression einiger Integrine ist

um den Implantationszeitpunkt herum erhöht und bleibt während der frühen Schwangerschaft in der Dezipua auf diesem erhöhten Niveau. Eine Störung der Integrin-Expression im Endometrium ist mit bestimmten Typen von weiblicher Infertilität assoziiert (Kou et al., 1997). Manche Integrine sind während des gesamten Zykluses präsent, andere wiederum nur in der Lutealphase. Die Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ werden z.B. nur während des Implantationsfensters exprimiert und spielen damit sehr wahrscheinlich eine Rolle in der Vorbereitung des weiblichen Endometriums für eine Schwangerschaft (Lessey et al., 1994a).

Ein weiterer Faktor, von dem angenommen wird, dass er in der Schwangerschaft eine Rolle spielt, ist das *Osteopontin*. Osteopontin ist ein Glykoprotein, das eine Glycine-Arginine-Glycin-Aspartat-Serin (GRGDS) zellbindene Domäne besitzt (Oldberg et al., 1986, Craig et al., 1989). Osteopontin-mRNA wird in vielen Geweben des Körpers exprimiert, wie z.B. in den Nieren, Ovarien und auch im Uterus (Yoon et al., 1987; Craig and Denhardt, 1991). Ein Rezeptor für Osteopontin ist das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an der Oberfläche unterschiedlicher Organe (Miyachi et al., 1991). Ab dem siebten Tag nach der Befruchtung konnte Osteopontin im Uterus, in der Dezipua und der Plazenta gefunden werden (Waterhouse et al., 1992). Es wird spekuliert, dass die Bindung von Osteopontin an seinen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor für die Integrität des Chorions sowie für die Kommunikation zwischen Embryo und mütterlichem Gewebe während der Plazentation eine Rolle spielt (Daiter et al., 1996).

Für eine erfolgreiche Einnistung der Blastozyste sind außerdem *mononukleäre Blutzellen* von Bedeutung. Diese mononukleären Blutzellen (Monozyten/Makrophagen) sind bei Mäusen, Ratten und auch beim Menschen zu der Zeit der Implantation in großer Zahl in der Gebärmutter vorhanden (Hunt and Pollard, 1992). Sie produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, unter anderem auch IL-6, IL-1 β und *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), wobei Embryo- und Trophoblastzellen ihrerseits Rezeptoren für einige dieser Zytokine und Wachstumsfaktoren exprimieren (Haimovici and Anderson, 1993).

Die Makrophagen infiltrieren das Endometrium und induzieren eine Entzündungsreaktion, die wahrscheinlich von Substanzen des Ejakulats stimuliert wird. Nach einer eingetretenen Schwangerschaft bei Mäusen verschwinden diese Zytokin produzierenden mononukleären Blutzellen wieder (McMaster et al., 1992).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass mononukleäre Blutzellen oft nur in Anwesenheit von anderen Körperzellen ihre spezielle Aufgabe erfüllen können und für sich alleine in Kultur gehalten nur minimale Sekretionsleistung zeigen (Antonelli-Orlidge et al., 1989; Navab et al., 1991). Aus diesem Grund stellt das Cokulturmodell von endometrialen Zellen mit

mononukleären Blutzellen, welches für einen Teil der vorliegenden Experimente verwendet wurde, eine vergleichbare Nachahmung der In-vivo-Verhältnisse dar.

Ist das sensible Gleichgewicht zwischen den endometrialen Faktoren gestört, kann sich das auf die Befruchtung und Einnistung der Eizelle sowie auf den erfolgreichen Abschluss einer Schwangerschaft auswirken.

2. Zielsetzung

Wie vorangehend beschrieben, sind bei der Implantation der Blastozyste bzw. dem Zustandekommen und Erhalt einer Schwangerschaft verschiedene Faktoren, Zellen und Umstände beteiligt. Die Anwesenheit von Zytokinen, Integrinen, Wachstumsfaktoren und mononukleären Blutzellen bewirken bei exaktem Zusammenspiel den komplexen Vorgang einer erfolgreichen Implantation.

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel geschrieben, die Regulation von IL-6, β_3 -Integrin und Osteopontin an endometrialen Zellen in einem In-vitro-Modell zu untersuchen.

Um einem In-vivo-Modell nahezukommen, wurden die endometrialen Zellen mit Steroidhormonen einerseits und mit Steroidhormonen und mononukleären Blutzellen andererseits kokultiviert. Zur Kontrolle, welche Zytokine, die von Monozyten sezerniert werden, regulative Aktivität auf die Zytokinexpression und -sekretion von Endometriumszellen zeigen, wurden Vergleichsreihen unter Zusatz von IL-1 β , IL-6 und TNF- α als Standardzytokine der Monozyten aufgesetzt.

Folgende Fragen sollten dabei geklärt werden:

- a) Bewirken die Hormone Progesteron und Östradiol eine Veränderung in der Sekretion bzw. Expression von IL-6, β_3 -Integrin und Osteopontin in endometrialen Zellen?
- b) Lassen sich endometriale Zellen und mononukleäre Blutzellen in einem Modell der Cokultur zusammen kultivieren?
- c) Eignet sich die Cokultur endometrialer Zellen mit humanen mononukleären Blutzellen zur Untersuchung der zytokingesteuerten Expression verschiedener endometrialer Faktoren?
- d) Welche Zytokine sind für eine veränderte Expression endometrialer Faktoren in Epithel- und Stromazellen nach Cokultivierung mit mononukleären Blutzellen verantwortlich?

3. Material und Methoden

3.1 Endometriale Zellen

3.1.1 Materialgewinnung

Die endometrialen Zellen, die für die Zellkulturen im Rahmen dieser Arbeit benötigt wurden, konnten aus drei verschiedenen Münchner Krankenhäusern bezogen werden: aus der eigenen operativen Abteilung der Frauenklinik im Klinikum Großhadern, dem Krankenhaus Harlaching sowie dem Krankenhaus Dritter Orden.

Das Endometrium stammte aus abdominal oder vaginal operierten Hysterektomiepräparaten von Frauen im prämenopausalen Alter zwischen 35 und 51 Jahren, die ihr Einverständnis zur Gewebeentnahme gaben. Die Einschlusskriterien für die vorliegende Studie lauteten: keine Hormonsubstitution in den letzten drei Monaten, kein liegendes Intrauterinipessar, Patientin in der Sekretionsphase eines regelmäßigen Zykluses sowie kein Hinweis auf neoplastische Prozesse. Entsprechend diesen Kriterien ergab sich der symptomatische Uterus myomatosus als häufigste Operationsindikation (vgl. 7.1 Patientendaten). Die Zyklusphase der Gewebe wurde anhand der anamnestisch erhobenen Angaben über Zyklusdauer und letzte Periode sowie anhand des Serumspiegels von Östradiol (E₂), Progesteron und Luteinisierendem Hormon (LH) bestimmt. Die Asservierung des Gewebes erfolgte in Absprache mit dem verantwortlichen Pathologen im Anschluss an die Hysterektomie im Operationssaal unter sterilen Bedingungen. Entlang eines Previcat Katheters (Nourypharma, Oberschleißheim, Deutschland), der als Führungsstab diente, wurde der Uterus mittels eines sterilen Skalpels in longitudinaler Richtung eröffnet. Durch Kürettage des Cavum uteri mit dem sterilen Skalpell wurde das für die Zellkultur benötigte Endometrium gewonnen. Der Transport des Gewebes ins Forschungslabor erfolgte anschließend in einem sterilen Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit 6 ml DMEM/F-12HAM Medium ohne Phenolrot (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bei Raumtemperatur. Das Transportmedium enthielt 0,2% Zienam (Imipenem und Cilastatin, MSD Sharp & Dome, Haar, Deutschland), 0,4% Nystatin (200.000 I.E./L, Lederle, Wolfratshausen, Deutschland) und 10% inaktiviertes Fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Eggenstein, Deutschland). Von der narkotisierten Patientin wurde außerdem 10 ml venöses Blut entnommen. Nach Zentrifugation und Dekantierung des Serums wurde dieses in zwei Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zu je 0,5 ml schockgefroren und bis zur Bestimmung des Hormonstatus durch das Labor der Klinischen Chemie, Klinikum Großhadern bei -70° C gelagert.

3.1.2 Zellkultur endometrialer Zellen

Die Aufbereitung der endometrialen Epithel- und Stromazellen erfolgte nach der Methode, wie sie von Classen-Linke et al. (1997) beschrieben wurde.

Die Zeit zwischen Gewebeentnahme und Weiterverarbeitung im Labor lag durchschnittlich bei einer Stunde - maximal bei 1,5 Stunden. Die Inaktivierung des FCS im Geweberöhrchen wurde gleich nach dem Transport ins Forschungslabor durch Lagerung im Wasserbad bei 56 °C für die Dauer von 30 Minuten durchgeführt. Das Probenmaterial wurde anschließend an der sterilen Werkbank mit laminarer Strömung mit Hilfe von zwei Skalpellern in einer sterilen Petrischale aus Glas in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten. Es folgte eine einstündige enzymatische Digestion mittels zugefügter 0.153% Kollagenase Typ I A (400 units/mg solid; Sigma) bei 37 °C im Schüttelwasserbad mit einer Schüttelfrequenz von 20/Minute. Dabei lagerte das Gewebe in 6 ml DMEM/F-12HAM Medium ohne Phenolrot (Sigma) in einer Gewebekulturflasche (Cellstar 50 ml, Greiner). Nach ca. 30 Minuten wurde die Digestion unterbrochen, um mit einer 1000 µl Pipette den Flascheninhalt homogen zu resuspendieren und durch den Sog eine weitere mechanische Zerkleinerung zu erreichen. Dieser Arbeitsschritt wurde nach weiteren 30 Minuten wiederholt.

3.1.2.1 Isolierung von Epithel- und Stromazellen

Die Trennung der Epithelzellen von den Stromazellen geschah mit Hilfe von zwei Filtrationsvorgängen. Zunächst wurde die Zellsuspension durch eine Nylon-Membran mit der Porengröße 180 µm (Millipore, Eschborn, Deutschland) filtriert und somit epitheliale Drüsenschläuche und stromale Zellen von sonstigen Probenbestandteilen wie Myometrium, Bindegewebe oder Schleimresten gesäubert. Im zweiten Filtrationsvorgang durch eine Nylon-Membran der Porengröße 40 µm (Becton Dickinson, New Jersey, USA) wurden die Epithelzellen von den Stromazellen getrennt. Die Epitheldrüsenschläuche, die den Rückstand im Sieb bildeten, wurden mit 10 ml Medium in eine Petrischale gespült. Anschließend wurden beide Zellarten in je 15 ml Medium 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 70 g (mit $g = 9,81 \text{ m/s}^2$) zentrifugiert. Nach Resuspension des Sediments mit 10 ml frischem Medium wurde die Zentrifugation wiederholt und der Überstand dekantiert.

3.1.2.2 Epithelzellkulturen

Anschließend wurden die epithelialen Drüsen­schläuche erneut in Medium suspendiert und auf Millicel-CM Membraneinsätzen (Millipore) mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Poren­größe von 0,4 µm ausgesät.

Die Membraneinsätze wurden vor der Gewebeaussaat mit verdünntem Matrigel ohne Phenolrot (Becton Dickinson) beschichtet. Die Verdünnung des Matrigels betrug 1:4 mit DMEM/F*12HAM Medium ohne FCS¹. Die mit je 100 µl verdünntem Matrigel beschichteten Membraneinsätze wurden anschließend in die Vertiefungen einer Multiwell-Gewebekulturplatte aus Polystyrol (Falcon 3047, Becton Dickinson) platziert. Für das Gelieren des Matrigels folgte eine 90-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C.

Nach dem Ausstreuen der Epitheldrüsen­schläuche in einer Dichte von 6000 Drüsen­schläuchen/cm² wurden die Zellen in einem Brutschrank für Zellkulturen bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt für 5 bis 6 Tage bis Versuchsbeginn kultiviert.

Um ein zweikammriges Kultursystem zu erhalten, wurden unterhalb des Membraneinsatzes, in dem sich die Drüsen­schläuche in 250 µl Medium befanden, weitere 500 µl Medium zugegeben. Zu den weiteren Bestandteilen des DMEM/F*12HAM-Mediums für die Kultivierung der Epithelzellen zählten neben Zienam, Nystatin und FCS außerdem 50 ng/ml Progesteron (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma) und 0,5 ng/ml E₂ (17β-Östradiol, 1,3,5(10) Estratrione, Sigma)². Das Nährmedium wurde alle 48 Stunden erneuert.

Die Bewachung der Membraneinsätze mit Epithelzellen nach 5-6 Kulturtagen, d.h. also zu Beginn der verschiedenen Experimente betrug 30% bis 90%.

¹ Das optimale Verdünnungsverhältnis für Matrigel wurde von meiner Kollegin Frau C. Zepf in einem Vorversuch im Rahmen ihrer Dissertation bestimmt (Kap. 2.3.3. "Wahl der optimalen Matrigelverdünnung" in "Integrine und pro-inflammatorische Zytokine im humanen Endometrium - immunhistochemische Untersuchungen zur Expression und In-vitro-Studien zur Regulation anhand eines optimierten Zellkulturmodells", Claudia Zepf, 2003, LMU München)

² Die Zellen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit als hormonbehandelte Zellen beschrieben sind, haben bei der ursprünglichen Kultivierung keine Hormonzugabe im Nährmedium erhalten.

3.1.2.3 Stromazellkulturen

Die Stromazellen wurden nach dem zweiten Waschvorgang in zwei Gewebekulturflaschen (Cellstar 250 ml, Greiner) in je 10 ml Medium ausgestreut und im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel, wobei ein Großteil der Verunreinigung mit Erythrozyten und Epithelzellen entfernt werden konnte. Nach weiteren 24 bis 48 Stunden - abhängig vom konfluenten Zellrasen in der Kulturflasche - wurden die Stromazellen zur weiteren Elimination von Fremdzellen einmalig passagiert. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass mehrmaliges Passagieren den Verunreinigungsgrad mit Fremdzellen reduziert. Die Zellfunktion nimmt jedoch schon nach drei Passagen deutlich ab (vgl. 4.1.1.3 Passage von Stromazellen). Aus diesem Grund wurden die Stromazellen der Hauptexperimente nur einmalig passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen aus einer Zellkulturflasche zweimal mit je 15 ml 37 °C warmer PBS-Lösung (Phosphate buffered saline, Gibco) gespült und anschließend 10 Minuten mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung 10% (Gibco) im Brutschrank inkubiert. Dadurch kam es zur Ablösung der Stromazellen vom Boden der Kulturflasche, was mikroskopisch anhand der veränderten Zellmorphologie, d.h. anhand der kugeligen statt der ursprünglich spindelförmigen Gestalt der Zellen, zu beobachten war. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde anschließend durch Zugabe von 8,5 ml Medium bzw. durch das darin enthaltene FCS unterbrochen und die Zellsuspension bei 21°C und 70 g 10 Minuten zentrifugiert.

Die Stromazellen aus dem Sediment wurden in frischem Medium suspendiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Zellen mit dem sauren Farbstoff Trypanblau (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) in der Konzentration von 0,5% kontrolliert. Da Trypanblau als Anion sehr leicht an Proteine binden kann, färben sich nicht vitale Zellen dunkelblau. Lebende Zellen hingegen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen im Lichtmikroskop hell. Nach der Mischung der Zellsuspension mit der Trypanblaulösung zu gleichen Teilen folgte die Auswertung mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Im Anschluss wurden je 80.000 Stromazellen in je 750 µl Medium pro Well auf eine 24 Multiwell-Gewebekulturplatte (Becton Dickinson) ausgestreut, was einer Zelldichte von 100.000 Zellen/cm² entspricht. Die Stromazellen wurden nach der Passage erstmalig mit Hormonen in der gleichen Konzentration wie die Epithelzellen, also mit 50 ng/ml Progesteron und 0,5 ng/ml E₂ stimuliert. Nach weiteren 2,5 bis 3 Tagen im Brutschrank waren die Stromazellen bereit für die anschließende Cokultivierung mit mononukleären Blutzellen bzw. für die Stimulation mit Zytokinen.

Zusammenfassung Kapitel 3.1:

Endometrium wird aus frischen Uteri von prämenopausalen Patientinnen ohne vorherige Hormonstimulation und mit gutartiger Gebärmuttererkrankung gewonnen.

Nach Isolierung und Reinigung folgt die Kultivierung der endometrialen Epithelzellen auf verdünntem Matrigel in Membraneinsätzen sowie die Kultivierung der endometrialen Stromazellen auf Polystyrol für 5-6 Tage. Dabei werden die Stromazellen einmalig passagiert.

3.2 Mononukleäre Blutzellen

3.2.1 Isolierung von mononukleären Blutzellen

Die mononukleären Zellen wurden aus Leukozytenkonzentrat (Buffy-Coat) von Blutspendern des Roten Kreuzes München gewonnen. Der Buffy-Coat stand ca. zwei Stunden nach der Blutabnahme zur Abholung bereit und wurde anschließend unverzüglich bei Raumtemperatur ins Labor transportiert und verarbeitet.

Die Isolierung der mononukleären Blutzellen erfolgte mittels einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (Vacutainer CPT Cell Preparation Tube, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) in Anlehnung an die Arbeit von Andreesen et al. (1982). Im Anschluss daran wurden die mononukleären Blutzellen in ein steriles Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Nach Suspension der Zellen in 40 ml 4 °C kaltem, sterilem PBS folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 370 g. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Zellen in 40 ml frischem PBS (4 °C) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet mit den darin enthaltenen mononukleären Blutzellen in RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot (Sigma) resuspendiert. RPMI-1640 Medium wurde für die Kultivierung mit 10% inaktiviertem FCS (Gibco), 0,2% Zienam (Imipenem und Cilastatin) und 0,4% Nystatin (200.000 I.E./L) versetzt.

Eine Probe von 50 µl der Suspension wurde zum Zählen der Zellen in der Neubauerkammer entnommen, die restliche Zellsuspension wurde bei 300 g 10 Minuten zentrifugiert. Die Isolierung von 50 ml Leukozytenkonzentrat ergab 300 bis 600 Millionen mononukleäre Blutzellen. Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurde für alle Cokulturen der Hauptexperimente nur ein einziges Leukozytenkonzentrat, d. h. Blut von einem einzigen Blutspender verwendet. Zu diesem Zweck wurden die mononukleären Zellen nach der Isolierung kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff gelagert (vgl. 3.2.2).

3.2.2 Konservierung und Bereitstellung der mononukleären Blutzellen

Für die Konservierung wurden die Zellen in sterilen Kryoröhrchen zu je 10 Millionen Zellen in 450 µl RPMI-1640 Medium, 400 µl inaktiviertem FCS und 150 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland) gelöst. Mit Hilfe eines Kryokonservierungsgerätes für Gewebe (Kryo 10 Series, Model 10-3.3, Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland) wurden die Zellsuspensionen anschließend innerhalb von zwei Stunden auf -120°C gekühlt und danach in einem Stickstofflagerbehälter (Chronos, Messer Griesheim) bei -180°C aufbewahrt.

Für die späterer Bereitstellung der Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter im Wasserbad bei 37°C ca. 5 Minuten geschwenkt, bis die Zellsuspension gerade aufgetaut war. Eine Erwärmung der Zellsuspension mußte unter allen Umständen vermieden werden, da das im Medium enthaltene DMSO in diesem Falle die Zellen geschädigt hätte. Im Anschluss an den Auftauvorgang wurde das Röhrchen in vergälltem Alkohol desinfiziert, die aufgetaute Zellsuspension in 20 ml 4°C kaltes RPMI-1640 Medium überführt und bei 600 g 10 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurden die Zellen erneut in ca. 3 ml RPMI-1640 Medium suspendiert und 50 µl der Suspension zur Zählung in der Neubauerkammer entnommen. Gleichzeitig wurde dabei die Vitalität der Zellen mit Trypanblau (vgl. 3.1.2.3) geprüft. Sie betrug jeweils 60% bis 80%.

3.2.3 Zellkultur mononukleärer Blutzellen

Nach dem Auftauen und der Resuspension der Zellen in Nährmedium wurden die mononukleären Blutzellen in Falcon-Membraneinsätze (P.E.T track-etched membrane, Becton Dickinson) der Porengröße 1 µm und direkt auf Polystyrol einer Multiwell-Gewebekulturplatte (Becton Dickinson) ausgesät. Für das Cokulturmodell wurden pro Ansatz 50.000 oder 500.000 vitale mononukleäre Blutzellen verwendet. In allen Kulturansätzen waren die Zellen in je 750 µl RPMI-Medium gelöst. Die Adhäsion der mononukleären Blutzellen auf dem Polystyrol der Gewebekulturplatten bzw. auf den Falcon-Membraneinsätzen erfolgte durch die Inkubation im Brutschrank für zwei Stunden. Anschließend folgte die Spülung der mononukleären Blutzellen mit 37°C warmem Medium, um die nicht adhärenen bzw. die toten Zellen aus der Zellkultur zu entfernen.

Das Medium wurde anschließend dekantiert, durch neues Nährmedium ersetzt und jedem Ansatz 100 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS von E. coli 026:B6, zellkulturgetestet, Sigma) zugefügt. Die Zugabe von LPS diente der schnelleren Differenzierung der Monozyten in Makrophagen und der Anregung der Monozyten, Zytokine zu produzieren.

Nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C wurde das LPS-haltige Medium erneuert und die Zellkultur für weitere drei Tage bis zum Beginn der Cokultur im Brutschrank inkubiert.

Zusammenfassung Kapitel 3.2:

Mononukleäre Blutzellen werden aus Leukozytenkonzentrat (Buffy Coat) von Blutspendern gewonnen. Für alle Cokultur-Experimente werden Zellen desselben Spenders verwendet. Nach Isolierung und Reinigung der mononukleären Blutzellen folgt bis zum Versuchsbeginn die Kryokonservierung in Stickstoff. Vor Beginn der Cokultur werden jeweils 50.000 oder 500.000 mononukleäre Zellen auf Falcon-Membraneinsätzen und auf Polystyrol für 5 Tage kultiviert und mit Lipopolysacchariden (LPS) zur schnelleren Differenzierung stimuliert.

3.3 Vitalitätsprüfung

Die Vitalität endometrialer und mononukleärer Zellen zu Beginn und nach Abschluss der Versuchsreihen wurde mit dem vorkonfigurierten LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224, Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland) überprüft.

Der Test basiert auf der Markierung von vitalen und abgestorbenen Zellen mittels fluoreszierender Farbstoffe. Dabei werden zwei Parameter der Zellvitalität, und zwar die intrazelluläre Esterase-Aktivität sowie die Durchlässigkeit der Zellmembran bei geschädigten Zellen gemessen. Die durch die Esterase katalysierte Umwandlung von zunächst nicht fluoreszierendem Calcein AM in das grün fluoreszierende polyanionische Calcein markiert die vitalen ungeschädigten Zellen. Bei nicht vitalen Zellen mit geschädigter Zellmembran kann der zweite Farbstoff – Ethidium Homodimer 1 – ins Innere des Zellkerns eindringen und erzeugt durch Bindung an die Nukleinsäuren eine rote Fluoreszenz. Beide Fluoreszenzen können in einem Fluoreszenzmikroskop mit Blaufilter im Bereich von 530 nm dargestellt werden.

Vor der Durchführung dieses Versuches wurden die Zellen mit Hanks-Lösung (HBSS Hanks`Balt Salt, Gibco) gewaschen. Anschließend folgte die Mischung der beiden Indikatorsubstanzen des LIVE/DEAD-Kits entsprechend den Angabe des Herstellers im Verhältnis 1:4 in 2 ml Hanks-Lösung, d.h. 1 µl Calcein AM (4 mM) und 4 µl Ethidium Homodimer 1 (2 mM). Die zu testenden Zellen wurden danach mit 150 µl dieser Farblösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein Waschvorgang mit Hanks-Lösung und die sofortige qualitative und quantitative Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop (Diaplan, Leitz, Wetzlar, Deutschland).

Zusammenfassung Kapitel 3.3:

Mit dem LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit wird die Vitalität endometrialer und mononukleärer Zellen vor und nach der Durchführung der Experimente geprüft. Dabei werden nicht vitale Zellen durch eine rote Fluoreszenz aufgrund der Durchlässigkeit der geschädigten Zellmembran sowie des damit möglichen Eindringens von Ethidium Homodimer 1 und seine Bindung an die Nukleinsäuren sichtbar. Vitale Zellen zeigen eine durch intrazelluläre Esterase katalysierte Umwandlung von nicht fluoreszierendem Calcein AM in das grün fluoreszierende polyanionische Calcein im Fluoreszenzmikroskop.

3.4 Hormonbehandlung von endometrialen Zellen

In einer eigenen Dissertation wurden 10 epitheliale und stromale Zellkulturen (Ursprung: Hysterektomiepräparate aus den gleichen drei Kliniken wie diejenigen der vorliegenden Arbeit) von meiner Kollegin Frau Claudia Zepf ebenfalls im Forschungslabor der Frauenklinik Großhadern, München kultiviert. Diese 10 Zellkulturen wurden nach dem gleichen Modell wie in Kapitel 3.1 beschrieben behandelt. Allerdings erhielten diese Zellen zu Beginn der Kultivierung keine Hormonzugabe (vgl. 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Erst nach 5-6 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die endometrialen Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Steroidhormonen stimuliert. Die Stimulation mit den Steroidhormonen Progesteron und Östradiol in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte über einen Zeitraum von 72 Stunden (s. Tab. 3.1). Im Anschluss an die Inkubation mit Progesteron und Östradiol wurden von Frau C. Zepf verschiedene Untersuchungen zur Charakterisierung der Zellkultur mittels Immunhistochemie und radioaktiver Markierung durchgeführt (Zepf, 2003).

Von diesen oben genannten 10 hormonell stimulierten Zellkulturen konnten für die hier vorliegende Arbeit Zellen für ELISA- (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und PCR- Untersuchungen (Polymerase-Kettenreaktion) zur Verfügung gestellt werden. Dabei beschränkte man sich auf die Überprüfung der Sekretion bzw. Expression von IL-6, β_3 und Osteopontin.

Stimulation mit:	Hormonkonzentration in ng/ml	Hormonkonzentration in mol	Anzahl der Zellansätze
Östradiol (E ₂)	0,27 ng/ml	10 ⁻⁹ mol	1
Östradiol (E ₂)	2,7 ng/ml	10 ⁻⁸ mol	1
Progesteron	31 ng/ml	10 ⁻⁷ mol	1
Progesteron	310 ng/ml	10 ⁻⁶ mol	1
E ₂ + Progesteron	0,27 ng/ml + 31 ng/ml	10 ⁻⁹ mol + 10 ⁻⁷ mol	1
E ₂ + Progesteron	2,7 ng/ml + 310 ng/ml	10 ⁻⁸ mol + 10 ⁻⁶ mol	1
Kontrolle ohne Hormone	-	-	2

Tab. 3.1: Hormonstimulation endometrialer Epithel- und Stromazellen

Zusammenfassung Kapitel 3.4:

In einer eigenen Versuchsreihe (Dissertation von Frau C. Zepf) werden Epithel- und Stromazellen mit Östradiol und/oder Progesteron in zwei verschiedenen Konzentrationen für 72 Stunden stimuliert. Anschließend werden in der vorliegenden Arbeit die Sekretion und Expression von IL-6, β_3 und Osteopontin mittels ELISA und semiquantitativer PCR überprüft.

3.5 Cokultur endometrialer Zellen mit mononukleären Blutzellen

3.5.1 Allgemeines

In einer Cokultur wurden endometriale und mononukleäre Zellen in einer Multiwell-Gewebekulturplatte – getrennt durch die permeable Membran des Kultureinsatzes – gemeinsam für 24 Stunden inkubiert. Die von mononukleären Blutzellen produzierten Stoffe konnten dadurch direkt Einfluß auf die Zellen des Endometriums nehmen.

Im Alter von 5-6 Tagen, folgte bei allen mononukleären Blutzellen die Entfernung des Nährmediums. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass endometriale Zellen in RPMI-1640 Medium weniger gut gedeihen, die mononukleären Blutzellen aber durchaus das von endometrialen Zellen bevorzugte DMEM/F*12HAM Medium tolerieren. Aus diesem Grund wurde für die Cokultur zwischen endometrialen und mononukleären Zellen das DMEM/F*12HAM Medium als Nährmedium gewählt. Für die vorliegende Arbeit sind 5 verschiedene endometriale Zellkulturen mit mononukleären Blutzellen eines einzigen Spenders kokultiviert worden.

3.5.2 Cokultur von Epithelzellen mit mononukleären Blutzellen

Um Mess- und Pipettierfehler zu minimieren, wurden in jeder Cokultur Doppelansätze angelegt. In je 2 Ansätzen wurden die Epithelzellen aus dem Millipor-Membraneinsatz mit 50.000 bzw. 500.000 mononukleären Blutzellen auf dem Polystyrol der Multiwellplatte kokultiviert (s. Abb. 3.1). Das DMEM/F*12HAM Medium (750 µl je Ansatz) enthielt zusätzlich 10% FCS, 0,2% Zienam und 0,4% Nystatin. Daneben wurden die Zellansätze mit 50 ng/ml Progesteron, 0,5 ng/ml E₂ und 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Zugabe der Steroidhormone erfolgte bei den Epithelzellen innerhalb des Membraneinsatzes und die des LPS unterhalb des Membraneinsatzes zu den mononukleären Blutzellen. Die restlichen 4 Ansätze dienten als Kontrollen für die Cokultur. Es handelte sich dabei um 2 Ansätze mit Epithelzellen ohne Cokultur und mit LPS-Stimulation (100 ng/ml) sowie um 2 Ansätze ohne Cokultur und ohne LPS-Stimulation (s. Abb. 3.1), um auszuschließen, dass die Lipopolysaccharide eine Veränderung induzieren. Alle 4 Kontrollansätze erhielten ebenfalls je 750 µl DMEM/F*12HAM Medium mit den oben genannten Zusätzen.

Anschließend folgte die Inkubation im Brutschrank für 24 Stunden. Da die Epitheldrüsen­schläuche im Laufe der Zellkultur unterschiedlich gut und dicht wuchsen, wurde die Bewachungsdichte im Membraneinsatz (in % der Bodenfläche) vor Beginn und am Ende der Cokultur im Lichtmikroskop bestimmt und protokolliert. Nach der Inkubation wurde das Medium innerhalb sowie unterhalb des Membraneinsatzes aliquotiert und in Einzelportionen in Kunststoff-Reaktionsgefäßen (1,5 ml, Eppendorf) für folgende ELISA-Messungen bei –20°C gelagert. In Vorversuchen konnte anhand von ELISA-Messungen festgestellt werden, dass die Zytokinkonzentrationen sowohl innerhalb des Membraneinsatzes als auch darunter gleich hoch waren. Die Membran war also vollständig durchlässig für den Zytokinaustausch zwischen endometrialen und mononukleären Zellen. Somit konnte für die ELISA-Messungen das gesamte Nährmedium eines Cokulturansatzes – innerhalb und unterhalb des Membraneinsatzes – verwendet werden. Nach Dekantieren des Mediums folgte eine Spülung der Zellen mit je 800 µl DEPC-PBS (0,08%, Diethylpyrocarbonat-PBS, Sigma), um Reste des Nährmediums zu entfernen. Im Anschluß wurden die Epithelzellen und die mononukleären Blutzellen nach Zugabe von 500 µl frischem DEPC-PBS von der Polystyrol-Kulturplatte bzw. von dem Millipore-Membraneinsatz mit einer sterilen Pipettenspitze (Eppendorf) abgeschabt und in sterile Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Nach Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten und Dekantierung des Überstandes folgte zum Abschluss die Suspension der Zellen mit 100 µl DEPC-PBS und 200 µl Lysispuffer aus dem vorkonfigurierten RNA-Isolierungs-Kit (High Pure RNA Isolation Kit, Böhlinger, Mannheim, Deutschland). Der Lysispuffer enthält Guanidiniumchlorid und dient der Lyse von Zellen unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNAsen. Nach kurzem Durchmischen der Zellsuspension mittels eines Vortex Genie 2-Gerät (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) wurden die endometrialen Zellen bis zur Durchführung der PCR bei –20 °C gelagert.

	● 50.000	● 50.000	● 500.000	● 500.000	
	● K (-)	● K (-)	● K (+)	● K (+)	

Legende:

●: Epithelzellen im Membraneinsatz

Hellgrauer Untergrund: 50.000 mononukleäre Zellen auf Polystyrol

Dunkelgrauer Untergrund: 500.000 mononukleäre Zellen auf Polystyrol

K (-): Kontrolle ohne Cokultur, ohne LPS

K (+): Kontrolle ohne Cokultur, mit LPS

Abb. 3.1: Modell der Cokultur von Epithelzellen mit mononukleären Blutzellen

3.5.3 Cokultur von Stromazellen mit mononukleären Blutzellen

Für die Cokultur zwischen Stromazellen und mononukleären Blutzellen wurden ebenfalls 8 Ansätze nach dem oben genannten Modell kultiviert (vgl. 3.5.2). In Vorversuchen wurde festgestellt, dass Stromazellen nur auf Polystyrol am Boden der Kulturplatte und nicht in Membraneinsätzen wuchsen. Mononukleäre Blutzellen jedoch gediehen auch in Falcon-Membraneinsätzen ganz gut. Aus diesem Grund wurde das Cokulturmodell für die Stromazellen dahingehend verändert, dass in diesem Fall die Stromazellen auf dem Boden der Kulturplatte und die mononukleären Blutzellen in Falcon-Membraneinsätzen darüber kultiviert wurden (s. Abb. 3.2). Die Inkubation für die Cokultur von Stromazellen und mononukleären Blutzellen erfolgte gleichermaßen im Brutschrank für 24 Stunden. Die Überstände für die anschließenden ELISA-Messungen wurden bei -20°C tiefgefroren. Nach Abschaben der Stromazellen von dem Boden der Kulturplatte folgte die Eluierung der Zellen in je $100\ \mu\text{l}$ DEPC-PBS und $200\ \mu\text{l}$ Lysispuffer aus dem vorkonfigurierten RNA-Isolierungs-Kit und die Lagerung in Stickstoff bis zur Aufbereitung der RNA.

	○	○	⊙	⊙	
	K (-)	K (-)	K (+)	K (+)	

Legende:

○: 50.000 mononukleäre Zellen

⊙: 500.000 mononukleäre Zellen

Grauer Untergrund:

80.000 Stromazellen auf Polystyrol

K. (-): Kontrolle ohne Cokultur, ohne LPS

K. (+): Kontrolle ohne Cokultur, mit LPS

Abb. 3.2: Modell der Cokultur von Stromazellen mit mononukleären Blutzellen

Zusammenfassung Kapitel 3.5:

Im Alter von 5-6 Tagen werden endometriale Zellen von 5 verschiedenen Kulturen mit mononukleären Blutzellen desselben Spenders kokultiviert. Je 2 Ansätze mit 50.000 und 2 Ansätze mit 500.000 mononukleären Blutzellen (jeweils für Epithel- und Stromazellen) werden angelegt. Die mononukleären Blutzellen werden zur schnelleren Differenzierung mit LPS, die endometrialen Zellen mit E₂ und Progesteron stimuliert. Sowohl für Epithel- als auch für Stromazellen gibt es je 4 Kontrollen (je 2 mit Zugabe von LPS und je 2 ohne LPS). Nach 24 Stunden folgt die Isolierung und Lagerung der endometrialen Zell-RNA und der Zell-Überstände bei -20°C für anschließende PCR- bzw. ELISA-Messungen.

3.6 Zytokinstimulation von endometrialen Zellen

Weitere 5 endometriale Kulturen – sowohl Epithel- als auch Stromazellen – wurden zur genaueren Analyse der Ergebnisse der Cokultorexperimente mit der rekombinanten und humanen Form der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) stimuliert. Die Kultivierung der Zellen vor Beginn der Zytokinstimulation erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie das der endometrialen Kulturen für die Experimente der Cokultur. Alle Ansätze wurden ebenfalls mit E₂ und Progesteron stimuliert (vgl. 3.1).

In gleicher Weise schloß sich an die Inkubation für 5-6 Tage im Brutschrank bei 37°C der experimentelle Teil für 24 Stunden an. In diesem Fall handelte es sich um eine Stimulation mit den obengenannten Zytokinen in den Konzentrationen 0,1 ng/ml und 10 ng/ml (s. Tab. 3.2). Sowohl die Epithel- als auch die Stromazellen wurden in Doppelansätzen angelegt, um Mess- und Pipettierfehler zu minimieren. Die Bewachung der Membraneinsätze mit Epithelzellen wurde zu Beginn und am Ende der Zytokinstimulation im Lichtmikroskop geschätzt und protokolliert. Nach der Inkubation mit TNF- α , IL-6 und IL-1 β für 24 Stunden folgte die Asservierung der Überstände für die anschließenden ELISA-Messungen. Nach Abschabung der Stromazellen von der Kulturplatte bzw. der Epithelzellen von den Membraneinsätzen wurden die Überstände und die endometrialen Zellen bis zur weiteren Analyse mittels ELISA bzw. PCR in Kryoröhrchen bei -20°C gelagert.

Stimulation	Zytokinkonzentration 0,1 ng/ml	Zytokinkonzentration 10 ng/ml	Keine Zytokine
IL-6	2 Ansätze	2 Ansätze	-
TNF- α	2 Ansätze	2 Ansätze	-
IL-1 β	2 Ansätze	2 Ansätze	-
Kontrolle	-	-	2 Ansätze

Tab. 3.2: Zytokinstimulation der endometrialen Zellen

Zusammenfassung Kapitel 3.6:

Bei 5 weiteren Kulturen werden im Alter von 5-6 Tagen je 2 Ansätze Epithel- und Stromazellen mit den Zytokinen IL-6, TNF- α und IL-1 β in zwei Konzentrationen (0,1 ng/ml bzw. 10 ng/ml) stimuliert. Je 2 Ansätze dienen als Kontrollen ohne Zytokinstimulation. Alle Ansätze werden mit E₂ und Progesteron stimuliert. Nach 24 Stunden Stimulation mit den obengenannten Zytokinen folgt die Isolierung und Lagerung der endometrialen Zell-RNA und der Überstände bei -20°C für anschließende PCR- und ELISA-Messungen.

3.7 ELISA

Nach Abschluss der Zellkulturen und der anschließenden Stimulation mit Hormonen, der Cokultur mit mononukleären Blutzellen bzw. der Stimulation mit Zytokinen folgten weitere Untersuchungen mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im Nährmedium. Dabei wurden vorkonfigurierte Kits verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers bearbeitet. In der vorliegenden Studie beschränkte man sich auf die ELISA-Messungen von IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β (Laboserv Diagnostica, Gießen, Deutschland) und LIF (Leukemia inhibitory factor, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland).

Das Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay nach der Sandwich-Technik beruht auf der Wirkung der Antigen-Antikörper-Beziehung. Am Boden der 96 Wells einer Mikrotiterplatte (Maxi Sorp, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) befindet sich ein spezieller Antikörper gegen das zu testende Zytokin, das als Antigen fungiert. Der Standard, die Kontrollen und die zu untersuchenden Proben werden in der angegebenen Menge in die Wells eingebracht. Ein zweiter Antikörper wird jedem Ansatz zugeben. Das Zytokin der Probe bindet in der nun folgenden Inkubationszeit an den ersten Antikörper am Plattenboden und der zweite Antikörper bindet an das Zytokin. Anschließend werden die Proben gewaschen und das Enzym Peroxidase zugegeben. Nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschvorgang, um das ungebundene Enzym zu entfernen, wird eine Substratlösung (Tetramethylbenzidin-Peroxid) hinzugefügt. Dieses Substrat bindet an das Enzym und induziert ein farbiges Reaktionsprodukt. Nach Abstoppen der Enzymreaktion mittels Schwefelsäure kann die Enzymaktivität anschließend photometrisch gemessen werden. Die Intensität der Farbentwicklung ist abhängig von der Zytokinmenge in der Probe (Hoffmann-La Roche, 1991).

Nach einigen Vorversuchen, in denen die geeignete Verdünnung der Zellkulturüberstände ermittelt wurde, konnte die oben beschriebene ELISA-Untersuchung durchgeführt werden.

Die photometrischen Messungen der Enzymaktivität der Proben erfolgte mit einem ELISA Reader (Titertek plus MS2 Reader, ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland) bei der angegebenen Wellenlänge von 450 nm. Anschließend wurden die Extinktionswerte mit einem in das Meßgerät eingebauten Auswertungsprogramm (EIA Version 3.10, Copyright bei Stefan Ufer und ICN Biomedicals GmbH) anhand der Standardkurve des betreffenden

ELISA-Tests in die entsprechenden Konzentrationen umgerechnet. Die Darstellung der Ergebnisse in Kapitel 4 stellen Mittelwerte aus den Messwerten der Doppelsätze dar.

Zusammenfassung Kapitel 3.7:

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Überständen der einzelnen Zellansätze erfolgt mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Dieser Test beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion und der Enzym-Substrat-Wechselwirkung.

Mittels photometrischer Messungen der Enzymaktivität und dem entsprechenden Auswertungsprogramm kann die Zytokinkonzentration der Probe anhand einer Standardkurve berechnet werden. Die vorliegende Studie beschränkt sich auf die Messung der Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und LIF.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach Abschluss der Cokultur-Experimente sowie nach der Stimulation der Gewebekulturen mit Zytokinen bzw. mit Hormonen wurde die RNA der endometrialen Zellen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (kurz PCR für Polymerase Chain Reaction) untersucht.

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode der enzymatischen Vervielfältigung von Nukleinsäuren, um in vitro spezifische DNA-Sequenzen mit hoher Ausbeute zu amplifizieren. Das Originalprotokoll wurde von der Firma Cetus entwickelt und 1985 von Saiki et al. veröffentlicht. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation von DNA in der Zelle. Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize. Dazu braucht das Enzym einen (RNA)-"Primer", ein Nukleinsäuremolekül das mit dem Matrizenstrang hybridisiert und von der Polymerase als Starter genutzt wird. In vitro verwendet man dafür künstlich synthetisierte Oligonucleotidprimer. Für die gesamte Reaktion sind somit eine DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynucleotide, zwei Oligonucleotide als Primer und ein geeignetes Puffersystem nötig (Gassen, Sachse, Schulte, 1994).

Um aus den endometrialen Gewebezellen bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren mußten drei Teilschritte durchgeführt werden:

1. Isolierung von mRNA (messenger RNA) aus den endometrialen Zellen
2. Synthese von cDNA (copy DNA) aus der isolierten mRNA
3. Replikation der synthetisierten cDNA-Fragmente

Für jeden dieser drei Schritte ist ein entsprechender Kit im Laborbedarf erhältlich. Damit wird die Durchführung der PCR erheblich vereinfacht. Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte auf folgende vorkonfigurierte Kits zurückgegriffen werden:

1. High Pure RNA Isolierungs Kit (Böhringer)
2. First strand cDNA Synthese Kit für Reverse Transkriptase-PCR (Böhringer)
3. PCR Core Kit (Böhringer))

3.8.1 Isolierung von mRNA

Die Isolierung der mRNA fand im Anschluss an die Stimulation der endometrialen Zellen mit Hormonen bzw. mit Zytokinen sowie nach Abschluss der Cokultur zwischen endometrialen Zellen und mononukleären Blutzellen statt. Dafür wurden die Zellen mit DEPC-PBS gewaschen und zur Freisetzung der mRNA aus dem Zellkern in einer Lösung aus DEPC-PBS und Lysispuffer mit Guanidiniumchlorid des High Pure RNA Isolierungs Kits der Firma Böhlinger, Mannheim, Deutschland bei -20°C tiefgefroren. Durch die hemmende Wirkung des Guanidiniumchlorids auf RNAsen konnte der Schutz der Zell-RNA bis zur Weiterverarbeitung gewährleistet werden. Nach Abschluss aller Zellkultivierungen wurden die tiefgefrorenen Proben aufgetaut und die RNA-Isolierung gemäß den Empfehlungen des Herstellers weitergeführt.

Die Isolierung der RNA anhand des High Pure RNA Isolierungs Kits funktioniert nach folgendem Prinzip: Nach der Zell-Lyse durch den Lysispuffer werden die Zellen in die im Kit beigefügten High Pure Filtrationsgefäße pipettiert. Hier binden die Nukleinsäuren in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an die Glasfaseroberfläche des Filtrationsgefäßes, wobei die Bindebedingungen auf RNA hin optimiert sind. Die Bindungsreaktion findet innerhalb weniger Sekunden statt und wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren verursacht. Dadurch wird die Absorption an das Glasfaservlies gefördert.

Durch die darauffolgende DNase-Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies erhält man eine DNA-freie RNA-Probe. Nach drei Waschschritten mit den beigefügten Waschpuffern erfolgt die Zentrifugation in einer Standardtischzentrifuge, wodurch Salze, Proteine oder andere zelluläre Verunreinigungen entfernt werden. Die gereinigte RNA einer Probe kann anschließend in je 50 μl nukleasefreiem, sterilem Wasser (Elutionspuffer) eluiert werden.

Gemäß diesem Protokoll wurde die RNA aller endometrialen Zellen isoliert und im Anschluss bis zur Durchführung der cDNA-Synthese bei -20°C konserviert.

3.8.2 Synthese der cDNA

Unter Verwendung des First Strand cDNA Synthese Kits für Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) der Firma Böhlinger erfolgte die Synthese der cDNA.

Anhand dieser Methode wird RNA mittels der AMV Reversen Transcriptase in Einzelstang-cDNA umgeschrieben. Abhängig von der Art des Primers, der dabei verwendet wird, synthetisiert die AMV Reverse Transcriptase einen neuen cDNA-Strang an unterschiedlichen Stellen entlang der RNA-Vorlage. Im vorliegenden Fall synthetisiert die AMV Reverse Transcriptase mit Hilfe des Oligo-p(dT)₁₅ Primer den neuen cDNA-Strang am 3'-Ende der mRNA. Die dabei entstehende cDNA dient als Vorlage für die anschließende Amplifikation.

Gemäß der Anleitung des Herstellers wurde für diesen Syntheseschritt folgendermaßen vorgegangen: Die in Eluationspuffer konservierte mRNA-Probe wurde auf Eis aufgetaut. Zu je 8,2 µl mRNA-Probe in Eluationspuffer wurden für die Synthesereaktion jeweils 2 µl Reaktionspuffer, 4 µl 25 mM MgCl₂ (5 mM), 2 µl Deoxynucleotide Mix (1 mM), 2 µl Oligo-p(dT)₁₅ Primer (1,6 µg), 1 µl RNase Inhibitor (50 Units) und 0,8 µl AMV Reverse Transcriptase (≥20 Units) benötigt. Die Herstellung eines Master Mixes (d.h. ein definiertes Vielfaches der obengenannten Reagenzien ohne mRNA-Probe) gewährleistete eine Reduzierung der Ungenauigkeit, die beim Pipettieren von sehr geringen Mengen auftritt. Der Master Mix wurde anschließend kurz zentrifugiert und in die entsprechende Anzahl von Reagenzgefäßen aliquotiert. Nach Zugabe der mRNA-Probe erfolgte in den ersten 10 Minuten in einem TRIO-Thermoblock (Bionetra, Göttingen, Deutschland) bei 25°C die Bindung des Primers. Während der anschließenden zweiten Inkubation bei 42°C für 60 Minuten folgte die schrittweise Synthese des cDNA-Strangs mit Hilfe der AMV Reversen Transkriptase. Die dritte Inkubation der Probe bei 99°C für 5 Minuten gewährleistete die Denaturierung der AMV Reversen Transkriptase. Abschließend wurde cDNA bis zur Durchführung der Amplifikation bei -20°C konserviert.

3.8.3 Amplifikation der cDNA-Fragmente

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die In-vitro-Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die zyklische Folge von drei Inkubationsschritten bei verschiedenen Temperaturen. Im ersten Schritt wird zunächst die Doppelstrang-DNA durch Hitze denaturiert. Im zweiten Schritt hybridisieren die zwei Oligonucleotidprimer, die zu den 3'-Enden des Zielfragments komplementär sind, mit den beiden DNA-Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt der DNA-Polymerase als Startmoleküle zum Kopieren der beiden Einzelstränge. Die Verlängerung der Primer wird durch die Taq-Polymerase katalysiert, eine hitzestabile DNA-Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*.

Diese drei aufeinanderfolgenden Schritte werden als Zyklus bezeichnet. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragmentes und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Das führt zu einer exponentiellen Vermehrung des betreffenden DNA-Fragmentes. Die exponentielle Amplifikation eines spezifischen Fragmentes läuft allerdings nicht beliebig weiter. Nach 20-25 Zyklen ist aufgrund einer sinkenden Effizienz nur noch eine lineare Zunahme und anschließend eine Plateaubildung zu beobachten. Mit steigender Produktmenge nimmt die Primerkonzentration in den späteren Zyklen so weit ab, dass eine Renaturierung der amplifizierenden Matrizen möglich wird und diese nicht mehr als Polymerase-Substrat zur Verfügung stehen. Außerdem sinkt die Aktivität der Taq-Polymerase mit zunehmender Zykluszahl. Ihre Konzentration reicht in den hohen Zykluszahlen nicht mehr zur Amplifikation aller Matrizen aus (Gassen, Sachse, Schulte, 1994).

Der PCR Core Kit der Firma Böhlinger Mannheim, Deutschland, diente in der vorliegenden Arbeit als Werkzeug zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten.

Die Wahl der Zykluszahl für die Amplifikation der spezifischen cDNA-Fragmente aus dem linearen Bereich der Amplifikationskurven vermied unnötig komplexe mathematische Algorithmen bei der Umrechnung der Untersuchungsergebnisse. Aus diesem Grund wurde die Zykluszahl für die einzelnen cDNA-Matrizen aus diesem linearen Bereich gewählt.

Da die optimalen Bedingungen der PCR (Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die Konzentrationen der Taq-Polymerase, cDNA und Primer) vom jeweiligen System abhängen, mußten diese nach Anleitung des Herstellers im Vorfeld individuell bestimmt werden.

Folgende Konzentrationen wurden dabei festgelegt: Je 2 µl cDNA, 83,5 µl nukleinsäurefreies Wasser, 10 µl PCR-Puffer (10 mmol Tris/HCl, 1,5 mmol MgCl₂, 50 mmol KCl), 2 µl dNTP-Mischung (200 mmol), je 1 µl der beiden Oligonucleotid-Primer (50 pmol) und 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U). Für die Bearbeitung mehrerer Ansätze wurde auf Empfehlung des Herstellers ein Master Mix aus Puffer, Nukleotiden, Primern und der Taq-Polymerase für die jeweils benötigte Anzahl der Ansätze gemischt. Die entsprechende Menge Master Mix konnte anschließend mit der spezifischen cDNA unter folgenden Zyklusparametern weiterverarbeitet werden: Denaturierung der Doppelstrang DNA für 1 Minute bei 92°C; Hybridisierung der Primer mit den entstandenen Einzelsträngen für 1 Minute bei 51°C (CO-I), 54°C (β₃), 60°C (Osteopontin) bzw. 54°C (IL-6) und abschließend Polymerisation für 2 Minuten bei 72°C, dem Temperatureoptimum der Aktivität der Taq-Polymerase.

Die Amplifikation erfolgte in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) nach Überschichten jeder Probe mit 100 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz.

Bei den hormonell stimulierten Zellkulturen beschränkten sich die PCR-Untersuchungen auf die Faktoren β₃ und Osteopontin (IL-6 Bestimmungen erfolgten mittels ELISA). In den Zellen der Cokulturen und der Zytokinstimulation wurde neben β₃ und Osteopontin auch IL-6 mittels PCR bestimmt. Zum Ausschluss einer Fehlamplifikation wurden einzelne Amplifikate stichpunktartig mittels einer Sequenzanalyse (Perkin Elmer ABIPRISM 377) von der Firma MediGenomix (München, Deutschland) überprüft. Die Bestimmung der Basenfolge der verwendeten Primer – jeweils in zwei Richtungen – wurde im Vorfeld einem externen Labor (MediGenomix) in Auftrag gegeben. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.3.

Primer	Basenfolge	Basenpaaranzahl des PCR-Produktes
CO-I up	5'-CGT CAC AGC CCA TGC ATT TG-3'	268
CO-I down	5'-GGT TAG GTC TAC GGA GGC TC-3'	
β ₃ up	5'-GTG CTG ACG CTA ACT GAC C-3'	284
β ₃ down	5'-CAT GGT AGT GGA GGC AGA GT-3'	
Osteopontin up	5'-ACC ATG AGA ATT GCA GTG ATT TGC-3'	408
Osteopontin down	5'-ATC AGT GAC CAG TTC ATC AGA TTC-3'	
IL-6 up	5'-CCT TCT CCA CAA GCG CCT TC-3'	327
IL-6 down	5'-GGC AAG TCT CCT CAT TGA ATC-3'	

Tab. 3.3: Basenfolge der Primer

3.8.4 Analyse und Dokumentation der DNA-Amplifikate

Die Analyse der DNA-Amplifikate nach der Polymerisation erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel (1,0% Agarose Typ V, Sigma) mit 0.075 µg/ml Ethidiumbromid (Fluca, Neu-Ulm, Deutschland). Dazu fand eine Elektrophoresekammer der Firma Bio Rad (Bio Rad Laboratories, Herkules, USA) und je 1,75 l einfach konzentrierter TAE-Puffer Verwendung. Zur Herstellung einer 50-fach konzentrierten Stammlösung des TAE-Puffers wurden 200 ml DEPC-H₂O (0,08% Diethylpyrocarbonat, Sigma, gelöst in Aqua destillata), 48,44 g Trispuffer (Sigma) und 20 ml EDTA-Stammlösung (0,5 M, pH 8, Sigma) benötigt. Einfach konzentrierten TAE-Puffer für den einzelnen Analysevorgang erhielt man durch Verdünnung mit sterilem Wasser. Ein sogenannter DNA-Loading-Puffer (1 µl Loading-Puffer auf je 10 µl Probe) erleichterte das Absinken des PCR-Amplifikates in die Taschen des Agarosegels. Der DNA-Loading-Puffer setzte sich folgendermaßen zusammen: DEPC-H₂O, Bromphenolblau (0,2 mg/ml, Fluca) Ficoll 400 (0,15 g/ml, Amershan-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) und 50-fach konzentrierte TAE-Lösung (12%).

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben im Agarosegel dauerte ca. 75 Minuten. Die anschließende Dokumentation der optischen Dichte der PCR-Produkte aus dem Agarose-Gel erfolgte mit einem Video Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc 1000, Bio Rad Laboratories) in digitaler Form. Für die Auswertung des DNA-Gehalts der PCR-Produkte kam das Computerprogramm Multi-Analyst/PC Version 1.1 der Firma Bio Rad Laboratories zur Anwendung. Dabei diente ein kommerziell erwerblicher DNA-Standard (Precision Molecular Mass Standard, 100 base pair ladder, Bio Rad Laboratories) als Bezugsgröße.

Für die Analyse der cDNA-Amplifikate hat man sich in der vorliegenden Studie auf die semiquantitative Bestimmungsmethode festgelegt. Das bedeutet, dass zusätzlich zu der cDNA des betreffenden endometrialen Faktors (β_3 , Osteopontin bzw. IL-6) ein sogenanntes Housekeeping-Gen, und zwar die Cytochrom C Oxidase-Untereinheit I (CO-I), ebenfalls amplifiziert wird. Die cDNA-Menge des spezifischen Integrins wird anschließend ins Verhältnis zu der cDNA-Menge des Housekeeping-Gens derselben Probe dargestellt. Damit erhält man als Ausdruck der Semiquantifizierung relative Einheiten der optischen Dichte.

Diese Methode wurde gewählt, um die Ergebnisse der einzelnen Zellansätze (mit unterschiedlichen Ausgangszellzahlen vor allem bei den Epithelzellen) untereinander vergleichen zu können.

Um die Korrelation zwischen RNA-Gehalt der ursprünglichen Probe und der berechneten relativen Dichte nach der Semiquantifizierung zu bestimmen, wurden im Vorfeld RNA-Korrelationstests (cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation) mit unterschiedlichen RNA-Mengen (0.25µg, 0.5µg, 1µg, 2µg, 4µg, 8µg) durchgeführt.

Zusammenfassung Kapitel 3.8:

Mit Hilfe der semiquantitativen PCR (Polymerase-Kettenreaktion) werden die endometrialen Faktoren β_3 , Osteopontin und IL-6 untersucht. Die PCR dient der enzymatischen Vervielfältigung von Genmaterial. Nach Isolierung von Zell-RNA und anschließender Synthese von cDNA folgt die Amplifizierung dieser cDNA-Fragmente. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel wird der cDNA-Gehalt der Probe mit einem dafür entwickelten Computerprogramm berechnet. Den semiquantitativen Charakter der PCR erhält man indem die berechnete cDNA-Menge eines PCR-Produktes ins Verhältnis zu dem entsprechenden Wert eines Houskeeping-Gens – in diesem Fall Cytochrom C Oxidase-Untereinheit I (CO-I) – gesetzt wird. Damit ergeben sich relative Einheiten der optischen Dichte, die miteinander verglichen werden können.

Die Korrelation zwischen dem ursprünglichen RNA-Gehalt einer Probe und diesem relativen Messwert wird durch eigene Testreihen bestimmt.

3.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten in der vorliegenden Arbeit erfolgte mit dem statistischen Programmpaket SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows in der Version 8.0. Für die deskriptive Statistik wurden für die Beschreibung der Befunde Graphiken mit der Software Excel 97 für Windows (Scatter Plots oder Polygonzug) erstellt. Zur Beurteilung der Befunde aus den ELISA- und PCR-Untersuchungen wurde nicht eine gesonderte Forschungshypothese bewiesen, sondern eine relativ große Anzahl von Fragestellungen mit Hypothesentests untersucht.

Da es aufgrund der vielen kleinen Stichproben des Versuchsaufbaus schwierig war, eine Normalverteilung der Werte zu belegen, wurde für die Inferenzstatistik als nicht-parametrischer Test der Friedman-Test zum Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben gewählt. Der Friedman-Test, auch Rangvarianzanalyse genannt, ist die Verallgemeinerung des Wilcoxon-Vorzeichentests für mehr als zwei Stichproben. Er basiert auf einer zweifachen Varianzanalyse mit Rangzahlen, die fallweise für die Werte der beteiligten Variablen ermittelt wird. Untersucht werden n Individuen oder Stichprobengruppen unter k Bedingungen. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn sich wenigstens zwei Stichproben in den Medianen unterscheiden (L. Sachs, 1984).

Üblicherweise geht man in medizinischen Studien von einem Signifikanzniveau von 5% ($\alpha=0,05$) aus. Allerdings gibt es bei Signifikanztests der klassischen Testtheorie das Problem des tatsächlichen Signifikanzniveaus. Wenn mehrere Hypothesen gleichzeitig getestet werden sollen, gibt es bei diesem Signifikanzniveau eine Wahrscheinlichkeit $p = 1 - (1 - 0,05)^n$, dass mindestens ein Test zufällig signifikant ist. Plant man im Vorhinein n Tests, und möchte man das gemeinsame Signifikanzniveau kontrollieren, dann muss man die Signifikanzniveaus der Einzeltests verkleinern. Gemäß der Bonferroni-Abschätzung erhält man die korrigierte Ablehnwahrscheinlichkeit α' nach Division des globalen Signifikanzniveaus α durch die Anzahl n der geplanten bzw. durchgeführten Tests: $\alpha' = \alpha / n$ (Polasek, 1997).

Aufgrund der 22 durchgeführten Einzeltests gilt das nach Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau α' für die vorliegende Arbeit: $\alpha' = 0,05 / 22 = 0,002$

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Zellkultur

Im Vorfeld der Experimente wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um die optimale Behandlung der einzelnen Zelltypen zu bestimmen und die Methoden adäquat anzuwenden.

Es galt dabei sicherzustellen, dass die Zellen vor und während eines Experiments vital waren und ihre Funktion auch *in vitro* erfüllen konnten.

4.1.1 Charakterisierung von Epithel- und Stromakulturen

Neben der Prüfung der Vitalität von endometrialen Zellen wurde sowohl die Zusammensetzung als auch die Proliferation von Epithel- und Stromazellen untersucht. Damit konnten die Zellen des Endometriums bezüglich ihrer Funktion näher charakterisiert werden.

4.1.1.1 Vitalitätsprüfung endometrialer Zellen

Für die Prüfung der Vitalität endometrialer Zellen wurden einige zusätzliche Ansätze von Epithelzellen unter gleichen Bedingungen wie die Zellen der drei Experimentreihen gezüchtet und nach 6 Tagen gemäß dem Protokoll von Live&Dead (vgl. Kap. 3.3) im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. In allen Fällen konnten 80% bis 90% der epithelialen Zellen durch die grüne Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop als vital dargestellt werden. Nach Abschluss der jeweiligen Stimulation (Hormonstimulation, Cokultur mit mononukleären Blutzellen oder Zytokinstimulation für 24 Stunden) und weiteren 5 Kulturtagen, d.h. also nach 12 Kulturtagen wurde die Vitalitätsprüfung wiederholt. Die Vitalität von Epithelzellen nach 12 Kulturtagen lag bei 91% bis 97% (s. Abb. 4.1).

Die Stromazellen wurden gleichermaßen der Vitalitätsprüfung unterzogen. Das Ergebnis bestätigte, dass 95% bis 98% der Zellen sowohl vor einer Stimulation als auch 5 Tage danach vital waren (s. Abb. 4.2). Zusätzlich wurden alle Stromazellen vor jeder einzelnen Behandlung (Hormonstimulation, Cokultur mit mononukleären Blutzellen oder Zytokinstimulation für 24 Stunden) mit Trypanblaulösung beurteilt (vgl. Kap. 3.1.2). Die Vitalität der Stromazellen betrug dabei 98% bis 100%.

Somit konnte gezeigt werden, dass die endometrialen Zellen zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente (Tag 5-6) über eine adäquate Vitalität verfügten.

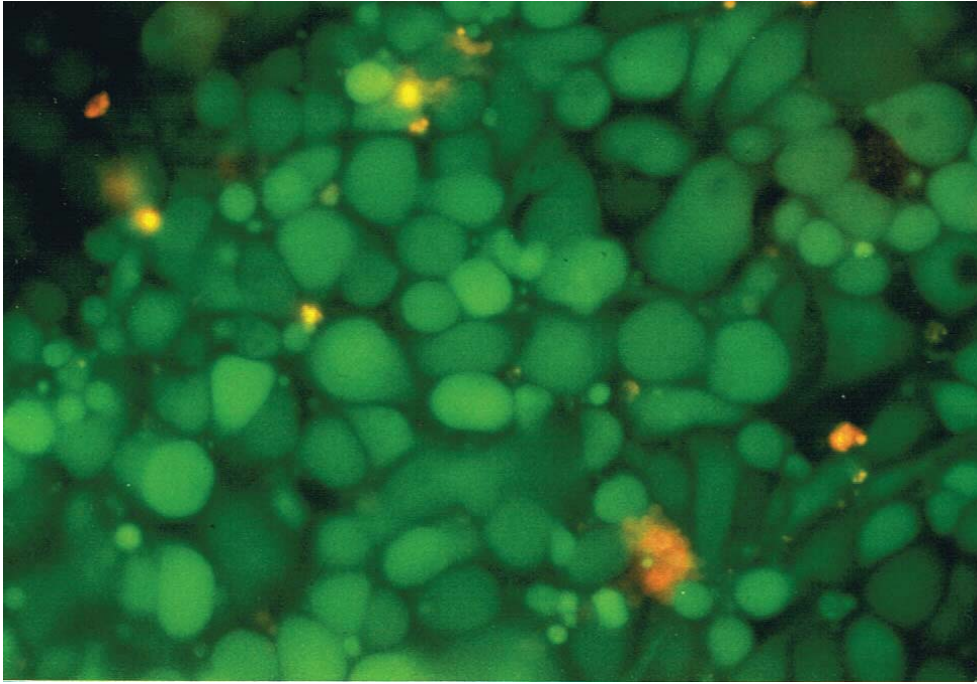


Abb. 4.1: Vitalität von Epithelzellen im Fluoreszenzmikroskop nach 24 Stunden Cokultur mit mononukleären Zellen (400-fache Vergrößerung; grün = vital, rot/orange = avital)

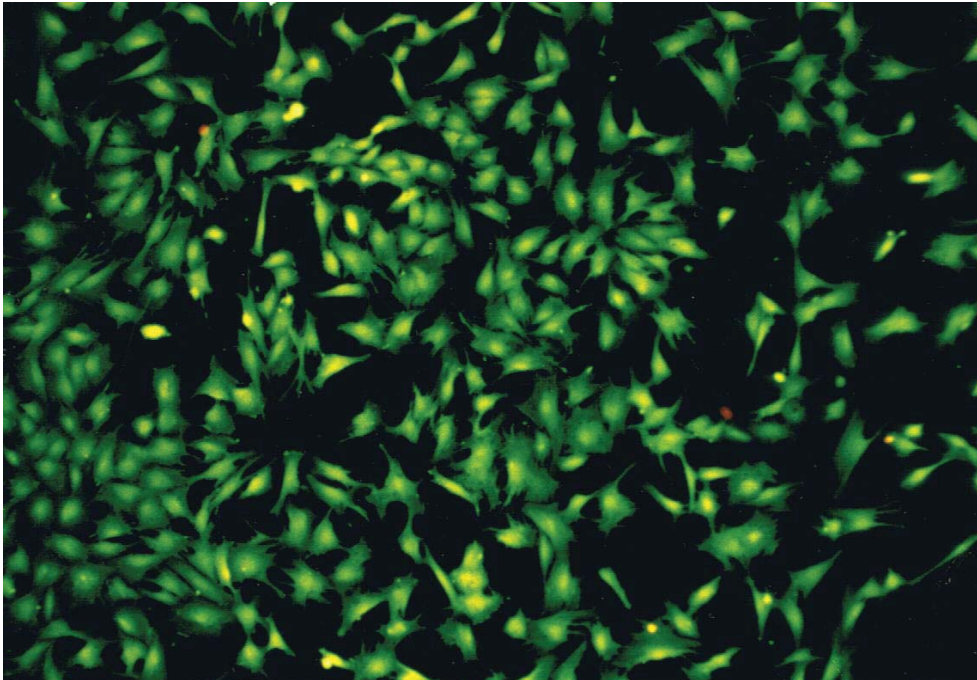


Abb. 4.2: Vitalität von Stromazellen im Fluoreszenzmikroskop nach 24 Stunden Cokultur mit mononukleären Zellen (100-fache Vergrößerung; grün = vital, rot/orange = avital)

4.1.1.2 Zusammensetzung der endometrialen Zellen

Die weitere Charakterisierung der endometrialen Zellkultur bezüglich der genauen Zusammensetzung der Zellen wurde im Forschungslabor der Frauenklinik Großhadern in einem Vorversuch vorgenommen. Die Untersuchung von 4 stromalen und epithelialen Zellkulturen mittels Immunzytochemie nach 5-6 Kulturtagen ergab folgendes Ergebnis:

Die Zellkulturen waren im Durchschnitt mit bis zu 5% Immunzellen (CD45, CD14, CD56) bzw. mit bis zu 2% Endothelzellen verunreinigt.

4.1.1.3 Passage von Stromazellen

Mehrmaliges Passagieren der Stromazellen reduziert deren Verunreinigungsgrad mit Fremdzellen. Allerdings musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sich mehrmaliges Passagieren negativ auf die Zellfunktion auswirkt. Um diesen Sachverhalt näher zu bestimmen, wurde in einem Vorversuch an drei Kulturen die Fähigkeit der Stromazellen zur Dezidualisation nach 1, 3, 6 und 9 Passagen untersucht.

Die Dezidualisation der Stromazellen konnte durch eine 20-tägige Hormonstimulation (Östradiol: 0,5ng/ml und Progesteron: 50ng/ml) erreicht werden. Die intakte Zellfunktion wurde anhand von Prolaktin und IGFBP-1 (Insulin like growth factor binding protein 1) am Ende des Versuchs überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellfunktion nach 3 Passagen deutlich reduziert war (Prolaktin: 54ng/ml, IGFBP-1: 11ng/ml). Eine ebenfalls deutlich eingeschränkte Zellfunktion zeigte sich nach 6 und nach 9 Passagen. Im Gegensatz dazu bildeten die Stromazellen nach nur einer einzigen Passage als Zeichen guter Dezidualisation in hohem Maße Prolaktin (114ng/ml) und IGFBP-1 (980ng/ml).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den weiteren Experimenten die Stromazellen nur einmalig passagiert.

4.1.1.4 Proliferation endometrialer Zellen

Die Proliferationsaktivität von endometrialen Zellen während eines Kultivierungszyklusses konnte in einem weiteren Vorversuch von meiner Kollegin, Frau C. Zepf im Rahmen ihrer Dissertation (Zepf, 2003) analysiert werden. Nach 3, 6 und 12 Kulturtagen wurden Epithel- und Stromazellen von 5 Kulturen radioaktiv mit $0.1\mu\text{Ci}$ [Methyl- ^3H]-Thymidin markiert und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Reinigung, Ablösung und Lyse der Zellen wurde ihre Radioaktivität in einem Beta-Strahlen-Zähler gemessen. Von dem Maße der Thymidininkorporation, die sich in der Radioaktivität der Zellen widerspiegelt, kann die Proliferationsaktivität abgeleitet werden.

Die Thymidininkorporation bei Epithelzellen nahm zwischen dem 3. und 6. Tag um das 1,8-fache zu und stagnierte danach bis zum 12. Kulturtag - als Zeichen eines gleich bleibenden Zellwachstums - auf diesem Niveau. Die Proliferationsaktivität der Stromazellen nahm zwischen dem 3. und 6. Kulturtag im Mittel um das 1,7-fache zu und fiel zwischen dem 6. und 12. Kulturtag wieder auf 40% des Ausgangswertes ab (Zepf, 2003).

Somit ließ sich eine kontinuierliche Proliferationsaktivität der Epithel- und Stromazellen im Zeitraum der Zellkultur gewährleisten.

Zusammenfassung Kapitel 4.1.1:

Charakteristika der endometrialen Zellen während der gesamten Kulturdauer:

- Vitalität von Epithelzellen bei 80-90%; Vitalität von Stromazellen bei 95-98%;
- Verunreinigung der endometrialen Zellen mit bis zu 5% Immunzellen und bis zu 2% Endothelzellen;
- gute Dezidualisation von Stromazellen nach einmaliger Passage;
- kontinuierliche Proliferationsaktivität von Epithel- und Stromazellen während der Zellkultur.

4.1.2 Charakterisierung der Cokultur

Die mononukleären Blutzellen wurden vor der Cokultivierung mit endometrialen Zellen zur weiteren Charakterisierung nach verschiedenen Gesichtspunkten untersucht.

Neben der Überprüfung der Vitalität vor und nach der Cokultur erfolgte die Feststellung ihrer Zusammensetzung und ihrer Sekretion von verschiedenen Zytokinen.

4.1.2.1 Vitalitätsprüfung mononukleärer Zellen

In eigens zu diesem Zweck kultivierten Ansätzen konnte die Vitalität von mononukleären Blutzellen mittels des Live&Dead Verfahrens festgestellt werden. Die mononukleären Zellen wurden nach 5-6 Tagen Inkubation sowohl vor als auch nach einer anschließenden Cokultur mit endometrialen Zellen bezüglich ihrer Vitalität getestet.

Die auf Polystyrol kultivierten mononukleären Blutzellen zeigten in beiden Fällen eine Vitalität von ca. 85% bis 90%. Die Vitalität mononukleärer Blutzellen in den Falcon-Membraneinsätzen vor und nach Cokultivierung mit endometrialen Zellen betrug 90% bis 95% (siehe Abb. 4.3). Die Vitalität von mononukleären Blutzellen zeigte also in den Membraneinsätzen ein geringfügig besseres Wachstum als auf dem Polystyrol am Boden der Gewebekulturplatte.

Dieses Ergebnis führte zu der Überlegung, das Model der Cokultur zwischen mononukleären Blutzellen und Epithelzellen so zu ändern, dass die mononukleären Blutzellen in Membraneinsätzen und die Epithelzellen darunter auf Polystyrol wachsen sollten. Da jedoch aus Vorversuchen bekannt war, dass Epithelzellen nur in Membraneinsätzen und nicht auf Polystyrol gedeihen können, wurde das Cokultur-Modell von Epithelzellen und mononukleären Blutzellen beibehalten.

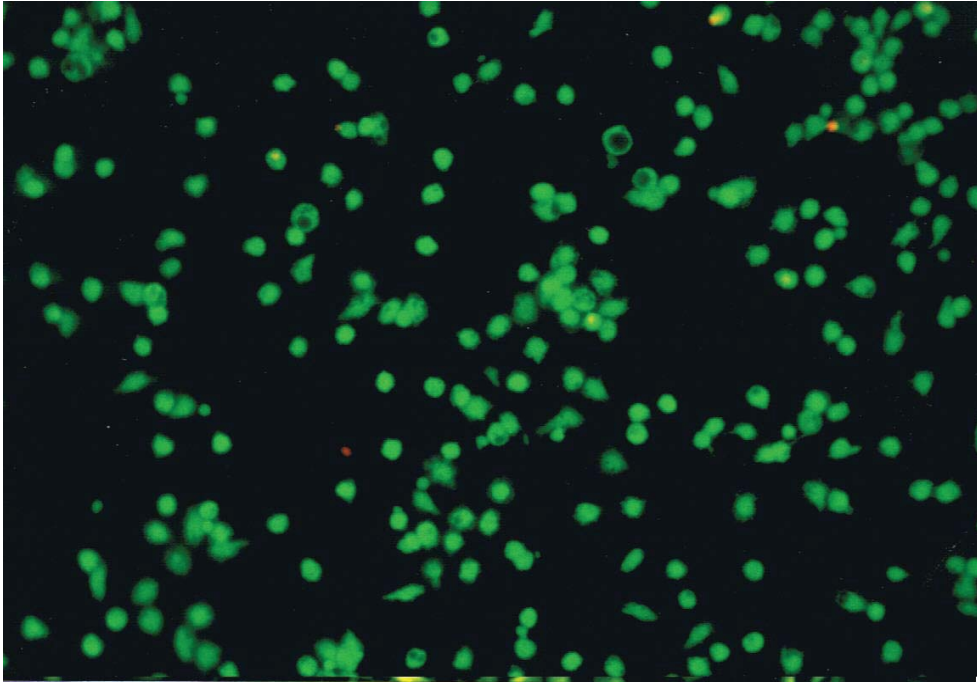


Abb. 4.3: Vitalität von mononukleären Zellen im Fluoreszenzmikroskop nach Cokultur mit endometrialen Zellen für 24 Stunden (250-fache Vergrößerung; grün = vital, rot/orange = avital)

4.1.2.2 Zusammensetzung der mononukleären Zellen

Wie in Kapitel 3.2.3. beschrieben, wurden die mononukleären Zellen 5 Tage lang mit LPS im Brutschrank stimuliert, bevor sie für das Cokultur-Experiment verwendet werden konnten.

Die Zusammensetzung der Zellen in diesem Stadium wurde in einem eigenständigen Vorversuch bestimmt. Die mononukleären Zellen dieser Versuchsreihe erhielten die gleiche Behandlung wie die mononukleären Zellen für die Cokultur (s. Kap. 3.2.3.)

Es ergab sich folgende Zusammensetzung für die mononukleären Zellen nach 5 Kulturtagen und Stimulation mit LPS: ca. 20% Monocyten/Makrophagen, 10% CD4-positive T-Lymphozyten, 25% CD8-positive T-Lymphozyten, 5% CD-19-positive B-Lymphozyten und 5% CD16- und CD56-positive natürliche Killerzellen. Ungefähr 35% der Zellen konnten wegen unzureichender Färbung nicht identifiziert werden.

4.1.2.3 Zytokinsekretion von mononukleären Zellen ohne Cokultur

Vor Beginn einer Cokultur endometrialer Zellen mit mononukleären Blutzellen wurde getestet, ob die kryokonservierten mononukleären Blutzellen auch ohne Cokultur Zytokine produzieren.

Die Überstände von jeweils 500.000 mononukleären Blutzellen, die nach dem Auftauen auf Polystyrol oder im Falcon-Membraneinsatz gewachsen waren, wurden mit ELISA auf IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α und Lif geprüft. Dabei zeigte sich folgendes Ergebnis:

IL-1 α wurde in Konzentrationen zwischen 80 pg/ml und 400 pg/ml gemessen.

Die Bestimmung von IL-1 β ergab Werte zwischen 271 pg/ml und 321 pg/ml.

IL-6 wurde in Konzentrationen zwischen 48 pg/ml und 57 pg/ml produziert.

Die TNF- α -Sekretion erreichte Werte zwischen 211 pg/ml und 261 pg/ml.

Die Sekretion von Lif beschränkte sich auf Werte an der Nachweisgrenze (8 pg/ml).

Zusammenfassung Kapitel 4.1.2:

Charakteristika mononukleärer Blutzellen:

- Geringfügig höhere Vitalität mononukleärer Zellen in Falcon-Membraneinsätzen als auf Polystyrol der Gewebekulturplatte;
- Zusammensetzung mononukleärer Blutzellen: ca. 20% Monocyten/Makrophagen, 10% CD4 positive T-Lymphozyten, 25% CD8 positive T-Lymphozyten, 5% B-Lymphozyten, 5% natürliche Killerzellen und 35% nicht identifizierbare Zellen;
- Sekretion von IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α bei mononukleären Zellen ohne Cokultur

4.1.3 Charakterisierung der PCR

4.1.3.1 Evaluierung der optimalen Zykluszahl

Vor Beginn der PCR-Untersuchungen für jede Behandlungsart (Hormonstimulation, Cokultur mit mononukleären Blutzellen und Zytokinstimulation) wurde sowohl für Epithel- als auch für Stromazellen die optimale Zykluszahl für die Amplifikation der cDNA-Fragmente bestimmt. Dafür musste für jedes Integrin eine eigene Versuchsreihe aufgebaut werden und die cDNA-Fragmente in aufsteigender Zykluszahl vervielfältigt werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (s. Abb. 4.4) und Messung der optischen Dichte, konnten die Ergebnisse graphisch dargestellt werden (s. Abb. 4.5). Abb. 4.4 veranschaulicht exemplarisch die optische Dichte der PCR-Produkte bei Stromazellen in Cokultur mit mononukleären Blutzellen nach Amplifikation mit unterschiedlicher Zykluszahl. Aus dem linearen Bereich der Kurven in Abb. 4.5 wurde die optimale Zykluszahl für die Amplifizierung der cDNA-Fragmente gemäß der Tabelle 4.1 festgelegt. Die gewählte Zykluszahl für die verschiedenen Integrine lag für jede Behandlungsart und sowohl für Epithel- als auch für Stromazellen im linearen Bereich. Aus diesem Grund wurde diese Zykluszahl für die Amplifikation der cDNA von Epithel- und Stromazellen bei allen drei Experimentreihen der Zellkulturen (Hormonstimulation, Cokultur mit mononukleären Blutzellen und Zytokinstimulation) beibehalten.



Abb. 4.4: mRNA-Expression in Stromazellen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen nach Amplifikation der cDNA mit unterschiedlicher Zykluszahl

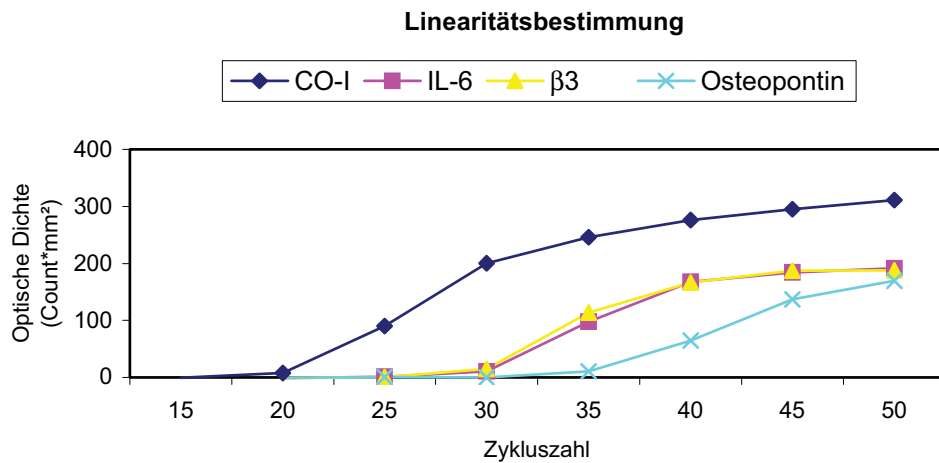


Abb. 4.5: Evaluierung der optimalen Zykluszahl aus dem linearen Bereich der Amplifikationskurven für spezifische cDNA-Fragmente

Endometrialer Faktor	Zykluszahl für Epithelzellen	Zykluszahl für Stromazellen
CO-I	25	28
β3	37	37
Osteopontin	32	40
IL-6	35	35

Tabelle 4.1: Optimale Zykluszahl für die Amplifikation von cDNA

4.1.3.2 Semiquantifizierung der PCR-Amplifikate

Für die Semiquantifizierung der PCR-Amplifikate wurde die optische Dichte der einzelnen Banden im Agarosegel im Verhältnis zu der optischen Dichte des Houskeeping-Genes CO-I (Cytochrom C Oxidase - Untereinheit I) berechnet. Die Werte der optischen Dichten in der folgenden Ergebnisdarstellung sind demnach relative Messwerte.

In mehreren Verdünnungsserien konnte die Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt einer ursprünglichen Probe und der relativen optischen Dichte der Semiquantifizierung bestimmt werden. Dafür wurde die cDNA-Synthese mit unterschiedlicher Ausgangsmenge von mRNA (0,25µg, 0,5µg, 1µg, 2µg, 4µg, 8µg) durchgeführt. Nach der Amplifizierung folgte die Auftrennung im Agarosegel (siehe Abb. 4.6) und die Bestimmung der optischen Dichte. Dieser Wert wurde anschließend ins Verhältnis zu der optischen Dichte von 8µl mRNA des Houskeeping Genes CO-I gesetzt. Aus diesem Vorversuch ging hervor, dass eine Verdopplung der relativen optischen Dichte einer spezifischen Bande im Durchschnitt einem 1,8-fachen Anstieg der ursprünglichen mRNA-Menge entspricht.

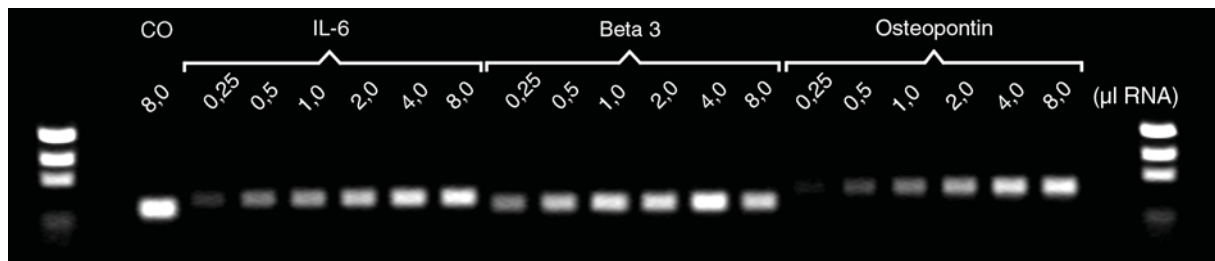


Abb. 4.6: Korrelation der PCR-Amplifikate mit der ursprünglichen mRNA-Menge

Zusammenfassung Kapitel 4.1.3:

Für die PCR wird bei Epithel- und Stromazellen die jeweils optimale Zykluszahl aus dem linearen Bereich der Amplifikationskurven der spezifischen cDNA-Fragmente festgelegt.

Aufgrund der semiquantitativen PCR sind die einzelnen Ergebnisse relative Messwerte.

Eine Verdopplung der relativen optischen Dichte einer Bande entspricht der 1,8-fachen mRNA-Menge der Ausgangsprobe.

4.2 Regulation von IL-6

4.2.1 Regulation von IL-6 bei hormonstimulierten Zellen

Gemäß den Ergebnissen meiner Kollegin, Frau C. Zepf beeinflusst jede Form von Hormonstimulation von Epithel- und Stromazellen (s. Abb. 4.7): Eine Zugabe von E_2 unabhängig von dessen Konzentration (10^{-9} mol und 10^{-8} mol) führte bei Epithelzellen zu einer Zunahme der IL-6 Menge im Überstand um das 1,5-fache. Durch Progesteron in niedriger (10^{-7} mol) und hoher (10^{-6} mol) Dosierung konnten annähernd gleich hohe IL-6-Konzentrationen wie bei der Stimulation mit Östradiol erzielt werden. Bei der kombinierten Gabe beider Steroide kam es zu einer 1,7-fachen Steigerung der IL-6-Sekretion nach physiologischer Stimulation (10^{-9} mol) und einer 1,9-fachen Steigerung nach hochdosierter Stimulation (10^{-8} mol). In den Überständen der Stromazellen ergaben sich Maximalwerte von der 1,75-fachen Zytokinmenge nach getrennter Stimulation mit Östradiol und Progesteron in physiologischer Konzentration. Nach hochdosierter Stimulation sowohl mit Östradiol als auch mit Progesteron ließ sich kein signifikanter Unterschied zu den nicht stimulierten Kontrollen feststellen. Die kombinierte Steroidgabe führte in beiden Konzentrationen zu einer Abnahme der IL-6-Menge (IL-6-Konzentration zwischen 40% und 85% des Kontrollwertes) verglichen mit den Kontrollen ohne Hormonstimulation. Statistische Grundlage bei der Auswertung dieser Untersuchung war der Wilcoxon signed-rank test mit $p < 0,05$ (Zepf, 2003).

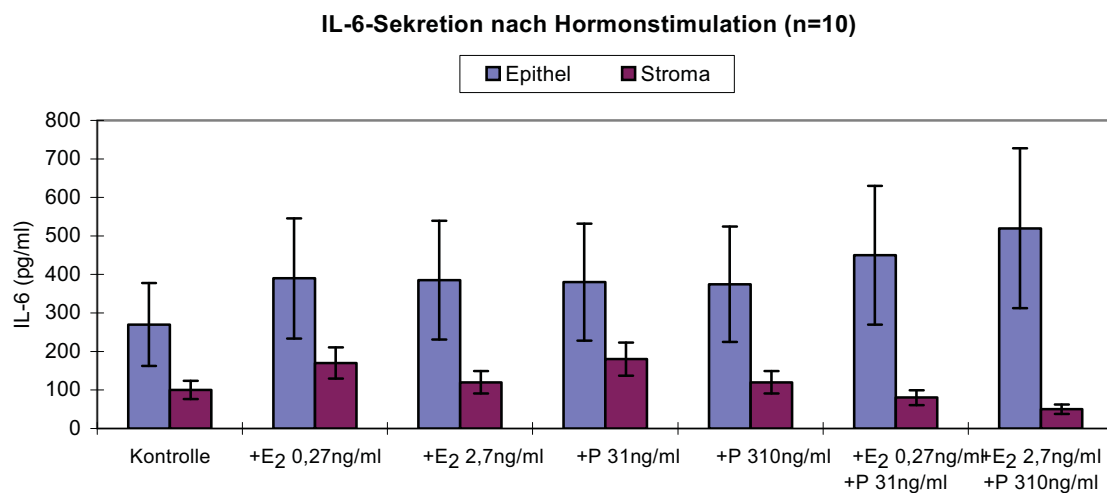


Abb. 4.7: Sekretion von IL-6 bei endometrialen Zellen nach Stimulation mit Östradiol (E_2) und/oder Progesteron (P) in physiol. bzw. hohe Konzentration für 24 Stunden.

4.2.2 Regulation von IL-6 in endometrialen Zellen nach Cokultur

4.2.2.1 Regulation von IL-6 in Epithelzellen nach Cokultur

Epithel- und Stromazellen nach Cokultur mit 50.000 bzw. 500.000 mononukleären Blutzellen wurden mittels ELISA und semiquantiver PCR überprüft.

Im Überstand der Epithelzellen mit und ohne Cokultur wurden ähnliche Werte für die Sekretion von IL-6 gemessen. Auch die Untersuchung der mRNA von Epithelzellen, die mit mononukleären Zellen für 24 Stunden cokultiviert wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied zu der IL-6-mRNA der Kontrollen (siehe Abb. 4.8 und 4.9).

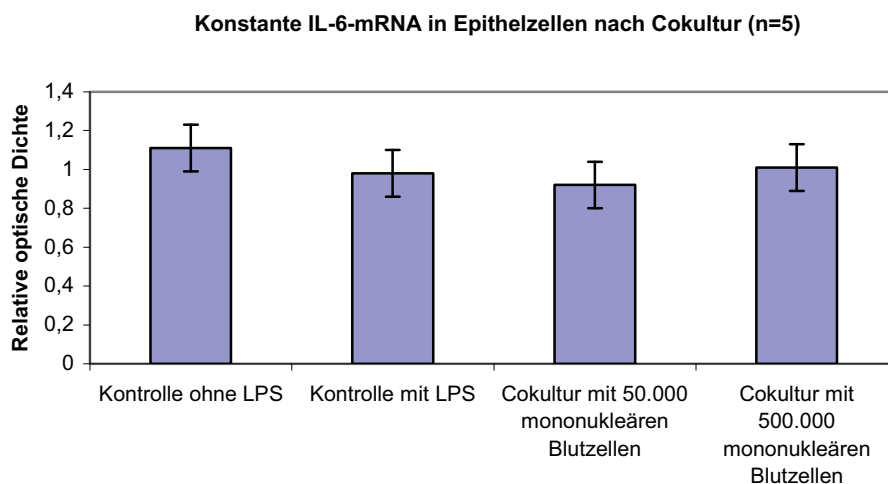


Abb. 4.8: Konstante IL-6-mRNA in Epithelzellen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen für 24 Stunden

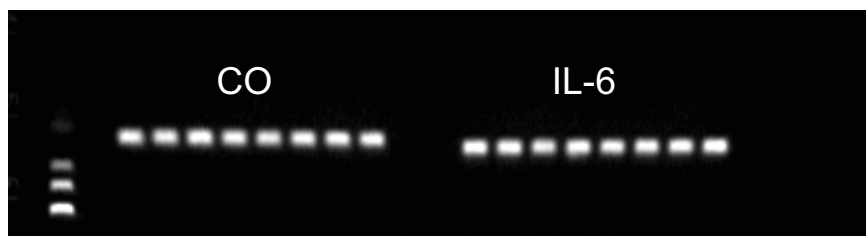


Abb. 4.9: Konstante CO-I und IL-6-mRNA in Epithelzellen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen (Exemplarische Darstellung der Amplifikate einer Kultur)

4.2.2.2 Regulation von IL-6 in Stromazellen nach Cokultur

Im Gegensatz zu den Epithelzellen zeigte sich bei der Cokultur der Stromazellen mit mononukleären Blutzellen ein signifikanter Anstieg der IL-6-Sekretion und der IL-6-mRNA im Vergleich zu den Kontrollen ohne Cokultur. Die Zunahme der IL-6-mRNA in Stromazellen änderte sich dabei proportional zu der Zahl der cokultivierten mononukleären Blutzellen (s. Abb.4.10 und 4.11). Mittels ELISA konnte im Überstand der Cokulturen mit 50.000 mononukleären Blutzellen die 1,4-fache Menge und im Überstand der Cokulturen mit 500.000 mononukleären Blutzellen das 7,4-fache an IL-6-Protein bezüglich der mit LPS stimulierten Kontrollen gemessen werden (s. Abb.4.10).

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass mononukleäre Blutzellen auch ohne Cokultur IL-6 produzieren (vgl. Kap. 4.1.2.3). Aus diesem Grund wurde mittels semiquantitativer PCR überprüft, wie viel des IL-6-Proteins in den Überständen der Cokulturen von den Stromazellen selbst stammte. Es zeigte sich folgendes Ergebnis: Die relative optische Dichte der IL-6-mRNA in Stromazellen nahm in den Cokulturen mit 50.000 mononukleären Blutzellen ebenfalls um den Faktor 1,4 zu und in den Cokulturen mit 500.000 mononukleären Blutzellen um den Faktor 2,5 - jeweils bezogen auf den Referenzwert der Kontrollen ohne LPS (s. Abb. 4.11 und 4.12). Die exakte Signifikanz berechnet anhand des Friedman-Tests betrug in diesem Fall 0,001 - was einen signifikanten Anstieg auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ als auch auf einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau $\alpha' = 2\%$ (vgl. 3.9 Statistik) bedeutet.

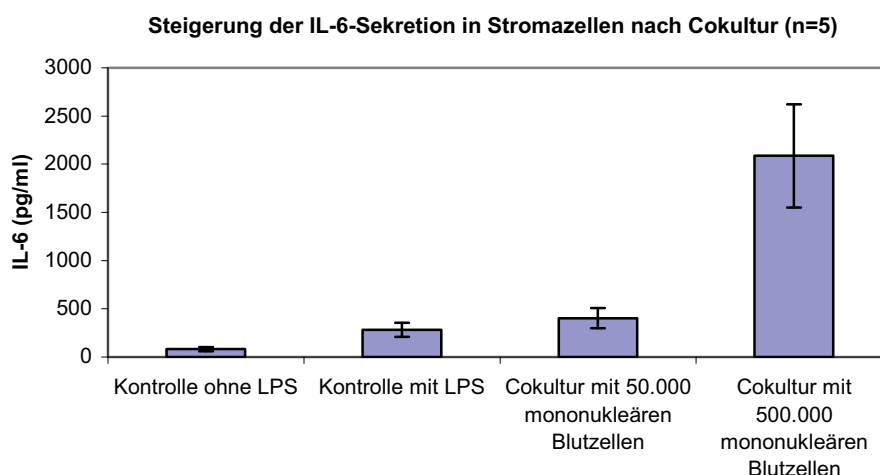


Abb. 4.10: Erhöhte IL-6-Sekretion in Stromazellen nach Cokultur mit 50.000 und 500.000 mononukleären Blutzellen für 24 Stunden

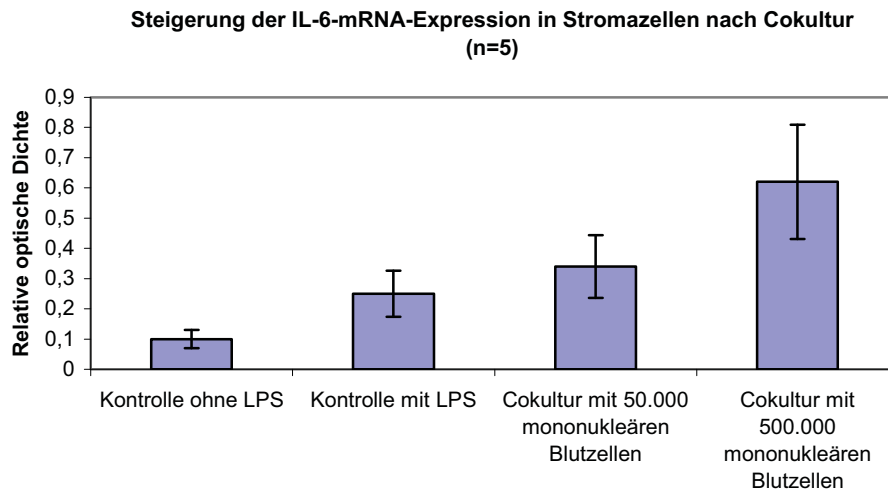


Abb. 4.11: IL-6-mRNA in Stromazellen nach Cokultur mit 50.000 und 500.000 mononukleären Blutzellen für 24 Stunden (Mittelwerte der Kulturen)

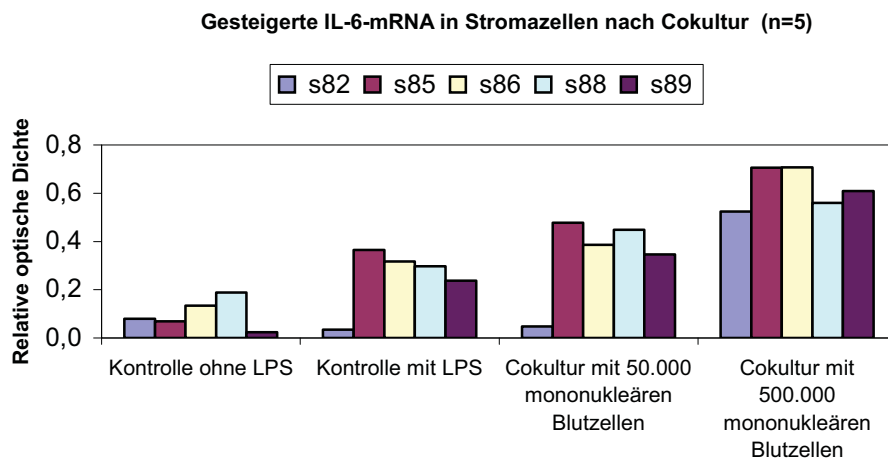


Abb. 4.12: IL-6-mRNA in Stromazellen der einzelnen Kulturen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen für 24 Stunden

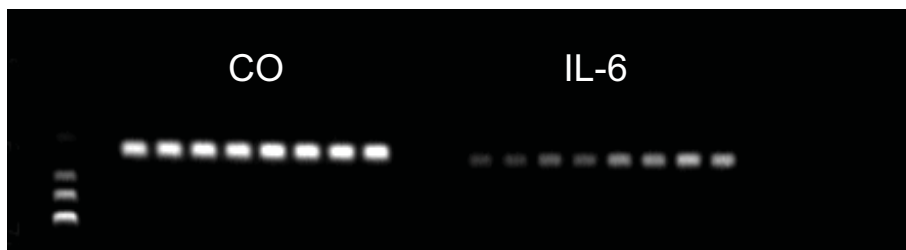


Abb. 4.13: Exemplarische Darstellung der optischen Banden von gesteigerter IL-6-mRNA in Stromazellen einer Kultur nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen (mRNA-Expression des Housekeeping-Gens CO-I konstant)

4.2.3 Regulation von IL-6 in zytokinstimulierten Zellen

4.2.3.1 Regulation von IL-6 in Epithelzellen

Wie in Kap. 4.1.2.3 dargestellt, produzieren mononukleäre Blutzellen ohne Cokultur unter anderem die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6. Um festzustellen, welche dieser sezernierten Zytokine für die unterschiedliche IL-6-Expression in Stromazellen verantwortlich sind, wurden endometriale Zellen mit IL-1 β , TNF- α und IL-6 stimuliert. Anschließend gaben die Untersuchungen mittels ELISA und semiquantitativer PCR Auskunft über die Sekretion von IL-6 bzw. über die Expression von IL-6-mRNA.

Das Experiment der Epithelzellen zeigte entsprechend den Ergebnissen aus dem Cokultur-Versuch keine signifikante Änderung der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF- α (s. Abb. 4.14 und 4.15).

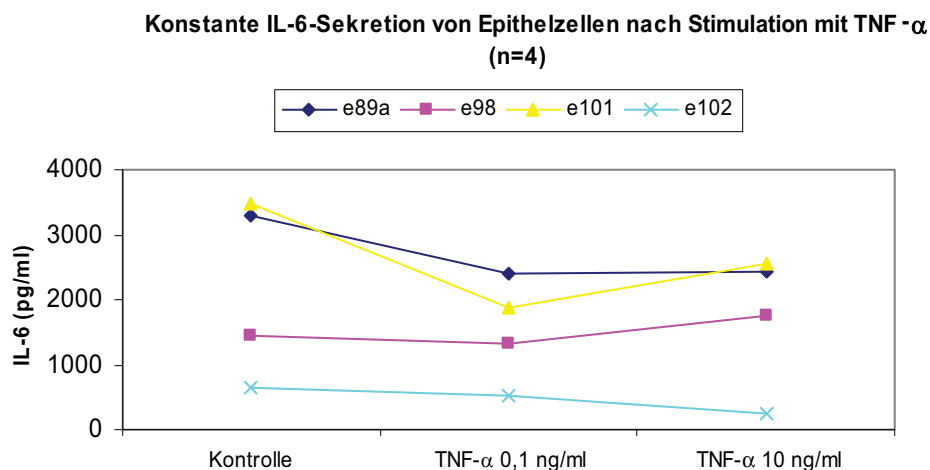


Abb. 4.14: Sekretion von IL-6 von Epithelzellen nach Stimulation mit TNF- α für 24 Stunden

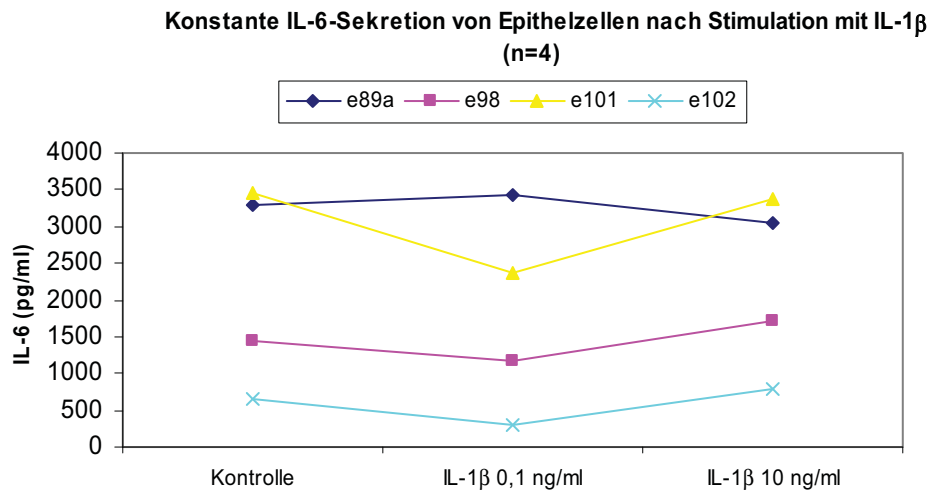


Abb. 4.15: Sekretion von IL-6 von Epithelzellen nach Stimulation mit IL-1 β für 24 Stunden

4.2.3.2 Regulation von IL-6 in Stromazellen

Wie aufgrund der Ergebnisse des Cokultur Experimentes zu erwarten war, zeigte sich bei den Stromazellen ein signifikanter Anstieg der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β (s. Abb. 4.16 und 4.17).

Die Sekretion von IL-6 nach Stimulation mit TNF- α war dosisabhängig und betrug bei der Stimulation mit 0,1 ng/ml TNF- α im Mittel das 4,2-fache des Kontrollwertes ohne Zytokin-stimulation und bei einer Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α im Mittel das 7,9-fache des Kontrollwertes. Die exakte Signifikanz berechnet nach dem Friedman-Test betrug dabei 0,008. Das bedeutet einen signifikanten Unterschied der Werte sowohl auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ als auch auf einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau $\alpha' = 2\%$ (vgl. 3.9 Statistik).

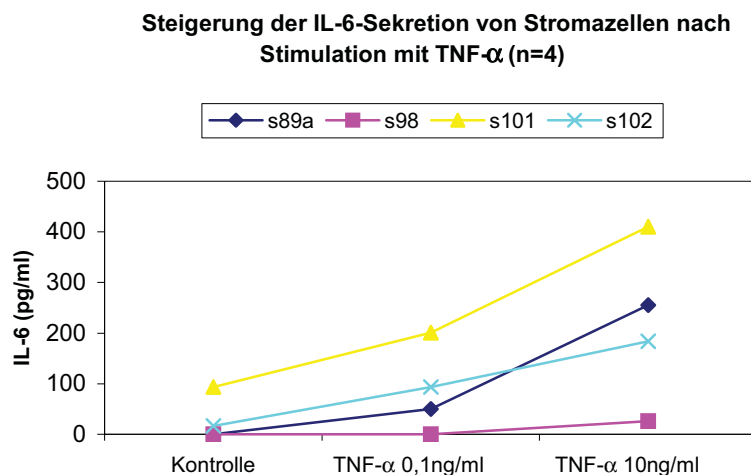


Abb. 4.16: Sekretion von IL-6 von Stromazellen nach Stimulation mit TNF- α für 24 Stunden

Nach Stimulation der Stromazellen mit 0,1 ng/ml IL-1 β stieg die IL-6-Sekretion im Mittel um den Faktor 15,5 und nach Stimulation mit 10 ng/ml um den Faktor 16,8 verglichen mit den Kontrollen ohne Zytokin-Stimulation. Bei den Stromazellen nach IL-1 β Stimulation wurde der Anstieg der IL-6-mRNA mittels semiquantitativer PCR verifiziert (s. Abb. 4.18). Dabei zeigte sich eine Zunahme der IL-6-mRNA bei niedriger IL-1 β Konzentration (0,1 ng/ml) im Mittel um das 10,9-fache und bei hoher IL-1 β Konzentration (10 ng/ml) um den Faktor 11,8. Die exakte Signifikanz berechnet nach dem Friedman-Test betrug dabei 0,024. Das bedeutet einen signifikanten Unterschied der Werte auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$, jedoch nicht auf einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau $\alpha' = 2\%$ (vgl. 3.9 Statistik).

Steigerung der IL-6- Sekretion bei Stromazellen nach Stimulation mit IL-1 β (n=4)

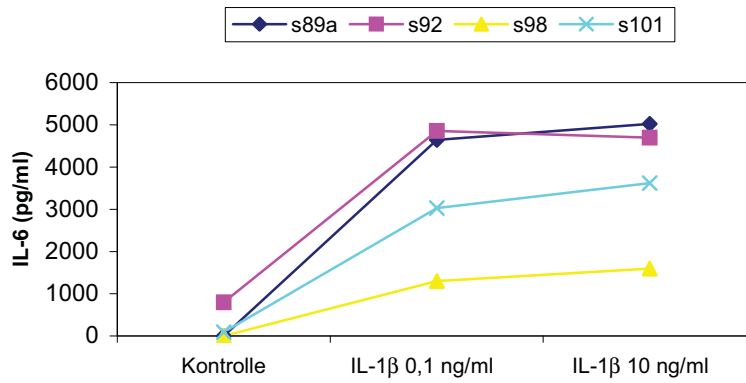


Abb. 4.17: Sekretion von IL-6 von Stromazellen nach Stimulation mit IL-1 β für 24 Stunden

Steigerung der IL-6-mRNA in Stromazellen nach Stimulation mit IL-1 β (n=4)

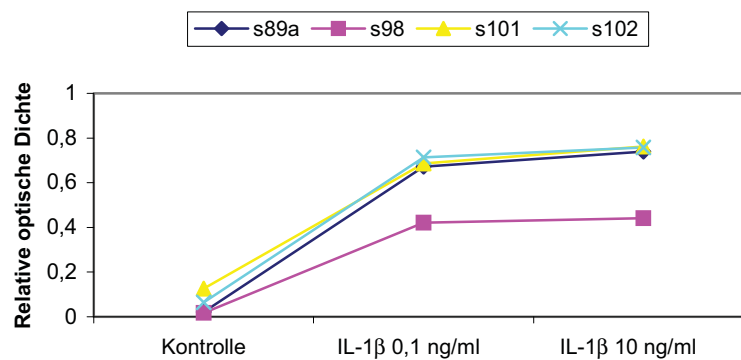


Abb. 4.18: IL-6-mRNA in Stromazellen nach Stimulation mit IL-1 β für 24 Stunden

Es wurde außerdem geprüft, ob eine Stimulation mit IL-6, das ebenfalls von mononukleären Zellen ohne Cokultur produziert wird, eventuell eine weitere Steigerung der IL-6-mRNA zur Folge hat. Wie Abb. 4.19 zu entnehmen ist, war dies nicht der Fall.

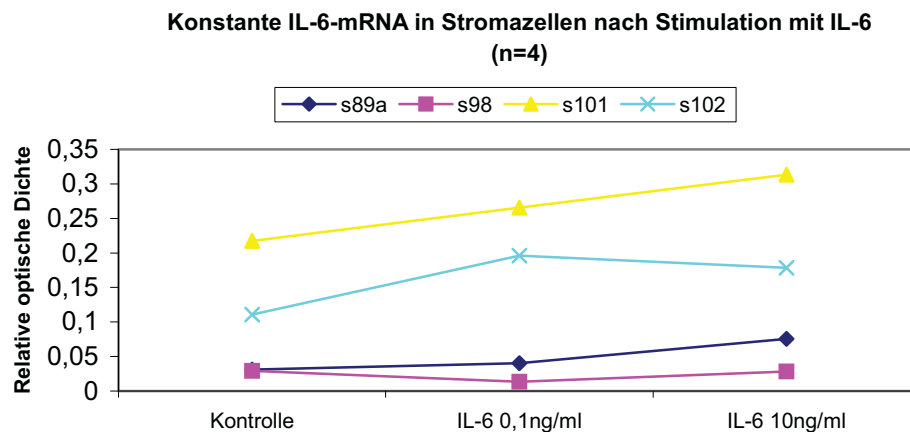


Abb. 4.19: Konstante IL-6-mRNA in Stromazellen nach Stimulation mit IL-6 für 24 Stunden

Zusammenfassung Kap. 4.2:

Bei Epithelzellen lässt sich eine maximale IL-6-Sekretion durch kombinierte Stimulation mit Östradiol und Progesteron in hoher Dosierung erzielen. Die kombinierte Steroidgabe beider Konzentrationen wirkt bei Stromazellen eher inhibierend auf die IL-6-Sekretion. Höchstwerte der Zytokinsekretion bei Stromazellen werden durch getrennte Stimulation mit physiologischen Konzentrationen der Steroidhormone erreicht.

Die Cokultur mit mononukleären Blutzellen und die Stimulation mit Zytokinen haben keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion von Epithelzellen.

In Stromazellen zeigt sich eine signifikante dosisabhängige Steigerung der IL-6-Sekretion und der IL-6- mRNA nach Cokultur mit mononukleären Zellen sowie nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β , jedoch nicht nach Stimulation mit IL-6.

4.3 Regulation von β_3

4.3.1 Regulation von β_3 in hormonstimulierten Zellen

Nach Stimulation mit den weiblichen Hormonen Östradiol und Progesteron wurde in Epithel- und Stromazellen die Expression von β_3 -mRNA mittels semiquantitativer PCR analysiert. E_2 war dabei in den Konzentrationen 0,27 ng/ml und 2,7 ng/ml verabreicht worden und Progesteron in den Konzentrationen 31 ng/ml und 310 ng/ml. Es zeigte sich bei diesem Experiment keine signifikante Änderung der Expression von β_3 -mRNA sowohl in Epithel- als auch in Stromazellen nach Stimulation mit E_2 und/oder Progesteron (s. Abb. 4.20).

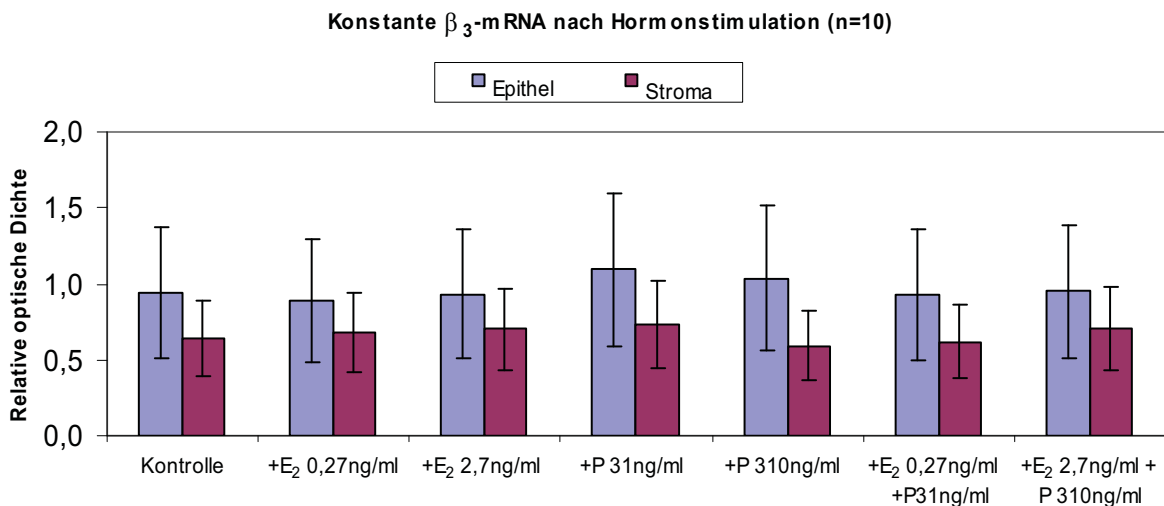


Abb. 4.20: Expression von β_3 -mRNA in Epithel- und Stromazellen nach Stimulation mit Östradiol (E_2) und/oder Progesteron (P) für 24 Stunden

4.3.2 Regulation von β_3 in Zellen der Cokultur

Nach Cokultivierung von endometrialen Zellen mit mononukleären Blutzellen wurde das Integrin β_3 in Epithel- und Stromazellen ebenfalls durch semiquantitative PCR untersucht. Sowohl eine Cokultur endometrialer Zellen mit 50.000 als auch mit 500.000 mononukleären Zellen zeigte dabei keine signifikante Auswirkung auf die Expression des β_3 -Integrins in Epithel- und Stromazellen (s. Abb. 4.21).

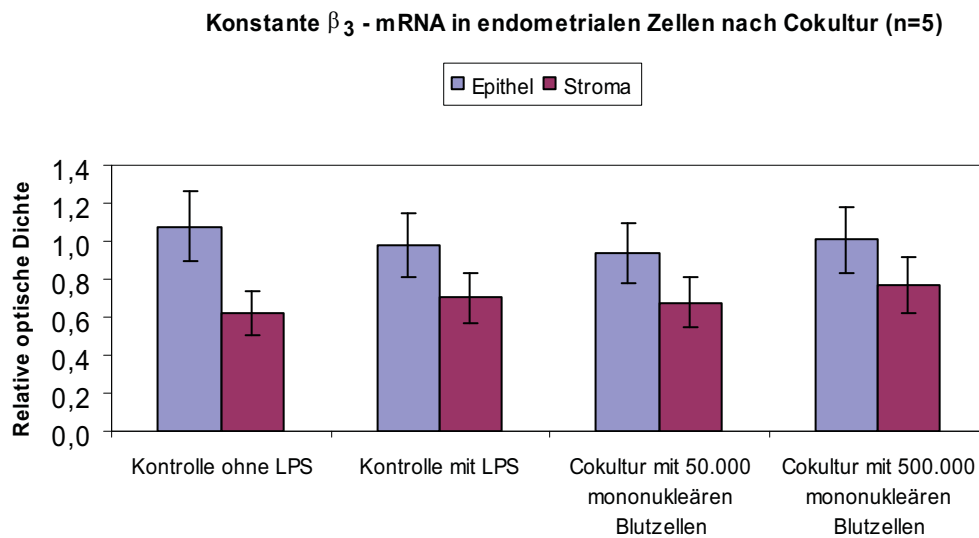


Abb. 4.21: Expression von β_3 -mRNA in Epithel- und Stromazellen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen für 24 Stunden

4.3.3 Regulation von β_3 in zytokinstimulierten Zellen

Um die Ergebnisse der Experimente der Cokultur endometrialer mit mononukleären Zellen zu verifizieren, wurden endometriale Zellen einer Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6 unterzogen. Dabei legte man sich auf die Konzentrationen 0,1 ng/ml und 10 ng/ml bei jedem der drei Zytokine fest. Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Bestätigung der Ergebnisse der Cokultur-Experimente: Die Expression des β_3 -Integrins in Epithel- und Stromazellen wurde durch Stimulation mit den oben genannten Zytokinen in beiden Konzentrationen nicht signifikant beeinflusst (s. Abb. 4.22).

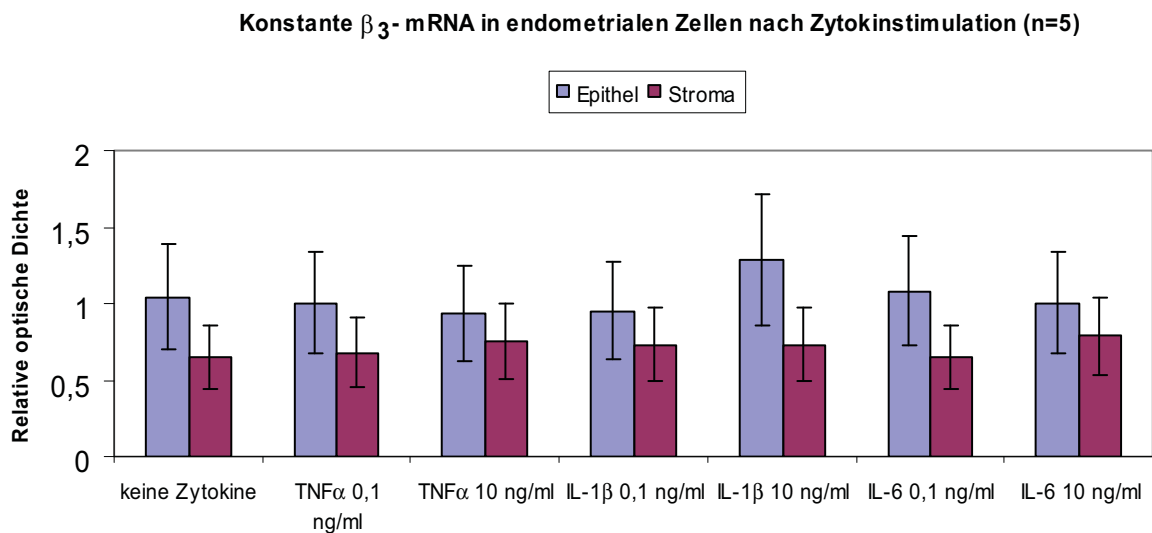


Abb. 4.22: Expression von β_3 -mRNA in Epithel- und Stromazellen nach Stimulation mit TNF- α , IL-1 β , IL-6 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

Zusammenfassung Kap. 4.3:

Sowohl in Epithel- als auch in Stromazellen bewirkt die Stimulation mit den Hormonen E₂ und/oder Progesteron, die Cokultur mit mononukleären Blutzellen und die Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6 keine signifikante Änderung der β_3 -mRNA.

4.4 Regulation von Osteopontin

4.4.1 Regulation von Osteopontin in hormonstimulierten Zellen

Die Stimulation endometrialer Zellen mit den Hormonen E₂ in den Konzentrationen 0,27 ng/ml und 2,7 ng/ml und/oder mit Progesteron in den Konzentrationen 31 ng/ml und 310 ng/ml zeigte in der Expression von Osteopontin-mRNA mittels semiquantitativer PCR keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen ohne Hormonstimulation bzw. zwischen den einzelnen Stimulationen untereinander. Dieses Ergebnis galt sowohl für Epithel- als auch für Stromazellen (s. Abb. 4.23).

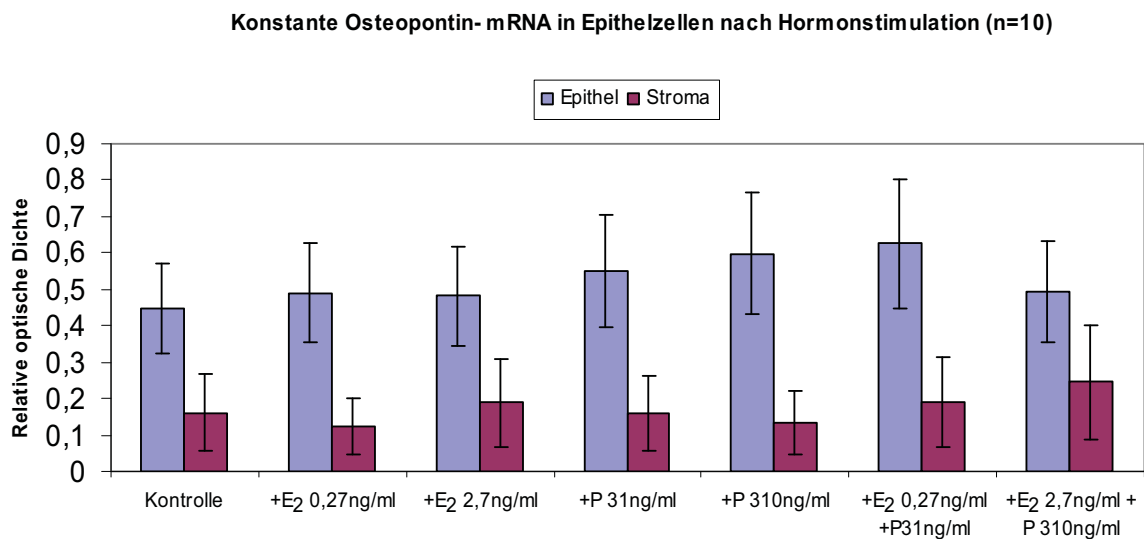


Abb. 4.23: Osteopontin-mRNA in Epithel- und Stromazellen nach Stimulation mit Östradiol (E₂) und/oder Progesteron (P) in physiologischer und hoher Konzentration für 24 Stunden

4.4.2 Regulation von Osteopontin in Zellen der Cokultur

Die Untersuchungen mittels semiquantitativer PCR zur Regulation der Osteopontin-Expression in endometrialen Zellen nach Cokultur mit 50.000 bzw. mit 500.000 mononukleären Zellen ergaben ebenfalls keine signifikante Änderung im Vergleich zu den Kontrollen ohne Cokultur. Dies Ergebnis galt sowohl für Epithel- als auch für Stromazellen (s. Abb. 4.24)

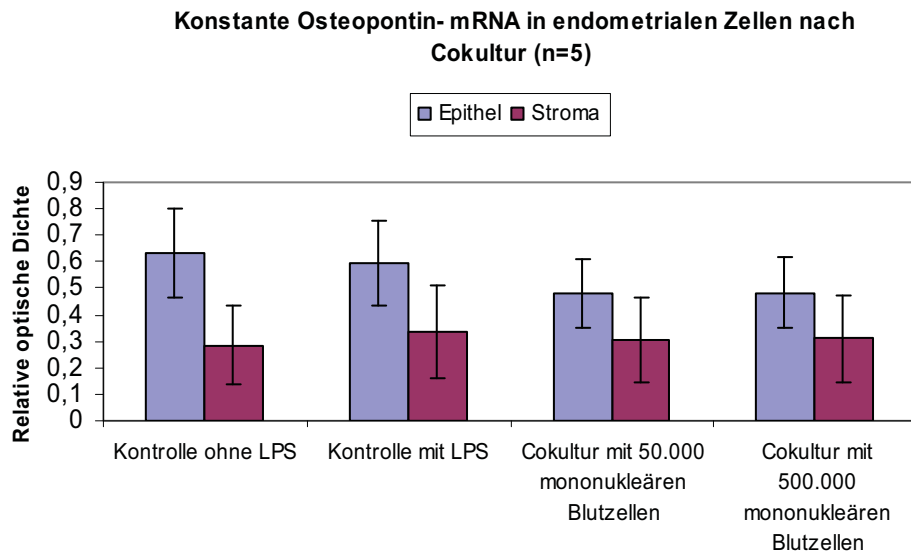


Abb. 4.24: Osteopontin-mRNA in Epithel- und Stromazellen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen für 24 Stunden

4.4.3 Regulation von Osteopontin in zytokinstimulierten Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der Osteopontin-Regulation in endometrialen Zellen wurden diese mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6 in den Konzentrationen 0,1 ng/ml und 10 ng/ml stimuliert. Anschließend folgte die Analyse mittels semiquantitativer PCR. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Stimulation mit den drei genannten Zytokinen keinen signifikanten Einfluss auf die Osteopontin-Expression sowohl in Epithel- als auch in Stromazellen hatte (s. Abb. 4.25).

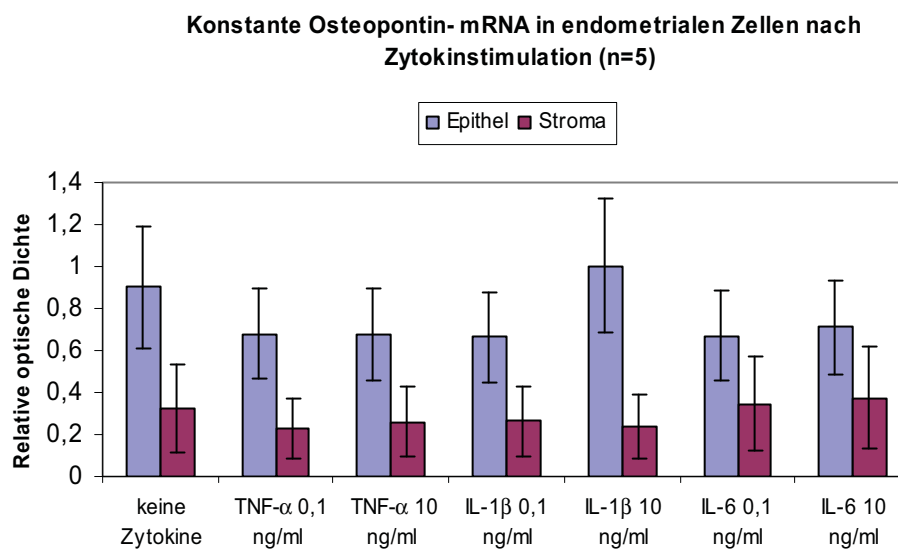


Abb. 4.25: Osteopontin-mRNA in Epithel- und Stromazellen nach Stimulation mit TNF- α , IL-1 β , IL-6 in zwei verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

Zusammenfassung Kapitel 4.4:

Die Stimulation mit den Steroidhormonen Östradiol und/oder Progesteron, die Cokultur mit mononukleären Zellen sowie die Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6 bewirkt keine signifikante Änderung der Expression von Osteopontin in Epithel- und Stromazellen des Endometriums.

5. Diskussion

5.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation von IL-6, β_3 und Osteopontin im fertilen Uterus um daraus Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Faktoren bei der infertilen bzw. sterilen Frau zu ziehen. Allerdings ist es ethisch undenkbar, dass sich gesunde, fertile Frauen im reproduktiven Alter zu Forschungszwecken einem operativen Eingriff wie dem einer Hysterektomie unterziehen, um dieses Ziel zu unterstützen.

Durch die Auswahl von Patientinnen, die sich gemäß dem Hormonstatus (E_2 , Progesteron und LH) noch nicht in der Postmenopause befanden, wurde versucht, eine gemeinsame Grundlage für das Patientenkollektiv zu erreichen. Dennoch war die jüngste Patientin 35 Jahre alt und die älteste 51 Jahre. Da bei Frauen im Alter von über 35 Jahren die Konzeptionserwartung pro Zyklus unter 5% liegt und bei Frauen unter 25 Jahren bei 15% (Felberbaum et al., 2002) ergibt sich schon allein aus dem Altersspektrum des Patientenkollektivs eine Diskrepanz zu dem angestrebten Ziel. Anamnestisch gab jede der Patientinnen an, sich zum Zeitpunkt des operativen Eingriffes in der Sekretionsphase eines regulären menstruellen Zykluses zu befinden. Die histologische Untersuchung der Präparate ergab allerdings, dass nur ca. 80% der Uteri tatsächlich ein sekretorisch transformiertes Endometrium aufwiesen. Dies ergibt einen Unsicherheitsfaktor in der Auswertung der Ergebnisse, wobei die direkte Auswirkung dieses Fehlers nicht genau definiert werden kann.

Außerdem ist bekannt, dass die Diagnose eines Uterus myomatosus zu einer uterin bedingten Sterilität führen kann (Knörr, 1989). Da bei 70% unserer Patientinnen histologisch ein Uterus myomatosus diagnostiziert wurde, entsprachen die Endometrien in diesem Punkt nicht der erwünschten Voraussetzung einer gesunden Gebärmutter. Aus den oben genannten ethischen Gründen musste jedoch diese Einschränkung bezüglich Alter und Gesundheitszustand der Materialproben in Kauf genommen werden.

Bei acht der zehn Patientinnen ergab die histologische Gewebeuntersuchung nach der Hysterektomie die Diagnose einer Endometriose (sechs Mal Adenomyosis uteri interna, zwei Mal Endometriose des Ovars). In verschiedenen Studien anderer Autoren konnte festgestellt werden, dass Endometriose sehr wahrscheinlich einen hemmenden Einfluss auf die Fertilität von Patientinnen ausübt (Bancroft et al., 1989; Lessey et al., 1994b). Die Prävalenz von Endometriose in der normalen fertilen Bevölkerung beträgt ca. 2-5% wobei sie bei infertilen Frauen zwischen 20-40% liegt (Strathy et al., 1982; Verkauf, 1987). Dabei spielt vor allem

eine von der Norm abweichende Integrinexpression im Uterus von Frauen mit Endometriose eine wichtige Rolle. Also kann bei dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit, bei dem histologisch in 80% der Fälle eine Endometriose diagnostiziert wurde, auch auf eine von der Norm abweichende Integrinexpression ausgegangen werden. Dieser Feststellung steht allerdings die Tatsache gegenüber, dass ebenfalls 80% der mit Endometriose diagnostizierten Patientinnen dieser Studie in der Vergangenheit schwanger gewesen sind bzw. Kinder geboren haben. Eine veränderte Integrinexpression in diesen speziellen Fällen war demzufolge weniger ausschlaggebend als bei sterilen Patientinnen.

5.2 Zellkultur

Bis zum Beginn der Hauptversuche der vorliegenden Arbeit wurden endometriale Zellen von insgesamt 20 verschiedenen Patientinnen kultiviert. Davon konnten jedoch nur 10 Endometrien Eingang in die Studie finden und zwar fünf für die Untersuchungen für Cokulturen mit mononukleären Blutzellen und fünf für die Untersuchungen mit zytokinstimulierten Zellen. Der Grund für diese Einschränkung war, dass die Stroma- oder Epithelzellen einen nicht ausreichenden Zellrasen in der Kulturschale gebildet haben bzw. mit anderen Zellen verunreinigt waren. Die Bewachungsdichte der Epithelzellen zeigte dabei eine besonders große Variationsbreite, während die Stromazellen deutlich widerstandsfähiger und weniger anfällig für Verunreinigung oder Schwankungen des umgebenden Milieus waren. Um die Epithelzellen des Endometriums adäquat kultivieren zu können und auch sicher zu sein, dass sie *in vitro* ähnliche Eigenschaften wie *in vivo* besitzen, wurde das Kulturmodell von Classen-Linke (1997) angewandt. In älteren Studien zu dem Thema der Epithelzellenkultivierung konnte gezeigt werden, dass Epithelzellen des Endometriums mit der klassischen Zellkultur auf Kunststoff- oder Glasoberflächen ihre strukturellen Charakteristika und ihre spezielle Funktionen verlieren (Li et al. 1987; Streuli et al. 1991). Sie wachsen hier als Monolayer ohne dreidimensionale Struktur. Diese veränderte Zellfunktion zeigt sich im Verlust ihrer zellulären Polarität, ihrer kubischen Form sowie ihrer tight junctions und Desmosomen. Außerdem verlieren die Epithelzellen die Fähigkeit, auf organotypische Hormone zu reagieren, indem die Expression der für diesen Zweck spezifischen Proteine unterbleibt (Mulholland et al., 1988; Streuli et al., 1991). In verschiedenen Studien wurden polarisierte Epithelzellen des Uterus anhand von *In-vitro*-Tier-Modellen untersucht - wie z.B. beim Hasen (Mani et al., 1991; Winterhager et al., 1994), der Maus (Jacobs et al., 1990;

1992), der Ratte (Glasser et al., 1988; Julian et al., 1992) und dem Guinea-Schwein (Mahfoudi et al., 1991; 1992; 1994). Diese Studien wurden an isolierten Epithelzellen von nicht ausgewachsenen Tieren durchgeführt, wobei ein Zwei-Kammer-System und die extrazelluläre Matrix Matrigel verwendet wurden. In allen Fällen konnte dabei eine morphologische und funktionelle Polarität sowie eine Hormonantwort der Epithelzellen nachgewiesen werden.

Die ersten Studien, in denen humane endometriale Epithelzellen auf Matrigel als extrazelluläre Matrix kultiviert worden sind (Negami et al., 1989) und zusätzlich ein Zwei-Kammer-System benutzt wurde, zeigten eine gute Differenzierung der Epithelzellen. Im Elektronenmikroskop erschienen diese Epithelzellen in dreidimensionaler polarisierter kubischer Form auf der Matrigel-Oberfläche. Apical gelegen exprimierten die Zellen Microvilli, basal gelegen Zellkerne und vielzählige zytoplasmatische Strukturen, die mit einem gut differenzierten Zytoplasma vereinbar waren. Die apicale Verbindung zwischen den Epithelzellen wurde durch tight junctions und Desmosomen hergestellt (Schatz et al., 1990; White et al., 1990). Im Gegensatz dazu waren Epithelzellen, die auf Kunststoffoberflächen gezüchtet wurden, von flacher Form, zeigten weniger Microvilli und zytoplasmatische Strukturen und keine Verbindungskomplexe zwischen den Zellen (Schatz et al., 1990). Obwohl in vivo zwischen Epithel- und Stromazellen des Endometriums eine enge Beziehung besteht, ist es für ein In-vitro-Experiment einfacher, diese beiden Zelltypen getrennt zu betrachten. Wenn dies nicht der Fall wäre, und beide Zelltypen würden in einem Cokulturmodell untersucht werden, wäre es unmöglich, endokrine Effekte dem jeweiligen Zelltyp zuzuschreiben. Um die Zellpolarität in vitro sowie die Morphologie der Zellen zu erhalten, ist eine Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix von großer Bedeutung - jedoch nicht notwendigerweise die Cokultur zwischen Epithel- und Stromazellen (Hopfer et al., 1994). Insofern wurden auch in dieser Arbeit die beiden Zelltypen getrennt voneinander untersucht, wobei die Epithelzellen auf der extrazellulären Matrix Matrigel in polarisierter Form und mit dreidimensionaler Struktur kultiviert wurden.

Die extrazelluläre Matrix Matrigel ist ein Extrakt des basalmembranreichen Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkoms der Maus, welcher die natürliche Basalmembran für funktionsfähige Epithelzellen in einer Kultur nachahmt (Kleinman et al., 1986). Matrigel enthält Entactin-Laminin, Kollagen Typ IV, Heparan-Sulfat-Proteoglycan und einige Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β , EGF, Insulin-like growth factor 1, bFGF und PDGF, welche natürlicherweise im Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor vorkommen. Obwohl die Wirkung von Matrigel hauptsächlich in Zusammenhang mit der Bindungskapazität von Wachstumsfaktoren diskutiert

wird (Vukicevic et al., 1992), ist der Bestandteil Laminin die Hauptursache für das dreidimensionale und polarisierte Wachstum von Epithelzellen (Streuli et al., 1995). Insgesamt kann gesagt werden, dass die Proteinbausteine der extrazellulären Matrix Matrigel sehr ähnlich dem menschlichen Endometrium in der Sekretionsphase sind (Glasser et al., 1991). In früheren Studien wurden humane endometriale Epithelzellen auch auf einer von Ratten abstammender Kollagen Typ I-Matrix kultiviert (Casslen and Harper, 1991; Ghosh and Sengupta, 1995). Diese Zellen zeigten ebenfalls eine Polarisation, eine basalmembranähnliche Struktur am basalen Ende sowie teilweise drüsenähnliche Strukturen in der Matrix. Dennoch ist die Wirkung von Hormonen in dieser Art von Matrix noch nicht ausreichend erforscht. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung in der vorliegenden Arbeit für die Kultivierung der Epithelzellen auf Matrigel.

Stromazellen hingegen sind in dieser Hinsicht eher tolerant was den Untergrund der Kultur betrifft und zeigen ein zufriedenstellendes Wachstum mit sehr guter Vitalität auf der Kunststoffoberfläche Polystyrol. Wie schon in der Arbeit von Kevin et al. (1989) festgestellt werden konnte, heften sich die Stromazellen sehr schnell an die Kunststoffoberfläche an und bilden schon nach 3 Tagen einen konfluenten Zellrasen. Die Vitalität der Zellen bleibt bis zu 12 Tagen Kulturdauer einwandfrei erhalten, ohne dass sich die Zellen vom Boden der Kulturschale ablösen (Osteen et al., 1989). Angesichts dieser Argumente wurde die Entscheidung für Polystyrol als Wachstumsoberfläche für Stromazellen getroffen.

5.3 Hormonstimulation

Milgrom und Baulieu (1970) haben zum ersten Mal das klassisch beschriebene Priming der Progesteron-Wirkung durch Östradiol im Uterus publiziert. Des Weiteren zeigten Jensen et al. (1972), dass Östradiol die Synthese seines eigenen Rezeptors erhöht und Milgrom et al. (1973), dass Progesteron die Synthese seines eigenen Rezeptors hemmt. Außerdem antagonisiert Progesteron die Wirkung von Östradiol, indem es die Synthese des Östrogen-Rezeptors hemmt (Tseng et Gulpide, 1975; Tseng, 1979). Mehrere Studien (Press et al., 1984; Bergeron et al., 1988; Lessey et al., 1988; Ravn et al., 1994) kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl der Östrogen- als auch der Progesteron-Rezeptor in vivo charakteristische Veränderungen während des Menstruationszyklusses durchlaufen. Sie ergaben außerdem, dass die Mehrzahl der Stroma- und Epithelzellen positive Östrogenrezeptoren in der mittleren und späten Sekretionsphase aufwies. Im weiteren Verlauf der Sekretionsphase nahm die Menge der Östrogenrezeptoren sowohl in Epithel- als auch in Stromazellen wieder ab. Die maximale Anzahl von Progesteronrezeptoren wurde in der Proliferationsphase und in den ersten Tagen nach der Ovulation festgestellt. Danach kam es zu einem steilen Abfall der Progesteronrezeptormenge, die auch während der gesamten Sekretionsphase gering blieb. Die Arbeitsgruppe um Bergqvist bestätigte diese Ergebnisse teilweise: Eine statistisch signifikante Korrelation zu der Zyklusphase ließ sich nur beim Progesteronrezeptor in den Epithelzellen nachweisen, nicht aber beim Östrogenrezeptor oder bei beiden Rezeptortypen in Stromazellen (Bergqvist et al., 1993).

Mit Hilfe von Immunhistochemie konnten Classen-Linke et al. (1997) belegen, dass auch nach mehreren Tagen der Kultur humane endometriale Epithelzellen mit einem intakten Rezeptorsystem von Steroidhormonen operieren. Sillem und seine Kollegen stellten fest, dass die Expression einer Vielzahl von Integrinen in vitro nicht von einer Hormonstimulation mit Östrogen, Progestin (Promegeston) oder der Kombination davon abhängig ist. Sowohl ein Vielfaches der physiologischen Konzentration als auch ein Bruchteil davon zeigte keine Wirkung auf die Integrine. Die Integrine, die in der eben erwähnten Studie getestet wurden, waren: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und die Untereinheit β_3 (Sillem et al., 1997). Eine ähnliche Schlussfolgerung lassen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie zu: Die Stimulation endometrialer Zellen mit Östradiol, Progesteron oder der Kombination aus beiden zeigten keine Wirkung auf die Expression von β_3 oder Osteopontin (siehe Kap. 4.3.1 und 4.4.1). Lediglich bei IL-6 ergab sich ein Einfluß durch Stimulation mit Steroidhormonen, wie meine Kollegin, Frau C. Zepf feststellen konnte (vergl. Kap. 4.2.1 bzw. Zepf, 2003). Diesen

Ergebnissen widerspricht die Studie von von Wolff et al., derzufolge sowohl die Stimulation mit 17 β -Östradiol und/oder Progesteron als auch der Entzug beider Hormone einzeln oder in Kombination keinen signifikanten Einfluß auf die IL-6-Konzentration in Epithel- und Stromazellen zeigte (von Wolff et al., 2002b). Ein Grund für das Fehlen eines deutlicheren Effekts von Sexualhormonen auf die Integrinexpression im Endometrium könnten die fehlenden Faktoren sein, die im In-vitro-Modell nie vollständig mit der Situation in vivo übereinstimmen werden. Vor allem Zytokine könnten dieser fehlende Faktor sein, der die Aktivität der Steroidhormone modelliert.

5.4 Mononukleäre Zellen / Cokultur

Da mononukleäre Blutzellen im menschlichen Körper in großer Zahl anwesend sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen ebenso in der Schleimhaut der Gebärmutter zu finden sind und dort auch eine gewisse Rolle bei den Einnistungs- und Entwicklungsvorgängen der Blastozyste spielen. Um diesen Sachverhalt etwas näher zu betrachten und zu belegen, wurden innerhalb dieser Arbeit mononukleäre Blutzellen in Cokultur mit endometrialen Zellen untersucht. Mononukleäre Blutzellen, zu denen die Monozyten und die Lymphozyten gehören, sind die wesentlichen Stützen des körpereigenen Immunsystems. Nach der Auswanderung von Monozyten in Gewebe kommt es zur Umwandlung (Differenzierung) in Makrophagen. Diese Zellen haben hauptsächlich die Aufgabe der Phagozytose in der späten Phase der Abwehrreaktion und produzieren darüber hinaus Zytokine, Interferone sowie andere zytotoxische Substanzen (Hoffmann-La Roche AG, 1991).

Die Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems erfüllen ein großes Spektrum von biologischen Schutzfunktionen gegen Mikroorganismen (Mackaness, 1962) und gegen Tumore (Evans, 1976; Hibbs et al., 1978). Zu ihren Aufgaben zählen außerdem die Regulation der Granulopoese (Golde und Cline, 1974) und Wechselwirkungen mit Lymphozyten der Immunantwort (Shortman und Palmer, 1971).

Bis vor einigen Jahren wurden die Forschungen mit humanen mononukleären Blutzellen durch den Umstand limitiert, dass es schwierig war, eine ausreichende Zahl von reinen Makrophagen zu erhalten. Die meisten Experimente wurden mit Makrophagen-Kulturen aus verlängerter Inkubation von Blut-Monozyten durchgeführt (Sutton und Weiss, 1966). Hier besteht allerdings das Problem, dass die Makrophagen sehr fest an der Oberfläche der Kulturschalen heften und es dadurch schwierig ist, die Zellen ohne deutlichen Schaden abzulösen.

Andreesen et al. (1982) konnten aus dem Leukozytenkonzentrat einer Blutspende (Buffy Coat) durch eine Ficoll-Dichtergradienten-Zentrifugation eine ausreichende Zahl von mononukleären Zellen isolieren (300-600 Millionen Zellen), so dass Experimente damit möglich waren. Eine vergleichbare Menge von mononukleären Blutzellen konnte in den Versuchen zum Cokultur-Modell der vorliegenden Arbeit gewonnen werden.

Über eine Cokultur von mononukleären Blutzellen und endometrialen Zellen des Uterus wurde bisher in der Literatur nicht berichtet. Auch über sonstige Cokulturen von mononukleären Blutzellen und anderen Gewebezellen gibt es nur wenige Arbeiten. So z.B. konnte gezeigt werden, dass Monozyten, die zu einer Cokultur von Endothelzellen der humanen Aorta mit glatten Muskelzellen dazugegeben wurden, einen signifikanten Anstieg in der Fibronectin- und Kollagenproduktion induzierten. Des Weiteren erwies sich der Anstieg von mRNA des gap-junction-Proteins Connexin43 als Resultat der Interaktion zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Navab et al., 1991). In der eben genannten Arbeit wurde festgestellt, dass die Cokultur von Endothelzellen und glatten Muskelzellen einen deutlichen Anstieg in der Produktion von Fibronectin, Kollagen und Connexin43 mRNA bewirken, verglichen mit der Produktion dieser Matrixkomponenten bei getrennter Kultivierung dieser Zellen. Eine In-vitro-Cokultur zwischen Zellen, die in vivo in enger nachbarschaftlicher Beziehung stehen, stellt also an sich schon eine gute Annäherung an die natürlichen Verhältnisse dar. Werden nun zu dieser Cokultur von Endothelzellen der Aorta und glatten Muskelzellen humane Monozyten dazugegeben, steigt die Fibronectin Produktion 22-fach und die Collagen Produktion 1,9-fach im Vergleich zur Cokultur allein. Der Anstieg für Connexin43 mRNA betrug das 2,8-fache bei Zugabe von Monozyten zu der Cokultur. Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit hin, dass Monozyten die direkte zelluläre Kommunikation verbessern und damit den Anstieg verschiedener Matrixkomponenten bewirken.

In der Studie von Antonelli-Orlidge et al. (1989) ergaben sich Hinweise, dass die Cokultur zwischen kapillaren Endothelzellen mit Perizyten ebenso wie die Cokultur zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand das Wachstum der kapillaren Endothelzellen hemmen. Der Mediator dieser Hemmung ist der aktivierte Transformations-Wachstumsfaktor- β (TGF- β), der im Medium der Cokultur dieser beiden Zellarten zu finden ist. Werden die oben genannten Zellarten getrennt voneinander kultiviert, wird im Überstand eine inaktive Form des TGF- β beobachtet, die nicht zu einer Hemmung des Endothelzellenwachstums führt. Fügt man nun Antikörper gegen TGF- β dem Medium der Cokultur hinzu, wird diese Hemmung wieder aufgehoben. Somit zeigen die Ergebnisse, dass TGF- β in seiner

aktiven Form, wie es in der Cokultur dieser Zellen vorkommt, sehr wahrscheinlich von einem Mechanismus aktiviert wird, der Kontakt zwischen den beiden Zelltypen erfordert.

Nakayama et al. (2002) entdeckten, dass humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes die Ausbreitung und Invasion des Mausembryos *in vitro* hemmen. Daraus wurde die Vermutung abgeleitet, dass Immunzellen auch auf die Embryoimplantation in irgendeiner Form eine Auswirkung haben.

In der Studie von Kosaka et al. (2003) stellte sich heraus, dass humane Chorionkarzinomzellen, die Blastozysten imitieren (BeWo-Zellen), in signifikant höherem Maße an endometriale Epithelzellen binden, wenn diese von Endometrien der mittleren Sekretionsphase stammen - verglichen mit Zellen aus anderen Zyklusabschnitten. Diese Feststellung deckt sich mit der Vorstellung des so genannten Implantationsfensters¹, entsprechend dem 20.-24. Zyklustag (Lessey, 2000), in dem die Rezeptivität des Endometriums für den Embryo besonders hoch ist. Nach der Cokultur von endometrialen Epithelzellen mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes konnte die Anzahl der angehefteten BeWo-Zellen an Epithelzellen der späten Proliferationsphase und frühen Sekretionsphase signifikant erhöht werden. Diese funktionelle Veränderung der endometrialen Epithelzellen, die durch mononukleäre Blutzellen induziert wurde, legt die Vermutung nahe, dass die endometriale Rezeptivität auch durch Immunzellen mitreguliert wird. Die Ergebnisse der Arbeit von Kosaka et al. weisen außerdem darauf hin, dass endometriale Zellen, die das Implantationsfenster noch nicht erreicht haben, durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes so beeinflusst werden können, dass sie die für die Implantation nötige Rezeptivität schneller erreichen bzw. den Rezeptivitätszeitraum verlängern. Es wäre also denkbar, dass die intra-luminale Zugabe von mononukleären Blutzellen in der frühen Sekretionsphase eine neue Behandlungsmethode für Infertilität darstellen könnte. Wobei für diese Therapie die Möglichkeit einer schädigenden Wirkung der mononukleären Blutzellen für den Embryo zunächst ausgeschlossen werden muss (Kosaka et al., 2003). In die gleiche Richtung gehen die Ergebnisse der Studien von Takabatake et al. (1997) und Fujita et al. (1998), die nachwiesen, dass T-Lymphozyten die endometriale Differenzierung fördern und die Embryoimplantation bei Mäusen induzieren. Auch hier wurde der Vorschlag unterbreitet, die lokale Administration von autologen mononukleären Blutzellen als möglichen Therapieansatz für Patienten mit rezidivierendem Implantationsversagen in Betracht zu ziehen.

¹ Laut Psychus (1993) wird das Implantationsfenster vom 19. bis zum 20. Tag des menstruellen Zyklusses definiert.

5.5 Zytokinstimulation

Die Stimulation endometrialer Zellen mit verschiedenen Zytokinen in der vorliegenden Arbeit ist der Versuch, die In-vivo-Verhältnisse nachzuahmen. Nicht außer Acht zu lassen ist der Umstand, dass innerhalb des vitalen Endometriums eine Vielzahl dieser Botenstoffen anwesend sind und sich gegenseitig beeinflussen bzw. in gegenseitiger Abhängigkeit das funktionelle Geschehen im Uterus bewirken. Laut Tovey et al. (1988) wurde die mRNA der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 in hohen Konzentrationen in Milz, Leber, Nieren und Leukozyten des peripheren Blutes von gesunden Individuen gefunden. Das weist darauf hin, dass diese Zytokine wahrscheinlich in sehr engem Zusammenspiel als Regulatoren von Zellwachstum und Zellfunktion von normalem Gewebe gemeinsam beteiligt sind. Folglich könnte dies auch für das Endometrium der Gebärmutter der Fall sein. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Studie die Auswahl für die Stimulation mit Zytokinen zugunsten von TNF- α , IL-1 β und IL-6 getroffen.

5.5.1 TNF- α

Die Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF) ist eine Gruppe von Molekülen, die alle zu den Typ-II-Transmembranproteinen gehören. TNF- α , der Prototyp dieser Ligandenfamilie, ist ein vielseitiger Faktor, der eine Reihe von Merkmalen aufweist. Dazu gehören proinflammatorische, zytotoxische und immunmodulatorische Eigenschaften sowie die Fähigkeit, Apoptose an einer großen Zahl von verschiedenen Zellen zu induzieren (Tabibzadeh, 1991b, 1994a). TNF- α wird als Membran gebundenes Prohormon synthetisiert, um dann proteolytisch gespalten zu werden, wobei ein Teil der Polypeptide des reifen Proteins mit der Membran verbunden bleibt (Jue et al., 1990). Die Gene für die beiden Rezeptoren von TNF- α , TNFR1 und TNFR2, sind auf den humanen Chromosomen 12 und 1 gefunden worden (Milatovich et al., 1991). Die biologische Wirkung induziert TNF- α durch Interaktion mit beiden Rezeptoren. Welcher der beiden Rezeptoren jedoch für die jeweilige Wirkung von TNF- α verantwortlich ist, wird noch debattiert (Heller et al., 1992; Tartaglia et al., 1993a, 1993b). Manche Wissenschaftler sind der Meinung, dass die Wechselwirkung von TNF- α mit beiden seiner Rezeptoren Apoptose induzieren kann (Mangan und Wahl, 1991; Grell et al., 1994). Innis et al. (1992) wiesen nach, dass der antiproliferative Effekt von TNF- α auf

neoplastische endometriale Epithelzellen von seiner Dosis abhängig ist. Diese Wirkung wurde durch den Rezeptor TNFR1 und nicht durch TNFR2 ausgelöst.

Das Endometrium ist umgeben von Leukozyten, die zur Produktion von verschiedenen Zytokinen fähig sind - unter anderem auch TNF- α (Morris et al., 1985; Marshal and Jones, 1988). Die mRNA und das Protein von TNF- α wurden im Endometrium gefunden und beide werden während der Sekretionsphase des Menstrationszykluses verstärkt exprimiert bzw. sezerniert (Hunt et al., 1992; Tabibzadeh et al., 1994b, 1995b). Sowohl mit Westernblot als auch durch immunhistochemische Methoden konnte eine Zunahme der beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 im humanen Endometrium in Abhängigkeit vom menstruellen Zyklus nachgewiesen werden (Tabibzadeh et al., 1995b). Diese Studien weisen demzufolge darauf hin, dass eher die Menge an TNF- α für die zyklischen Änderungen im Menstrationszyklus verantwortlich ist als die Expression einer der beiden TNF- α -Rezeptoren. Gemäß Tabibzadeh et al. (1994b) hemmt TNF- α außerdem die Proliferation in endometrialen Epithelzellen und induziert Apoptosis. Dieser von TNF- α induzierte Zelltod, weist die charakteristischen morphologischen Änderungen von Apoptosis und Fragmentation der DNA in oligonucleosome Fragmentabschnitte auf. Tabibzadeh et al. (1993) bestätigten ferner, dass tatsächlich TNF- α und nicht andere Zytokine wie z.B. IL-1 α , Interferon gamma oder IL-6 die epitheliale Dyscohesion, also das Aufbrechen der Zell-zu-Zell-Bindungen induzieren.

In der Studie von Goldblum et al. (1993) ergaben sich Hinweise, dass TNF- α die Form der Zelle sowie das Zytoskelett verändert und eine Konversion der F-Aktin-Filamente in G-Aktin-Filamente induziert. Da laut Luna et al. (1992) Aktin an der Zell-zu-Zell-Bindung beteiligt ist, könnte diese Umwandlung von F- in G-Aktin teilweise für den Verlust der Zell-Bindungen verantwortlich sein, sowie auch für die erhöhte Endothelpermeabilität.

Andere Studien weisen darauf hin, dass TNF- α die vaskuläre Integrität beeinträchtigt. Ursprünglich wurde TNF- α als Coley's Toxin oder Cachectin beschrieben und war für seine Fähigkeit, hämorrhagische Nekrose in Tumorzellen zu induzieren, bekannt (Old, 1985). Der zerstörende Effekt von TNF- α auf das Endothel scheint aber nicht auf Tumoren beschränkt zu sein, sondern wird auch im Endothel von verschiedenen gesunden Gewebezellen einschließlich des Endometriums beobachtet. Nach Tracey et al. (1986) kommt es nach Injektion von recombinantem TNF- α zu Schock und Beschädigung des Gewebes.

Remick et al. (1994) stellten im Lungengewebe von mit TNF- α behandelten Tieren Ödeme sowie ein Leck von Thrombozyten und roten Blutkörperchen fest. Genauere Untersuchungen dieser Gewebe zeigten eine ausgedehnte Blasenbildung der luminalen Oberfläche des

Endothels sowie die Bildung von Vakuolen im Zytoplasma. Diese Veränderungen waren gleichzeitig mit einem signifikanten Verlust von Gewebeflüssigkeit aus dem vaskulären Raum verbunden. Die Ergebnisse der Studie von Claudio et al. (1994) wiesen die Beeinträchtigung der Blut-Retina-Schranke durch TNF- α und damit die Induktion von retinaler Hämorrhagie nach.

Das Endothel von Mäuseuteri war ebenfalls sensibel für schädigende Effekte durch TNF- α . Nach Injektion von TNF- α , traten Hämorrhagie und Apoptose im Uterus von Mäusen auf. Außerdem wurde beobachtet, dass Interferon (IFN)- γ synergistisch zu TNF- α wirkt. Es kam zu einer verstärkten Schädigung des Endothels in Uterus, Knochenmark, Leber, Lunge und Gastrointestinaltrakt, wenn TNF- α zusammen mit IFN- γ appliziert wurde (Shalaby et al., 1989). Dieser Synergismus mit TNF- α konnte auch bei anderen Zytokinen wie z.B. IL-1 (Waage et al., 1988) und IL-2 (Dubinett et al., 1994) nachgewiesen werden.

Das Antiphospholipidsyndrom (APS) ist charakterisiert durch rezidivierende Fehlgeburten, intrauterine Wachstumsretardierung und vasculäre Thrombose. In der Studie von Berman et al. zeigte sich, dass humane APS-Antikörper nach Übertragung in schwangere Mäuse spezifisch das Dezidua-Gewebe ansteuern und zu einer raschen Zunahme des dezidualen und systemischen TNF- α -Spiegels führen. Des Weiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass eine Blockade von TNF- α in mit APS-Antikörpern behandelten schwangeren Mäuse die Abortrate um 50% senkte, was auf eine wichtige Rolle von TNF- α im Ablauf einer Fehlgeburt hinweist (Berman et al., 2005).

Ein weiterer Aspekt in der Betrachtung des Zytokins TNF- α ist die Feststellung, dass die schrittweise Steigerung der Sekretion von TNF- α in der zweiten Hälfte des menstruellen Zykluses von Steroidhormonen reguliert wird. In mononukleären Zellen des humanen peripheren Blutes wurde sowohl die Expression von TNF- α -mRNA (Loy et al., 1992) als auch die Sekretion von TNF- α (Ralston et al., 1990) durch Östradiol gehemmt. Die Arbeitsgruppe um Roby (1994) untersuchte die Regulation der TNF- α Genexpression durch Steroide im Endometrium von Mäusen. Eine Ovariectomie der Mäuse führte nach sieben Tagen zu einem Verlust der TNF- α -mRNA und der Proteinexpression im Endometrium. Die Zugabe von 17- β -Östradiol, Progesteron oder Östradiol plus Progesteron bewirkte eine erneute Expression von TNF- α -mRNA und -Proteinsekretion in Epithel- und Stromazellen des Mäuseendometriums. Die Expression der TNF- α -mRNA im Mäuseendometrium nach Zugabe von Östradiol war triphasisch. Eine Stunde sowie 6 Stunden nach Hormonzugabe wurde die mRNA in den Epithelzellen festgestellt, nach 24 Stunden verschwand die mRNA

wieder und war 72 Stunden später erneut in Epithel- und Stromazellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von Progesteron bzw. die gleichzeitige Zugabe beider Steroidhormone eine zeitliche Verlängerung der TNF- α -mRNA (Roby et al., 1994). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von TNF- α -mRNA bzw. die Sekretion von TNF- α mit den Steroidhormonen des Endometriums in Verbindung stehen. Allerdings sind diese Regulationsmechanismen noch nicht eindeutig bestimmt. Vor allem wenn man bedenkt, dass das Maximum der TNF- α -Sekretion in der zweiten Zyklushälfte beobachtet wird, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die systemische Menge an Steroidhormonen besonders niedrig ist. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die TNF- α -mRNA sowie die Proteinsekretion nicht nur durch die Anwesenheit von Steroidhormonen beeinflusst werden sondern auch durch Hormonentzug. Gemäß der Studie von Tabibzadeh et al. (1999) erfolgt die maximale Expression von TNF- α -mRNA am Ende des menstruellen Zykluses, wenn die Serumkonzentration von Östradiol abnimmt. Damit ergibt sich eine positive Regulation der TNF- α -mRNA durch Östrogen-Entzug.

Aus Zellkultur-Experimenten von Laird et al. (1996) ging hervor, dass Progesteron und Östradiol eine Zunahme in der TNF- α Produktion im proliferativen Endometrium bewirken, wobei beide Hormone zu einer Produktionsabnahme von TNF- α im sekretorischen Endometrium führen. In Untersuchungen an endometrialen Gewebeproben und Uterussekret von postmenopausalen Frauen wurde bei vier von sieben Proben sehr hohe TNF- α Konzentrationen mittels Immunhistochemie und ELISA beobachtet (von Wolff et al., 1999). Diese Ergebnisse wären nicht möglich, wenn die Regulation von TNF- α ausschließlich von Steroidhormonen abhängig wäre. Andererseits gibt es auch Studien bei Mäusen, die überhaupt keine Reaktion der TNF- α Gene auf Steroidhormone ergaben (Mc Master et al., 1992; Kover et al., 1995).

Von Wolff et al. (1999) konnten die zyklische Änderung von TNF- α innerhalb des menstruellen Zykluses ebenfalls bestätigen. Mittels drei verschiedener Techniken (Immunhistochemie, semiquantitative RT-PCR und ELISA) wurde dabei festgestellt, dass TNF- α -mRNA- und -Proteinexpression zu Beginn und am Ende des menstruellen Zykluses relativ gering ist und in der mittleren und späten Proliferationsphase sowie in der frühen bis mittleren Sekretionsphase die höchste Konzentration aufweisen. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der zyklischen TNF- α -Expression ergaben auch die Studien von Laird et al. (1996). Es wäre denkbar, dass TNF- α in der Sekretionsphase nicht nur im Endometrium sondern auch bei der Präimplantation des Embryos mitwirkt und damit zu einer erfolgreichen Implantation

führt. Die Stimulation der Prostaglandin-Freisetzung in Endometriumzellen durch TNF- α wurde von Chen et al. (1995) beschrieben. Die gesteigerte vaskuläre Permeabilität durch Prostaglandine könnte einen Effekt auf die Implantation haben (Peek et al., 1992). Die Wirkung von endometrialem TNF- α auf die Präimplantation ist nur möglich, wenn die Blastozyste TNF- α -Rezeptoren exprimiert. Diese Rezeptorexpression in humanen Embryos wurde in der Studie von Sharekey et al. (1995) belegt. Die Funktion von TNF- α bei der Präimplantation ist jedoch noch nicht ganz klar. Bezüglich des morphologischen Wachstums konnte kein signifikanter Effekt von TNF- α auf die Blastozystenformation (Wincek et al., 1991) bzw. auf die nachfolgende Implantation (Haimovici et al., 1991) nachgewiesen werden. Pampfer et al. (1994) haben den selektiven Effekt von TNF- α in Maus-Blastozysten studiert und stellten eine Reduktion der inneren Zellmasse fest, was für einen hemmenden Effekt des TNF- α auf den Präimplantationsembryo spricht.

Insgesamt gesehen weisen alle diese Studien darauf hin, dass TNF- α eine wichtige Rolle innerhalb des Endometriums bzw. für das Implantationsgeschehen einnimmt. Trotz der zahlreichen Studien zu diesem Thema, sind nach wie vor einige Fragen zu TNF- α offen.

5.5.2 IL-1 β

Interleukin-1 (IL-1) ist eine Familie von Polypeptiden bestehend aus zwei Agonisten, IL-1 α und IL-1 β sowie einem Inhibitor, dem IL-1 Rezeptor-Antagonist IL-1ra (Dinarello et al., 1988). IL-1 wird von Makrophagen und anderen Zelltypen gebildet und hat eine Vielzahl von biologischen Aufgaben. Bisher wurden zwei Rezeptoren des IL-1 Systems identifiziert und als Typ I (IL-1R tI) und Typ II (IL-1R tII) bezeichnet (Sims et al., 1988; Horuk et al., 1989). Sowohl IL-1 Agonisten als auch der Antagonist binden an den IL-1R tI und triggern Signalantworten in den Zielzellen (Dower et al., 1986; Mizel et al., 1989). Der Typ II Rezeptor kommt in vielen Zellen vor, aber hauptsächlich in Neutrophilen, Monozyten und B-Lymphozyten (Horuk et al., 1989). Nach Simon et al. (1994) und Kariya et al. (1991) existiert das IL-1 System auch im humanen Endometrium. Außerdem wurde es in der humanen Oozyte und dem Embryo aller Entwicklungsstadien nachgewiesen (De los Santos et al., 1996; 1998). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass das IL-1 System eine wichtige Rolle bei der Embryo-Implantation und Dezidualisation der Stromazellen spielt.

IL-1 gilt als wichtiger Stimulator der IL-6-Produktion in Immunzellen und einer Reihe von anderen Zelltypen (Yamaguchi et al., 1990; Perlstein et al., 1991). Auch die Stimulation der IL-6-Sekretion und der IL-6-mRNA in endometrialen Stromazellen durch IL-1 wurde belegt (Semer et al., 1991; Tabibzadeh et al., 1991b).

Die Mitwirkung von IL-1 an endometrialen Funktionen ist das Thema verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten. Kauma et al. (1990) entdeckten z.B., dass die Menge an IL-1-mRNA im Endometrium während der Sekretionsphase des menstruellen Zykluses ansteigt und Cannon et al. (1985), dass dies auch für den Spiegel von IL-1 im Serum gilt. Es wird angenommen, dass die Quelle für IL-1 die Monozyten und Makrophagen des Endometriums sind. IL-1 könnte jedoch auch von den Stromazellen der Dezidua produziert werden. Die Beteiligung von IL-1-Rezeptoren in Epithel- sowie in Stromazellen des Endometriums wiesen Tabibzadeh et al. (1991b) nach. Kariya et al. (1991) und Van Le et al. (1992) stellten fest, dass IL-1 das Wachstum von Stromazellen und die Dezidualisation hemmt. Gemäß der Studie von Haimovici et al. (1991) hemmt IL-1 β außerdem die Einnistung der Blastozyste in vitro.

Simon et al. (1994) kamen zu dem Ergebnis, dass wiederholte Injektionen des IL-1-Rezeptor-Antagonisten in schwangere Mäuse - beginnend zwei Tage vor der angenommenen Implantation - die Einnistung der Blastozyste verhindert. Der Mechanismus, wodurch diese Hemmung geschieht, ist noch unklar. Es wird jedoch angenommen, dass IL-1ra die Embryo-Implantation mittels eines direkten Effekts durch Mikrovilli im Mäuse-Endometrium verhindert (Simon et al., 1998).

Nach Stimulation von humanen Stromazellen mit IL-1 β für 24 und 48 Stunden wurden in der Studie von Huang et al. (2001) die intrazellulären Protein-Level von IL-1 β und IL-1ra gemessen. Dabei ergaben sich Hinweise, dass die mRNA von IL-1 β und IL-1ra hochreguliert wird und die mRNA von IL-1R α gehemmt wird, und zwar in einer von IL-1 β dosisabhängigen Weise. Das quantitative Verhältnis zwischen IL-1 β und IL-1ra blieb dabei konstant (Huang et al., 2001). Auch diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass IL-1 β durch Regulation der Expression von IL-1 β und IL-1ra in Stromazellen an der embryo-maternalen Interaktion beteiligt ist.

Eine Störung dieser embryo-maternalen Interaktion tritt im Falle einer Präeklampsie ein. Die Studie von Lockwood et al. (2006) stellte einen deutlichen Anstieg von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) in humanen Deziduazellen von präeklampsischen Plazentas nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α fest. Schon eine geringe Stimulationsmenge von 0,01 ng/ml IL-1 β oder TNF- α hatte eine 15-fache Steigerung von MCP-1 zur Folge. Die Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β oder TNF- α führte zu einem 103-fachen bzw. 83-fachen

MCP-1-Anstieg. In den präeklampsischen Deziduazellen wurde ein signifikanter Anstieg von Makrophagen (CD68+) festgestellt, wobei MCP-1 als wichtiger Faktor für die Monozyten/Makrophagen Rekrutierung angesehen wird. Da Makrophagen selbst eine Quelle für IL-1 β und TNF- α sind, wird vermutet, dass IL-1 β und TNF- α bei der Entstehung der Präeklampsie eine Rolle spielen (Lockwood et al., 2006). In ähnliche Richtung weisen die Ergebnisse der Studie von Huang und Kollegen, derzufolge eine Stimulation von humanen Deziduazellen im ersten Schwangerschaftsdrittel mit IL-1 β die Monozyten-Migration begünstigt und die Sekretion von Monozyten/Makrophagen-aktivierenden chemotaktischen Zytokinen induziert (Huang et al., 2006). Auch im Bereich der In vitro Fertilität scheint IL-1 β von Bedeutung zu sein. Im Vergleich zu fruchtbaren Frauen wurden in Uterusspülungen von Patientinnen mit rezidivierendem Implantationsversagen signifikant höhere IL-1 β -Konzentrationen gemessen (Inagaki et al., 2003).

Laut Tabibzadeh et al. (1990) bewirkt IL-1 β die Freisetzung von Prostaglandinen in humanen Epithelzellen des Endometriums. Pierro et al. (2003) stellten fest, dass die Zugabe von IL-1 β zu endometrialen Epithelzellen eine geringe Steigerung der β_3 -Integrin-Expression bewirkt. Aufgrund dieser oben genannten Ergebnisse aus verschiedenen Studien kann also angenommen werden, dass IL-1 β sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Endometrium und während des Implantationsgeschehens spielt.

5.5.3 IL-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin mit unterschiedlichen biologischen Aufgaben wie z.B. der Regulierung von Hämatopoese, Teilnahme an der Akute-Phase-Immunreaktion sowie der Mitwirkung an Proliferation und Funktion von B- und T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen (Van Snick, 1990). Außerdem synthetisieren auch Fibroblasten und Keratinozyten IL-6 (Van Snick, 1990). Die Synthese von IL-6 durch Epithelzellen wurde im menschlichen Thymus (Le et al., 1990) und im Gastrointestinaltrakt (Shirota et al., 1990) entdeckt. Immunreaktionen, vor allem der Akuten Phase, mittels IL-6 konnten in der Leber, dem neuronalen System und in den Osteoklasten festgestellt werden (Sehgal et al., 1995; Manolagas et al., 1995).

IL-6-Protein und IL-6-mRNA lassen sich auch im humanen Endometrium finden. Humane Trophoblastzellen synthetisieren IL-6 und IL-6-Rezeptoren (Nishino et al., 1990). Die Studie von Tabibzadeh et al. (1989) hat nachgewiesen, dass die Expression der IL-6-mRNA im humanen Endometrium durch Östrogen gehemmt wird. Eine transiente Expression von IL-6-mRNA in Endothelzellen der Decidua basalis tritt während der Schwangerschaft bei Mäusen auf (Motro et al., 1990).

Laut Robertson et al. (1992) scheinen die Epithelzellen die wichtigste Quelle für IL-6 im Endometrium zu sein. Dennoch sind Epithelzellen nicht die einzige Quelle, da Robertson und Kollegen des weiteren herausfanden, dass auch Leukozyten und Fibroblasten aus Stromazellen zur IL-6-Bildung beitragen, vor allem nach der Paarung und während einer Schwangerschaft bei Mäusen. Damit stimmen diese Ergebnisse mit denen von Tabibzadeh et al. (1989) überein, in deren Studie die Synthese von IL-6 in humanen endometrialen Stromazellen nachgewiesen wurde.

Der Rezeptor für IL-6 ist während des gesamten menstruellen Zykluses in den Drüsenzellen des endometrialen Epithels nachweisbar (Tabibzadeh et al., 1995a). Dabei ändert sich seine Expression während des gesamten Zykluses nicht. Das Protein gp 130, das als Signalgeber für das Zytokin IL-6 am Rezeptor fungiert, wurde ebenfalls in den Drüsenzellen des Epithels festgestellt. Seine Immunreaktivität nimmt während der Menstruation ab und bleibt in der übrigen Zeit des weiblichen Zykluses konstant. Die Stromazellen exprimieren ebenfalls beide Proteine – IL-6-Rezeptor und gp 130 – jedoch in geringerer Menge als die Epithelzellen. Die eben genannte Studie von Tabibzadeh et al. belegte außerdem, dass IL-6 selbst eine Änderung während der Zyklusphasen erfährt: Während der Proliferationsphase wird IL-6 nur sehr schwach exprimiert und steigt während des Implantationsfensters deutlich an. Die Menge an

immunoreaktivem IL-6 im Epithel steigt während der mittleren und späten Sekretionsphase kontinuierlich weiter. Während der mittleren Sekretionsphase zeigten auch die Stromazellen der oberen Funktionalis eine Immunoreaktivität für IL-6. In der späten Sekretionsphase war keine Immunoreaktivität für IL-6 in den Stromazellen messbar (Tabibzaeh et al., 1995a).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studie von von Wolff und Kollegen. Darin wurde ebenfalls die geringe Expression von IL-6-mRNA in Epithel- und Stromazellen während der Proliferationsphase und die kontinuierliche Steigerung in der mittleren und späten Sekretionsphase festgestellt. Die mRNA-Expression des IL-6-Rezeptors und des Proteins gp130 blieb hingegen während des gesamten menstruellen Zykluses konstant (von Wolff et al., 2002a).

Diese zyklusabhängige Expression von IL-6 im humanen Endometrium, beinhaltet die Möglichkeit, dass dieses Zytokin eine wichtige Rolle bei den Veränderungen des Endometriums spielt, die das Gewebe für Menstruation, Implantation und den weiteren Schwangerschaftsverlauf vorbereiten. Darauf weisen auch zwei Studien bezüglich eines gestörten Schwangerschaftsverlaufs hin: Jasper und Kollegen entdeckten, dass im Endometrium von Patientinnen mit habituellen Aborten die IL-6-mRNA reduziert exprimiert wurde (Jasper et al., 2007) und in Patientinnen mit Präeklampsie zeigte sich eine signifikant höhere immunhistochemische Färbung für IL-6 in Deziduazellen als in gesunden Plazentas gleichen Schwangerschaftsalters (Lockwood et al., 2008).

5.6 Regulation von IL-6

Epithel- und Stromazellen des Uterus bei Mäusen sind in der Lage, das Zytokin IL-6 zu produzieren. Seine Sekretion wird einerseits von Steroidhormonen und andererseits durch zelluläre Interaktion reguliert. Da die Induktion von Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen durch IL-6 eine Hemmung der Blastozysten-Implantation bewirkt, scheint IL-6 mittels autokriner oder parakriner Kommunikation an der Embryo-Implantation beteiligt zu sein (Jacobs et al., 1992).

Laut Gutsche und Kollegen führt die Stimulation mit Seminalplasma zu einer Steigerung der IL-6-Expression in Epithelzellen. Dieser Effekt lässt sich zumindest teilweise auf IL-8 und TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) zurückführen, die beide reichlich im Seminalplasma zu finden sind (Gutsche et al., 2003).

Die Hemmung von IL-6 durch Östrogene legt den Schluss nahe, dass die hormonelle Kontrolle dieses Prozesses zumindest zum Teil durch Modulation der lokalen Zytokinproduktion beeinflusst wird. Die niedrigen Konzentrationen von IL-6 in der Proliferationsphase des Endometriums, wie sie bei Tabibzadeh et al. (1995a) beschrieben wurden, könnten demzufolge mit der erhöhten Konzentration von Östradiol in diesem Abschnitt des weiblichen Zykluses zusammenhängen. Auf der anderen Seite könnten die progressive Zunahme von IL-6 im Epithel der Sekretionsphase und seine Erscheinung in Stromazellen (Tabibzadeh et al., 1995a) in Zusammenhang mit der schrittweisen Abnahme der Östradiolkonzentration im Endometrium stehen.

Die Studie von Makkar und Kollegen stellte einen negativen Einfluß von hohen Östradiol-Spiegeln auf die IL-6-Expression im Endometrium fest. Die Ergebnisse beziehen sich auf sogenannte „excessive responders“ bei IVF-Patientinnen mit mehr als 20.000 pmol/l Östradiol-Ausschüttung nach HCG-Stimulation. In Endometriumsbiopsien zeigte sich dabei eine signifikant geringere immunhistochemische Färbung für IL-6 in Epithelzellen von „excessive responders“ im Vergleich zu den zwei Kontrollgruppen unstimulierter Patientinnen bzw. zu „moderate responders“, also Patientinnen mit weniger als 20.000 pmol/l Östradiol-Ausschüttung nach HCG-Stimulation (Makkar et al., 2006).

Das negative Feedback des Östrogens auf die Produktion von endogenem IL-6 ist ein sehr wichtiger Regulator der physiologischen Homöostase. Die Störung dieser Regulation durch Östrogenmangel wie z.B. bei postmenopausalen Frauen, wird als einer der wichtigsten Gründe für die ungehemmte IL-6-Produktion in der Postmenopause und damit als einer der wichtigsten Gründe für die beschleunigte Osteoporose angesehen (Jilka et al., 1992). In der

Tat hemmt Östrogen die Produktion von IL-6 in den Osteoblasten und den Stromazellen des Knochenmarks (Jilka et al., 1992). Obwohl das Anti-Östrogen Tamoxifen ähnliche Aktivität wie Östrogen im Endometrium zeigt, stellte es sich als ineffektiv in der Hemmung von IL-6 heraus. Daraus lässt sich folgern, dass die adjuvante Tamoxifen-Therapie bei Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom in postmenopausalen Frauen den systemisch erhöhten IL-6-Spiegel nicht vermindert, was als Osteoporoseanreiz bei diesen Patientinnen gilt (Manolagas et al., 1995). Gemäß der Studie von Laird et al. (1994) bewirkt IL-1 einen dosisabhängigen Anstieg der IL-6-Produktion in Epithelzellen von proliferativem und sekretorischem Endometrium. Allerdings reagierten die Zellen des sekretorischen Endometriums wesentlich sensibler auf die IL-1-Stimulation als die Zellen des proliferativen Endometriums. In sekretorischen Endometriumszellen kam es schon bei einer Stimulation mit 0,025 ng/ml IL-1 zu einem signifikanten IL-6-Anstieg, und zwar um den Faktor 10. Im Vergleich dazu sprachen Zellen des proliferativen Endometriums erst auf eine Stimulation mit höheren IL-1-Konzentrationen an (2,5 ng/ml) und erreichten nur doppelte IL-6-Werte im Vergleich zu der basalen IL-6-Produktion der proliferativen Zellen. Dennoch erwies sich die tatsächliche Menge an IL-6 in proliferativen Endometriumszellen 1,5- bis 2-mal höher als die Menge an IL-6, die von IL-1 stimulierten Endometriumszellen in der Sekretionsphase produziert wurde (Laird et al., 1994). Diese Stimulation der Epithelzellen durch IL-1 β bezüglich der IL-6-Sekretion konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden, dafür aber eine dosisabhängige Stimulation von IL-6 in Stromazellen durch IL-1 β , die zu einer Steigerung von IL-6 um den Faktor 2 bis 10 führte. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, dass in der Publikation von von Wolff et al. (2002b) eine Reduktion der IL-6-Produktion bei Stromazellen durch Verwendung von „magnetic beads“¹ berichtet wird. Eine solche Reinigung der endometrialen Zellen von kontaminierenden Immunzellen wurde bei den Experimenten für die vorliegende Arbeit nicht durchgeführt und ist auch in den Studien von Laird et al. (1994) nicht beschrieben.

Simon et al. (1993) stellten fest, dass die Expression des IL-1-Rezeptors in der frühen Sekretionsphase des menstruellen Zykluses erhöht ist. Dies könnte eine Erklärung für die erhöhte Sensibilität der Zellen des sekretorischen Endometriums auf die Stimulation mit IL-1 in der Arbeit von Laird et al. (1994) sein.

Laut der Studie von Zarmakoupis et al. (1995) ist IL-6 ein Mediator zur Regulation der Wachstumsrate von endometrialen Stromazellen in vitro. Im Vergleich zu den Kontrollzellen

¹ Unter „magnetic beads“ versteht man kleine magnetische Kugeln, die nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip verschiedene Zellen, Mikroorganismen, Proteine etc. mit Hilfe eines Magneten aus einer Zellansammlung herausfiltern können.

des Stromas, die eine gewisse Basismenge an IL-6 produzieren, werden die Stromazellen bei zusätzlicher Stimulation mit IL-6 in ihrem Wachstum gehemmt. Diese Hemmung ist sowohl von der IL-6-Dosis abhängig als auch von der Zelldichte der Stromazellen. Ferner wurde in der oben genannten Studie festgestellt, dass Stromazellen ebenso an der Zellmembran wie auch im Zytoplasma Rezeptoren für IL-6 exprimieren.

Jacobs et al. (1992) fanden heraus, dass die IL-6-Produktion in Stromazellen bei Mäusen durch IL-1 α oder andere Sekretionsprodukte der Epithelzellen moduliert wird.

Laird et al. (1993) haben nachgewiesen, dass Epithelzellen deutlich mehr IL-6 produzieren als Stromazellen - obwohl beide Zelltypen zur IL-6-Produktion fähig sind. Außerdem ist die Produktion in der proliferativen Phase des menstruellen Zykluses größer als zu einem späteren Zeitpunkt. Gegenteilig zeigen die Studien von Tabibzadeh und Kollegen (1995a) und von von Wolff et al. (2002a), dass die höchste IL-6-Menge in der mittlerern Sekretionsphase exprimiert wird. Des Weiteren stimulieren laut der Studie von Laird und Kollegen (1993) die Steroidhormone Östradiol und Progesteron die IL-6-Sekretion in Epithelzellen der Proliferationsphase und hemmen sie in Epithelzellen der späten Sekretionsphase. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen meiner Kollegin Frau C. Zepf, deren Untersuchungen ergaben, dass sowohl Östradiol als auch Progesteron in physiologischer und hoher Konzentration und auch die Kombination beider Hormone die IL-6-Sekretion von Epithelzellen der Sekretionsphase stimuliert (Zepf, 2003). Dagegen wurde laut der oben genannten Studie von Laird et al. (1993) die IL-6-Produktion in Stromazellen durch Zugabe von Steroidhormonen in jeder Phase des weiblichen Zykluses gehemmt. Darüber hinaus wurde in der Dissertation von Frau C. Zepf festgestellt, dass die Zugabe von Östradiol oder Progesteron in physiologischer Menge eine 1,75-fache Steigerung der IL-6-Sekretion von Stromazellen bewirkt (Zepf, 2003). Die Studie von von Wolff et al. bestätigt diese Ergebnisse jedoch nicht. Nach Reduktion der Kontamination mit Immunzellen durch „magnetic beads“ zeigte sowohl die Stimulation mit Östradiol, Progesteron oder der Kombination beider Hormone als auch der Entzug dieser Steroidhormone nach getrennter oder kombinierter Verabreichung keinen signifikanten Effekt auf die IL-6-Produktion endometrialer Zellen (von Wolff et al., 2002b).

Ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die die Stimulation von IL-6 in Stromazellen durch TNF- α und IL-1 β ergaben, hat Tabibzadeh et al. (1989) die Stimulation der IL-6-Sekretion in Stromazellen neben IL-6 und IL-1 β zusätzlich auch durch IL-1 α und Interferon-gamma (IFN- γ) festgestellt. Hinzukommend bestätigten Kohase et al. (1986; 1987), dass TNF- α und IL-1 β wirksame Induktoren für die In-vitro-Sekretion von IL-6 sind. Auch

hier muß darauf hingewiesen werden, dass alle eben genannten Studien, einschließlich dieser vorliegenden Arbeit keine Reduktion der Kontamination mit Immunzellen, z.B. durch „magnetic beads“, wie sie in der Publikation bei von Wolff et al. (2002b) beschrieben wird, durchgeführt haben. Die höhere IL-6-Sekretion in Stromazellen im Vergleich zu Epithelzellen nach Stimulation mit TNF- α , IL-1 β oder nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen in der vorliegenden Arbeit, aber auch nach Stimulation der Stromazellen mit IL-6, IL-1 β , IL-1 α oder IFN- γ in der Publikation von Tabibzadeh et al. (1989) könnte daher durch eine stärkere Kontamination der Stromazellen mit IL-6-produzierenden Immunzellen hervorgerufen worden sein. Um diesen Sachverhalt jedoch zufriedenstellend zu klären, wären vergleichende Experimente mit Epithel- und Stromazellen vor und nach einer Reinigung mit „magnetic beads“ nötig. Da allerdings eine solche Reinigung keine 100%ige Entfernung der Kontamination mit IL-6-produzierenden Immunzellen gewährleistet, müsste zusätzlich eine quantitative Analyse der verbleibenden Immunzellen im Durchflußzytometer durchgeführt werden. Dabei wäre es schwierig, Immunzellen, die sich z.B. fest im Zellverband befinden, zu berücksichtigen.

Nichtsdestominder weisen alle oben genannten Studien darauf hin, dass die Sekretion bzw. die Expression von IL-6 von einer Reihe anderer Zytokine beeinflusst wird und auch Steroidhormone in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass IL-6 eine zentrale Rolle in der Interaktion von Epithel- und Stromazellen spielt und damit entscheidend an der Regulation der intakten Endometriumsfunktion beteiligt ist.

5.7 Regulation von β_3

Integrine sind eine Familie von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche, chemisch gesehen Glykoproteine, die an verschiedenen physiologischen Prozessen des Körpers beteiligt sind. Dazu gehören die Embryogenese, Wundheilung, Immunreaktionen und Prozesse einiger malignen Geschehnisse (Albelda et al., 1990; Ruoslahti, 1991; Albelda et al., 1993). Die beiden Untereinheiten α und β , aus denen Integrine bestehen, werden in wissenschaftlichen Studien im Allgemeinen getrennt untersucht. Die α_v -Integrin-Untereinheit ist dafür bekannt, an verschiedene β -Untereinheiten assoziieren zu können und somit Integrine zu bilden, die z.B. Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Thrombospondin, von Willebrands Faktor und Osteopontin binden (Lawler et al., 1988; Cheresch et al., 1989; Bodary et al., 1990, Senger et al., 1996). Integrine konnten sowohl im Embryo (Sutherland et al., 1993) als auch im Endometrium (Lessey et al., 1992; Aplin et al., 1996) von Maus und Mensch zur Zeit der Implantation festgestellt werden.

β_3 ist eine Untereinheit des Vitronectin-Rezeptors $\alpha_v\beta_3$. Dieser Rezeptor enthält die Arg-Gly-Asp (RGD) Tripeptid-Einheit als Erkennungssequenz für seine Liganden (Lawler et al., 1988; Suehiro et al., 1996). Ein potentieller Ligand für β_3 ist z.B. Osteopontin. Lessey und Kollegen haben unter anderem festgestellt, dass die Expression von β_3 in humanen Epithelzellen des Endometriums ein zyklusabhängiges Phänomen ist und erst in der zweiten Zyklushälfte immunhistochemisch im Epithel nachgewiesen werden kann. Epithelzellen bis zur mittleren Lutealphase enthalten wenig bis überhaupt kein β_3 . Nach dem 19. Zyklustag kommt es zum plötzlichen Erscheinen dieses Integrins und zur weiteren Expression bis zum Ende des Zykluses. Außerdem belegte die oben genannte Studie, dass Endometriumsbiopsien von infertilen Frauen eine verspätete Expression von β_3 aufweisen. Des Weiteren hängt laut der Arbeitsgruppe von Lessey et al. eine verspätete Empfängnisbereitschaft des Endometriums mit dem Verlust der β_3 -Untereinheit zusammen und ist damit möglicherweise ein geeignetes Mittel zur Diagnostik für einen Defekt der lutealen Phase (Lessey et al., 1992).

Es wurde vorgeschlagen, den Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ als Unterscheidungsmerkmal zwischen empfängnisbereitem und nicht empfängnisbereitem Endometrium im klinischen Alltag einzusetzen (Lessey, 2000). Allerdings stellte die Arbeitsgruppe um Ordi fest, dass $\alpha_v\beta_3$ als Marker für die Rezeptivität des Endometriums wegen hoher Variabilität und schlechter Reproduzierbarkeit zwischen drei aufeinanderfolgenden Zyklen bei infertilen Patientinnen nicht zuverlässig geeignet ist (Ordi et al., 2003). Auch die Studie von Casals und Kollegen

zeigte ähnliche Ergebnisse: Im Vergleich von fruchtbaren und unfruchtbaren Patientinnen ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und Osteopontin sowie ihrer Coexpression feststellen. Diese Tatsache spricht gegen die klinische Signifikanz des Osteopontin- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinkomplexes als Marker für endometriale Rezeptivität (Casals et al., 2008).

In einer weiteren Studie fanden Lessey et al. (1994) heraus, dass eine Korrelation zwischen der aberrierenden Expression von β_3 und milder Endometriose besteht. Dies wäre gegebenenfalls eine Erklärung für die beeinträchtigte Fertilität bei Frauen mit Endometriose. Außerdem stellten Lessey et al. (1995) fest, dass Endometriumsbiopsien von Frauen mit primärer Infertilität eine signifikant reduzierte Expression von β_3 aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe der fruchtbaren Frauen eine konstante β_3 -Expression. Laut Navot et al. (1991) ist die Erfolgsrate von in vitro Fertilisation (IVF) vom Zeitpunkt des Embryotransfers abhängig, wobei die höchste Erfolgsrate um den 19. Zyklustag herum liegt.

Von Wolff et al. bestätigten die Ergebnisse von Lessey et al. und zeigten ebenfalls, dass die β_3 -Untereinheit in endometrialen Epithelzellen im Laufe der mittleren und späten Sekretionsphase stark anstieg, während sie in der Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase in Epithelzellen nicht nachzuweisen war. Die Stromazellen wiesen eine moderate immunhistochemische Färbung für β_3 sowohl während der Proliferationsphase als auch in der Sekretionsphase auf (von Wolff et al., 2001).

Laut Sutherland und Kollegen wird β_3 nach der Befruchtung in allen Entwicklungsstadien bis hin zum Postimplantationsstadium des Mausembryos (Zwei-Zell-Stadium, Acht-Zell-Stadium, frühe Blastozyste, späte Blastozyste) kontinuierlich exprimiert. Zusätzlich findet man β_3 auch in den Trophoblastzellen (Sutherland et al., 1993). Ähnliche Ergebnisse belegen, dass auch beim Menschen die Integrin-Untereinheit β_3 in der Oocyte und dem Präimplantations-Embryo - d.h. also während der gesamten Präimplantationsperiode - konstant exprimiert wird (Campbell et al., 1995). Des Weiteren zeigten Campbell et al. (1995), dass β_3 im humanen Synzytiotrophoblasten nicht aber im Zytotrophoblasten exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Korhonen et al. (1991), nach dessen Studie β_3 weder im Zyto- noch im Synzytiotrophoblasten vorkommt.

Die genauen Prozesse, durch die die Expression von β_3 im humanen Endometrium reguliert wird, sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Garcia et al. (1988) fanden heraus, dass eine maximale Abnahme der Progesteron-Rezeptoren im Endometrium um den 20. Zyklustag herum stattfindet. Die Epithelzellen der mittleren Lutealphase unterliegen also dynamischen

Veränderungen bezüglich ihrer Hormonantwort und stehen möglicherweise auch mit der zu diesem Zeitpunkt einsetzenden Expression von β_3 in Zusammenhang.

Nach Illera et al. führt eine funktionale Blockade des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zum Zeitpunkt der erwarteten Implantation durch intrauterine Injektion von neutralisierenden Antikörpern gegen die α_v - oder β_3 -Untereinheit zu einer reduzierten Implantationsrate bei der Maus. Diese Antikörper sind Peptide, die die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Peptide) oder auch das Anti-Integrin Echistatin enthalten (Illera et al., 2000).

Das HOXA10-Gen wird im humanen Endometrium in Epithel- und Stromazellen während des menstruellen Zykluses exprimiert. HOXA10 ist ein Transkriptionsfaktor, der in geringer Menge in der Proliferationsphase exprimiert wird und dessen Expression während der mittleren Sekretionsphase und vor allem zum Zeitpunkt der Implantation stark ansteigt (Taylor et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Daftary hat festgestellt, dass β_3 ein Zielmolekül der HOXA10-Regulation ist und sowohl HOXA10 als auch β_3 zum Zeitpunkt der Embryoimplantation im gesunden Endometrium in großer Menge exprimiert werden. Bisher konnte keine direkte Regulation der β_3 -Integrin-Expression durch Östrogen oder Progesteron nachgewiesen werden (Lessey et al., 1992). Laut Daftary und Kollegen wurde in HOXA10-defizienten Endometriumzellen eine statistisch signifikante 10-fache Abnahme der exprimierten β_3 -Untereinheit nachgewiesen. Außerdem konnte eine Steigerung der β_3 -mRNA durch eine überschüssige Expression von HOXA10 gezeigt werden und eine Abnahme von β_3 nach Zugabe von Antikörpern gegen HOXA10 (Daftary et al., 2002). Das HOXA10-Gen seinerseits wird von Östrogen und Progesteron dosisabhängig reguliert, wobei die höchste HOXA10-Expression mit dem Zeitpunkt der höchsten Progesteron-Produktion in der mittleren Sekretionsphase assoziiert ist (Taylor et al., 1998). Das bedeutet, dass laut der oben genannten Studien β_3 indirekt durch Geschlechtshormone mittels des Transkriptionsfaktors HOXA10 reguliert wird.

In der Studie von Pierro et al. (2003) ergaben sich Hinweise, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) und IL-1 β weitere Regulationsmechanismen für β_3 sind. Die Zugabe von PGE₂ zu in vitro kultivierten Epithelzellen des Endometriums führte zu einer deutlichen Zunahme der Expression von β_3 . Die Zugabe von IL-1 β hatte keinen deutlichen Effekt und zeigte nur eine geringe Steigerung der Expression von β_3 . Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Studie von Tabibzadeh et al. (1990), laut denen eine deutliche Steigerung der β_3 -Expression durch IL-1 β nachgewiesen wurde, da IL-1 β die PGE₂-Freisetzung in humanen Epithelzellen des Endometriums bewirken soll.

Die Regulation von β_3 durch die humane Blastozyste selbst konnte von Simon et al. (1997) nachgewiesen werden. Laut dieser Studie kommt es in endometrialen Epithelzellen, die mit humanen Blastozysten kokultiviert wurden, zu einer Steigerung der β_3 -Expression verglichen mit Epithelzellen, die mit Endometriumszellen ohne Blastozysten oder mit abgestorbenen Blastozysten kokultiviert wurden. Des Weiteren ergab diese Studie, dass zumindest teilweise die Steigerung der β_3 -Expression durch das embryonische IL-1-System vermittelt wird. Eine Blockade von IL-1 α und IL-1 β führte zu einer Hemmung der β_3 -Expression in mit Blastozysten kokultivierten Epithelzellen (Simon et al., 1997).

Eine Beeinflussung bzw. Regulation von β_3 durch IL-1 β konnte in unserer vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurden die Epithelzellen dieser Studie nicht mit IL-1 β -produzierenden Blastozysten kokultiviert, sondern wurden mit exogenem IL-1 β stimuliert. Ebenso zeigte sich in dieser vorliegenden Arbeit keine Änderung der β_3 -Expression nach Stimulation mit TNF- α , IL-6, Östradiol und/oder Progesteron sowie nach Kokultur mit mononukleären Blutzellen.

Nach Moschos et al. (2002) scheint Leptin, ein Polypeptid, das in erster Linie für seine Effekte bei der Nahrungsaufnahme bekannt wurde, ebenfalls eine Rolle in der Reproduktion zu spielen. Leptin fördert die Entwicklung des Präimplantationsembryos (Wu et al., 2002). Leptin-defiziente Mäuse sind steril, wobei ihre Fertilität durch exogenes Leptin wieder hergestellt werden kann (Chehab et al., 1996). Laut Gonzalez und Leavis wird die Expression der β_3 -Untereinheit in endometrialen Epithelzellen nicht nur durch IL-1 β sondern auch durch Leptin gesteigert. Dabei erzielt Leptin einen signifikant größeren Effekt auf die β_3 -Expression als IL-1 β bei gleicher Konzentration. Außerdem stimuliert IL-1 β die Sekretion von Leptin und die Expression des Leptin-Rezeptors in den Epithelzellen des Endometriums (Gonzalez and Leavis, 2001). In einer weiteren Studie zeigten Gonzalez und Kollegen, dass durch die Zugabe von Antikörpern gegen den Leptin-Rezeptor die Steigerung von β_3 durch Leptin und IL-1 β reduziert wird (Gonzalez et al., 2003).

5.8 Regulation von Osteopontin

Osteopontin ist ein extrazelluläres glykosyliertes Phosphoprotein, das ursprünglich aus Knochenzellen isoliert worden ist (Butler et al., 1989). Als Synonym für Osteopontin wurde bzw. wird auch der Begriff Eta-1 (für "early T-lymphocyte-activation-1") verwendet. In humanen Zellen ist das Osteopontin-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 4 in der Nähe des Zentromers lokalisiert (Young et al., 1990). Außer in Knochen wurde Osteopontin auch in vielen anderen Gewebearten wie z.B. in Endometrium, Plazenta, laktierendem Brustgewebe, Hoden, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Gallenblase, Appendix, Leber, Speicheldrüsen, Schweißdrüsen, Leukozyten, glatten Muskelzellen des vaskulären Systems und einigen Tumorzellen gefunden (Butler et al., 1989; Brown et al., 1992; Denhardt et al., 1993; Liaw et al., 1994; Sueoka et al., 1997). Osteopontin wird in uterinen Deziduazellen und Endometriumszellen der sekretorischen Phase exprimiert, nicht aber in den Zellen der proliferativen Phase (Young et al., 1990). Von Wolff und Kollegen haben festgestellt, dass die höchste Konzentration von Osteopontin und seinem Rezeptor, der β_3 -Untereinheit des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, in humanen Epithelzellen des Endometriums in der mittleren und späten Sekretionsphase exprimiert wird. Des Weiteren zeigte sich in der eben genannte Studie, dass Osteopontin in Epithelzellen der Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase immunhistologisch nicht nachweisbar war (von Wolff et al., 2001). Auch in Stromazellen des sekretorischen Endometriums und in Deziduazellen wurde Osteopontin in zunehmender Konzentration exprimiert (von Wolff et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Mirkin stellte fest, dass Osteopontin-mRNA des humanen Endometriums in der mittleren Lutealphase in 10-fach höherer Konzentration als während der frühen Lutealphase exprimiert wird (Mirkin et al., 2005). In die gleiche Richtung weisen die Ergebnisse der Studie von Franchi et al. hin, wonach die mRNA-Expression für Osteopontin während des Implantationsfensters signifikant anstieg, und Osteopontin sowie sein Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ immunhistochemisch deutlich dem epithelialen Drüsengewebe zuzuordnen waren (Franchi et al., 2008). Die Studie von Qu und Kollegen zeigte die Expression von Osteopontin in humanen dezidualisierenden Stromazellen und in dNK (natürlichen Killerzellen der Dezidua), wobei eine höhere Expression im späteren Gestationsalter festgestellt wurde. Die Osteopontin-Expression stieg mit zunehmender Schwangerschaftsdauer an und korrelierte mit einer größeren Zahl an dNK. Außerdem stellten Qu und Kollegen fest, dass die Osteopontin-Expression und die Akkumulation von dNK bei Patientinnen mit habituellen Aborten im Vergleich zu normalen Schwangerschaften signifikant reduziert waren (Qu et al., 2008). Diese Ergebnisse

deuten auf eine wichtige Funktion von Osteopontin bei der Implantation hin. Auch in verschiedenen anderen Körpersekreten wie Milch (Senger et al., 1989), Galle (Brown et al., 1992) und Urin (Shiraga et al., 1992) ist Osteopontin zu finden. Ebenso konnte Osteopontin im Uterussektret in steigender Konzentration während des menstruellen Zykluses nachgewiesen werden, d.h. in geringer Konzentration während der Proliferationsphase und in ca. 3- bis 4-mal höherer Konzentration während der Sekretionsphase (von Wolff et al., 2001). Osteopontin enthält die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RDG), die als Integrin-Bindungssequenz an der Zelladhäsion beteiligt ist. Dieses Protein ist also reich an Aspartamsäure und kann demzufolge besonders gut glykosyliert werden. Zu den Aufgaben von Osteopontin zählen Adhäsion, Migration und Biomineralisation in verschiedenen Geweben.

In der Studie von Liaw et al. (1995) wurde berichtet, dass Osteopontin und sein Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ im unverletzten Endothel von Arterien nicht nachweisbar ist. Nach einer Verletzung des Endothels jedoch korrelieren die mRNA-Menge von Osteopontin zeitlich und örtlich mit der aktiven Endothelproliferation und -migration, wobei die höchste Konzentration zwischen acht Stunden und zwei Wochen nach der Verletzung festzustellen ist. Nach sechs Wochen, wenn die Heilung abgeschlossen ist, liegen die mRNA-Werte für Osteopontin wieder unterhalb der Nachweisgrenze. Genauso verhalten sich auch die Osteopontin-Proteinmengen sowie mRNA und Proteinmenge des β_3 -Rezeptors (Liaw et al., 1995).

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist ein bekannter Rezeptor für Osteopontin. Aber auch andere Integrine mit der α_v -Untereinheit, z.B. $\alpha_v\beta_1$ und $\alpha_v\beta_5$, können ein Rezeptor für Osteopontin sein (Hu et al., 1995a). Im Knochen wird $\alpha_v\beta_3$ von Osteoklasten exprimiert und initiiert die Knochenresorption durch seine Mediatorrolle bei der Adhäsion von Osteoklasten zu Osteopontin (Miyachi et al., 1991; Ross et al., 1993). Laut Hu et al. (1995b) fördern Mg^{2+} und Mn^{2+} die Bindung zwischen Osteopontin und $\alpha_v\beta_3$, während Ca^{2+} diese Interaktion hemmen kann.

Gemäß Weber und Kollegen spielt Osteopontin im Immunsystem ebenfalls eine wichtige Rolle. Makrophagen schütten dieses Protein nach Lymphokin-Stimulation aus. Ferner gehört Osteopontin zu den von aktivierten T-Lymphozyten am meisten sezernierten Molekülen. Seine Immunfunktionen reichen von Beeinflussung der Makrophagen-Chemotaxis über B-Zell-Aktivierung und damit IgM- und IgG-Antikörper-Bildung bis zu T-Zell-Suppression und spezifische Antigenbindung (Weber et al., 1996). Bei einer bakteriellen Infektion erhöht Osteopontin die Widerstandskraft gegenüber den Bakterien indem die Fähigkeit der Makrophagen, an die Infektionsstelle zu wandern, positiv beeinflusst wird (Patarca et al., 1990). Es wurde außerdem festgestellt, dass intradermale Injektion von Osteopontin zu einem zellulären Infiltrat führt, das hauptsächlich aus Makrophagen besteht (Singh et al., 1990).

In Zellkulturen differenzieren isolierte humane Monozyten innerhalb von 1-2 Wochen zu Makrophagen. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren sie verstärkt Osteopontin-mRNA, unabhängig davon, ob das Medium Lipoproteine enthält oder nicht (Newman et al., 1995). Laut Miyazaki et al. verdreifacht die Stimulation der Makrophagen mit TNF- α die mRNA-Menge von Osteopontin innerhalb von zwei Stunden. Es ist möglich, dass diese von TNF- α induzierte Sekretion von Osteopontin durch Makrophagen an der Pathogenese der Lungenfibrose beteiligt ist (Miyazaki et al., 1995). In den endometrialen Zellen unserer Studie ließ sich keine Osteopontin-Induktion durch die Stimulation mit dem Zytokin TNF- α nachweisen. Auch nach Cokultur der endometrialen Zellen mit mononukleären Blutzellen konnte in der vorliegenden Studie keine signifikante Änderung der Expression von Osteopontin nachgewiesen werden.

Sowohl Osteopontin als auch sein Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ wurden in der humanen Plazenta gefunden (Smith et al., 1988; Young et al., 1990), was auf seine Beteiligung im Zusammenhang mit einer Schwangerschaft hindeutet. Während der ersten 14 Wochen der Schwangerschaft nimmt die Osteopontin-Expression in der Plazenta verstärkt zu. Dagegen ist die Expression der Osteopontin-mRNA am Ende der Schwangerschaft deutlich geringer (Daiter et al., 1996). Sowohl die Osteopontin-mRNA als auch das Protein selbst werden von den humanen Trophoblastzellen - abhängig vom Gestationsalter und der Zelldifferentiation - exprimiert. Osteopontin ist also in den Zytotrophoblastzellen zu finden, nicht aber in dem weiter differenzierten Stadium der Synzytiotrophoblastzellen. Des Weiteren haben Daiter und Kollegen (1996) festgestellt, dass cAMP der endogene Regulator für die Hemmung der Osteopontin-Expression während der Zelldifferenzierung des Trophoblasten ist. Im Verlauf dieser Zelldifferenzierung wird außerdem aufgrund veränderter Enzymaktivität die Biosynthese für Progesteron in den Synzytiotrophoblastzellen angekurbelt, wobei von den Zytotrophoblastzellen kein Progesteron gebildet wird (Ringler et al., 1989). Omigbodun und Kollegen fanden heraus, dass exogenes Progesteron die Expression von Osteopontin-mRNA aus In-vitro-Zytotrophoblastzellen während der ersten 48 Stunden erhöht. Nach 72 Stunden, in denen der größte Teil von Trophoblastzellen zu progesteronbildenden Synzytiotrophoblastzellen differenziert ist, konnte eine Zunahme der Osteopontin-mRNA in den nicht mit exogenem Progesteron stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Gabe von Progesteron und seines Antagonisten RU486, wurde die Zunahme der Osteopontin-Expression in den Trophoblastzellen gehemmt. Somit wurde demonstriert, dass die Osteopontin-Zunahme tatsächlich ein direkter Effekt der Progesteronstimulation ist (Omigbodun et al., 1997). Gemäß der eben genannten Studie kommen die geringen

Osteopontin-Mengen im Zytotrophoblasten aufgrund der geringen Menge an Progesteron im Medium von noch unvollständig differenzierten Synzytiotrophoblastzellen zustande. Laut Daiter et al. (1996) lässt sich die reduzierte Osteopontin-Menge im Zytotrophoblasten jedoch auch auf den hemmenden Effekt des hohen intrazellulären cAMP-Spiegels zurückführen.

Ferner ergaben sich in der Studie von Omigbodun et al. (1997) Hinweise, dass mit fortschreitender Differenzierung der Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblastzellen die endogene Progesteron-Menge steigt und damit eine Steigerung der Osteopontin-mRNA und der Protein-Produktion in den verbleibenden mononukleären Zytotrophoblastzellen induziert wird. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass der Osteopontin-Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ in den Synzytiotrophoblastzellen (Vanderpuye et al., 1991) und der Progesteronrezeptor in den Zytotrophoblastzellen (Shi et al., 1993) exprimiert wird.

Nach Waterhouse und Kollegen ist Osteopontin-mRNA in Uterus, Dezidua und Plazenta von Mäusen in Abhängigkeit vom Gestationsalter zu finden. Bis zum siebten Tag der Gestation konnte Osteopontin-mRNA in allen drei Geweben nicht festgestellt werden, stieg dann jedoch kontinuierlich an, wobei ihre Menge zwischen dem 9.-12. Gestationstag ein Maximum erreichte und anschließend wieder abnahm. Da Osteopontin eine große Zahl von Calciumionen binden kann (Chen et al., 1990), wäre es möglich, dass Osteopontin am Calciumtransport zwischen mütterlichem und embryonalem Gewebe beteiligt ist (Waterhouse et al., 1992). Die Induktion von Osteopontin am achten Tag in Uterus, Dezidua und Plazenta trifft mit der Abnahme der Progesteronkonzentration im mütterlichen Plasma zwischen dem 7. und 11. Tag der Gestation zusammen (McCormack et al., 1974). Der spätere Abfall der Osteopontin-Expression könnte auch mit der steigenden Konzentration von Glukokortikoiden in der späteren Schwangerschaft zusammenhängen (Dupouy et al., 1975).

Eine erhöhte Expression von Osteopontin-mRNA wurde in der Haut und im Brustdrüsengewebe von schwangeren und laktierenden Mäusen festgestellt. Außerdem konnte durch Zugabe von Östrogen und Progesteron die Expression von Osteopontin-mRNA in der Haut von nicht schwangeren Mäusen induziert werden (Craig et al., 1991). Übereinstimmend mit dieser hormonellen Induktion hat die Arbeitsgruppe um Brown festgestellt, dass in hypersekretorischen endometrialen Drüsen in Zusammenhang mit einer Schwangerschaft Osteopontin-mRNA stärker exprimiert wird als im sekretorischen Endometrium eines nicht schwangeren Uterus (Brown et al., 1992). Im nichtgraviden Endometrium unserer vorliegenden Studie konnte durch Stimulation mit exogenem Progesteron allein ebenso wie mit Progesteron und Östrogen zusammen keine Änderung der Expression von Osteopontin-mRNA nachgewiesen werden.

Zytokine, die im Epithel des Uterus exprimiert werden, wie z.B. Wachstumsfaktor β (Noda et al., 1988), LIF (Noda et al., 1990) und Interleukin-1 (Jin et al., 1990) konnten ebenfalls als Regulatoren der Osteopontin-Expression in Osteosarkomzellen bzw. Osteoblasten identifiziert werden. In der vorliegenden Studie ließ sich eine Erhöhung der Osteopontin-Expression durch IL-1 β oder auch IL-6 in Epithel- und Stromazellen des Endometriums nicht bestätigen. Dennoch wäre es denkbar, dass aufgrund des Studienprofils (mathematische Unsicherheiten durch eine kleine Stichprobe) eine solche Abhängigkeit nicht signifikant nachgewiesen werden konnte und Osteopontin im Endometrium doch auch mittels Interleukine reguliert wird.

6. Zusammenfassung

Die Implantation und das weitere Wachstum der Blastozyste bedarf einer spezifischen und exakten Vorbereitung des mütterlichen Endometriums und der Blastozyste selbst. Obwohl in den letzten Jahren auf diesem Gebiet sehr viele neue Forschungsergebnisse veröffentlicht wurden, sind die komplexen Regulationsmechanismen, die für optimale Schwangerschaftsbedingungen sorgen, bis heute nicht vollständig erforscht und aufgedeckt. Dennoch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass an der Regulation des weiblichen Endometriums die Steroidhormone 17β -Östradiol und Progesteron sowie unterschiedliche Zytokine, Integrine, Wachstumsfaktoren und mononukleäre Blutzellen beteiligt sind. Diese Substanzen sind durch Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Substrat-Interaktionen für das Endometrium von Bedeutung.

Um die komplexen Vorgänge im Inneren des Uterus weiter analysieren zu können, hat sich die vorliegende Studie die Aufgabe gestellt, einige dieser Substanzen bzw. ihre Regulationsmechanismen im gesunden Endometrium genauer zu untersuchen.

Dafür wurden aus Endometrien der zweiten Zyklushälfte Epithel- und Stromazellen von Frauen im reproduktiven Alter verwendet. Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag auf der Cokultivierung von endometrialen Zellen mit humanen mononukleären Blutzellen, die bisher in der Literatur in dieser Form nicht beschrieben ist. Damit wurde versucht, das In-vivo-Modell des Endometriums genauer nachzuahmen und auf ein In-vitro-Modell zu übertragen. Einerseits sollte dabei geklärt werden, ob eine solche Cokultur überhaupt möglich ist und andererseits ob diese Cokultur zur Untersuchung der zytokingesteuerten Expression verschiedener endometrialer Faktoren geeignet ist. Weitere Ziele waren: Herauszufinden, welche Zytokine Veränderungen im Endometrium bewirken und in welchem Maße die Stimulation mit 17β -Östradiol und Progesteron Auswirkungen auf das Endometrium zeigen.

Da es jedoch eine große Palette von Faktoren im Endometrium gibt, die am Implantationsgeschehen beteiligt sind, musste eine Auswahl der Zytokine und Integrine getroffen werden, die in dieser Studie näher betrachtet werden sollten. Neben der schon genannten Etablierung des Cokulturmodells zwischen mononukleären Blutzellen und endometrialen Zellen wurden daher die Faktoren IL-6, β_3 und Osteopontin in Epithel- und Stromazellen des Endometriums analysiert. Die Regulation dieser Proteine wurde jeweils unter folgenden drei Gesichtspunkten untersucht:

Erstens, wie sich die Stimulation mit den Steroidhormonen 17β -Östradiol und Progesteron in physiologischer bzw. in hoher Konzentration sowie bei kombinierter Gabe auf die Regulation dieser Proteine auswirkt;

Zweitens, welche Änderung in der Sekretion bzw. Expression dieser Proteine nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen in zwei verschiedenen Konzentrationen auftreten;

Drittens, welche Auswirkungen die Stimulation mit den Zytokinen $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 (jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen) auf die Proteine IL-6 , β_3 und Osteopontin zeigt.

Für die oben genannten Ziele wurde neben der Etablierung optimaler Kulturbedingungen für die Zellkultur endometrialer Zellen sowie für das Cokulturmodell zwischen mononukleären Blutzellen und endometrialen Zellen die Methodik von ELISA und semiquantitativer PCR verwendet.

Als Ergebnis dieser Studie ließ sich feststellen, dass mononukleäre Blutzellen durchaus mit endometrialen Epithel- und Stromazellen cokultiviert werden können. Außerdem ist es möglich, die zytokingesteuerte Expression verschiedener endometrialer Faktoren anhand des Cokulturmodells zu charakterisieren. In Vorversuchen zum Cokulturmodell zeigte sich, dass mononukleäre Blutzellen ohne Cokultur $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ produzieren. Für den Faktor LIF konnten nur Werte unterhalb der Nachweisgrenze festgestellt werden.

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass vor allem bei der Regulation von IL-6 im Endometrium Steroidhormone, mononukleäre Blutzellen und die Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 beteiligt sind.

Im Einzelnen haben sich dabei folgende Ergebnisse ergeben:

Die kombinierte Stimulation mit E_2 und Progesteron in hoher Konzentration (E_2 : 10^{-8} mol; Progesteron: 10^{-6} mol) führt zu einer maximalen IL-6 -Sekretion (1,9-fache des Referenzwertes) bei Epithelzellen. Die kombinierte Stimulation mit Steroidhormonen wirkt sich bei Stromazellen sowohl in physiologischer als auch in hoher Konzentration eher inhibierend auf die Sekretion von IL-6 aus. Höchstwerte der IL-6 -Sekretion (1,75-fache des Referenzwertes) bei Stromazellen werden durch getrennte Stimulation mit Steroidhormonen in physiologischer Konzentration erreicht.

Im Cokulturmodell konnte nur bei Stromazellen nach Cokultivierung mit 500.000 mononukleären Blutzellen eine signifikante ca. 3-fache Steigerung der IL-6 -mRNA bzw. ca. 7-fache Steigerung der IL-6 -Sekretion im Zellüberstand gemessen werden.

Bei Epithelzellen nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen zeigte sich keine Änderung der IL-6 -Sekretion bzw. der IL-6 -mRNA-Expression.

Die Zytokinstimulation mit TNF- α , IL-1 β und IL-6 bewirkte bei Epithelzellen ebenfalls keine signifikante Änderung der IL-6-Sekretion bzw. der mRNA-Expression. Bei den Stromazellen konnte jedoch eine dosisabhängige Steigerung der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β festgestellt werden. Die erhöhte Sekretion betrug das 2- bis 10-fache des Referenzwertes der Kontrollen ohne Zytokinstimulation. Die mRNA-Menge von IL-6 in Stromazellen blieb nach weiterer Stimulation mit IL-6 unbeeinflusst.

Bei den Experimenten zur Regulation von β_3 und Osteopontin in endometrialen Epithel- und Stromazellen konnte weder durch die Stimulation mit den Steroidhormonen E₂ und Progesteron in zwei verschiedenen Konzentrationen und in Kombination miteinander, noch nach Cokultur mit mononukleären Blutzellen in zwei Konzentrationen sowie auch nicht nach Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6 in zwei verschiedenen Konzentrationen eine signifikante Änderung von Sekretion oder mRNA-Expression dieser zwei Proteine nachgewiesen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde angestrebt, einen Beitrag zur Klärung von Regulationsmechanismen im Endometrium zu leisten und vor allem neben schon bekannten Faktoren wie Zytokinen und Integrinen auch die mononukleären Blutzellen als Einflussgröße im Uterus zu betrachten. Das eigentliche Ziel solcher Bemühungen ist selbstverständlich nicht nur, die Regulation und Wirkungsmechanismen im weiblichen fertilen Endometrium besser zu verstehen, sondern auch konkrete Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten für sterile Frauen bzw. Paare zu finden. Um das zu erreichen, sind auch in Zukunft weitere Studien in diesem Bereich erforderlich.

7. Anhang

7.1 Patientendaten:

Endometrium	Alter in Jahren	Diagnose	Zyklustag bei OP	Progesteron in ng/ml	Östradiol in pg/ml	LH in mIU/ml
(E 44, 46, 50, 54-57, 61, 63, 67) ¹						
E 82 (Co) ²	39	Uterus myomatosus	24	3,47	164,9	3,43
E 83 (Co)	40	Uterus myomatosus	18	0,02	135,9	9,14
E 85 (Co)	37	V. a. Endometriose	19	14,68	194,6	3,45
E 86 (Co)	51	Z. n. Cis der Cervix	19	22,06	112,3	3,38
E 88 (Co)	38	Uterus myomatosus	13	4,35	49,68	1,73
E 89 (Co;Zyt)	41	Uterus myomatosus	18	16,98	91,37	4,25
E 92 (Zyt) ³	46	Submuköses Myom	13	0,00	34,36	4,19
E 98 (Zyt)	43	Uterus myomatosus	21	13,73	184,1	2,78
E 101 (Zyt)	35	Chron. Uterusschmerzen	14	0,47	294,3	23,50
E 102 (Zyt)	47	Uterus myomatosus	18	7,56	81,00	8,95

¹: Für die Endometrien, die meine Kollegin Frau Claudia Zepf mittels Hormonstimulation bearbeitet hat und die in dieser Arbeit durch semiquantitative PCR untersucht wurden, galten folgende Operationsindikationen: Uterus myomatosus, Hypermenorrhoe oder Descensus genitalis.

²: Endometrium, das zur Experimentreihe der Cokultur mit mononukleären Blutzellen verwendet wurde.

³: Endometrium, das zur Experimentreihe der zytokinstimulierten Epithel- und Stromazellen verwendet wurde.

7.2 Literaturverzeichnis

- Albelda SM (1993) Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 68: 4-17
- Albelda SM, Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2869-2880
- Albelda SM, Cuch CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2868-2880
- Andreesen R, Picht J, Löhr GW (1982) Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *J of Immun Methods* 56: 295-304
- Antonelli-Orlidge a, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA (1989) An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4544-4548
- Aplin JD, Spanswick C, Behzad F, Kimber SJ, Vicovac L (1996) Integrins beta5, beta3, alpha5 are apically distributed in endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod* 2: 527-534
- Bergeron C, Ferenczy a, Toft DO, Schneider W, Shymala G (1988) Immunocytochemical study of progesteron receptors in the human endometrium during the menstrual cycle. *Lab Invest* 59: 862-869
- Bergqvist A, Ljungberg O, Skoog L (1993) Immunohistochemical analysis of the oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. *Hum Reprod* 8: 1915-1922
- Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung (Hrsg.) (2007) *Ungewollt kinderlos*, 1. Auflage, Gebrüder Kopp GmbH & Co. KG, Köln, S. 12-15
- Berman J, Girardi G, Salmon JE (2005) TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *J Immunol* 174(1):485-90
- Bodary SC, McLean JW (1990) The integrin beta1 subunit associates with the vitronectin receptor alpha5 subunit to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line. *J Biol Chem* 265: 5938-5941
- Brown LF, Berse B, Van De Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3: 1169-1180
- Butler WT (1989) The nature and significance of osteopontin. *Con Tiss Res* 23: 123-136
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD (1995) Cell adhesion molecules on the oocyte and the preimplantations human embryo. *Hum Reprod* 10 (6): 1571-1578
- Casals G, Ordi J, Creus M, Fábregues F, Casamitjana R, Quinto L, Campo E, Balasch J (2008) Osteopontin and alpha5beta3 integrin expression in the endometrium of infertile and fertile women. *Reprod Biomed Online* 16(6):808-816

- Casslen BG, Harper MJK (1991) Human endometrial epithelial cells grown on collagen in serum-free medium. Estrogen responsiveness and morphology. *Acta Endocrinol (Copenh)* 125: 101-108
- Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genet* 12: 318-320
- Chen DB, Yang ZM, Hilsenrath R, Le SP, Harper MJ (1995) Stimulation of prostaglandin (PG) F₂α and PGE₂ release by tumor necrosis factor-α and interleukin-1α in cultured human luteal phase endometrial cells. *Hum. Reprod* 10: 2773-2780
- Chen Y, Gorski JP (1990) Comparison of in vitro calcium binding properties of individual extracellular phosphoproteins from bone. *J Cell Biol* 111 (2): 356a
- Cheresh DA, Smith JW, Cooper HM, Quaranta V (1989) A novel vitronectin receptor integrin is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. *Cell* 57; 59-69
- Classen-Linke I, Kusche M, Knauthe R, Beier HM (1997) Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res* 287: 171-185
- Claudio L, Martiney JA, Brosnan CF (1994) Ultrastructural studies of the blood-retina barrier after exposure to interleukin-1β or tumor necrosis factor-α. *Lab Invest* 70:850-861
- Craig AM, Denhardt DT (1991) The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene* 100: 163-171
- Daftary GS, Troy PJ, Bagot CN, Young SL, Taylor HS (2002) Direct regulation of beta3-integrin subunit gene expression by HOXA10 in endometrial cells. *Mol Endocrinol* 16: 571-579
- Daiter E, Omigbodun A, Wang S, Walinsky D, Strauss JF 3rd, Hoyer JR, Coutifaris C (1996) Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinol* 137 (5): 1785-1790
- De los Santos MJ, Anderson DJ, Racowsky C, Simon C, Hill JA (1998) Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. *Biol Reprod* 59: 1419-1424
- De los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, Simón C (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol Reprod* 54: 563-574
- Denhardt DT, Guo X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7: 1475-1482
- Dinarello CA (1988) Biology of interleukin 1. *FASEB J* 2: 108-115
- Dower SK, Kronheim SR, Hopp TP, Cantrell M, Deeley M, Gillis S, Henney CS, Urdal DL (1986) The cell surface receptors for interleukin-1 α and interleukin-1 β levels are identical. *Nature* 324: 266-268

- Dubinett SM, Huang M, Lichtenstein A, McBride WH, Wang J, Markovitz G, Kelley D, Grody WW, Mintz LE, Dhanani S (1994) Tumor necrosis factor-alpha plays a central role in interleukin-2-induced pulmonary vascular leak and lymphocyte accumulation. *Cell Immunol* 157: 170-180
- Dupouy JP, Coffigny H, Magre S (1975) Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J Endocrinol* 65: 347-352
- Evans R. (1976) The Macrophage in Neoplasia. In: Fink MA (eds) Academic Press, New York, 83
- Franchi A, Zaret J, Zhang X, Bocca S, Oehninger S (2008) Expression of immunomodulatory genes, their protein products and specific ligands/receptors during the window of implantation in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 14(7): 413-421
- Fujita K, Nakayama T, Takabatake K, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Fujiwara H, Mori T (1998) Administration of thymocytes derived from non-pregnant mice induce an endometrial receptive stage and leukemia inhibitory factor expression in the uterus. *Hum Reprod* 13: 2888-2894
- Garcia E, Bouchard P, de Brux J, Berdah J, Frydman R, Schaison G, Milgrom E, Perrot-Applanat M (1988) Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 80-87
- Gassen HG, Sachse GE, Schulte A (Hrsg.) (1994) PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion: 1-13. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag
- Glasser SR, Julian J, Decker GL, Tang JP, Carson DD (1988) Development of morphological and functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. *J Cell Biol* 107: 2409-2423
- Glasser SR, Mulholland J, Mani SK (1991) Blastocyst endometrial relationships: reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. In: Miller RV, Thiede HA (eds) *Trophoblast Res* 5 Plenum Press, New York, 225-280
- Goldblum SE, Ding X, Campbell-Washington J (1993) TNF-alpha induces endothelial F-actin depolymerization, new actin synthesis and barrier dysfunction. *Am J Cell Physiol* 264: C894-C905
- Golde DW, Cline MJ (1974) Regulation of granulopoiesis: *New Eng J. Med* 291:1388-1395
- Gonzalez RR and Leavis PC (2001) Leptin up-regulates beta3-Integrin expression and IL-1beta up-regulates leptin and leptin receptor expression in human endometrial epithelial cell cultures. *Endocrine* 16: 21-28
- Gonzalez RR, Leary K, Petrozza JC, Leavis PC (2003) Leptin regulation of interleukin-1 system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 9: 151-158
- Gosh D, Sengupta J (1995) Morphological characteristics of human endometrial epithelial cells cultured on rat-tail collagen matrix. *Hum Reprod* 10: 785-790

- Grell M, Zimmermann G, Hülser D, Pfizenmaier K, Scheurich P (1994) TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol* 153: 1963-1972
- Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, Thaler DJ (2003) Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 9(12): 785-791
- Haimovici F, Anderson DJ (1993) Cytokines and growth factors in implantation. *Micr ResTechn* 25: 201-207
- Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ (1991) The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol Reprod* 44: 69-75
- Heller RA, Song K, Fan N, Chang DJ (1992) The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70: 47-56
- Hibbs JB, Chapman HA, Weinberg JB (1978) The macrophage as an antineoplastic surveillance cell: biological perspectives. *J Retic Soc.* 24: 549-570
- Hoffmann-La Roche AG (Hrsg.) (1991) Roche Lexikon Medizin (2. neubearbeitete Aufl.). München, Urban & Schwarzenberg
- Hopfer H, Rinehart CA Jr, Vollmer G, Kaufman DG (1994) In vitro interactions of endometrial stromal and epithelial cells in Matrigel: reorganization of the extracellular matrix. *Pathobiology* 62: 104-108
- Horuk R, McCubrey JA (1989) The IL-1 receptor in Raji human B-lymphoma cells. Molecular characterization and evidence for receptor-mediated activation of gene expression. *Biochem J* 260: 657-663
- Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW (1995a) A biochemical characterization of the binding of Osteopontin to integrins $\alpha v \beta 1$ and $\alpha v \beta 5$. *J Biol.Chem* 270 (44): 26232-26238
- Hu DD, Hoyer JR, Smith JW (1995b) Ca^{2+} suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin $\alpha v \beta 3$. *J Biol Chem* 270: 9917-9925
- Huang HY, Wen Y, Krussel JS, Raga F, Soong YK, Polan ML (2001) Interleukin-1beta regulation of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1387-1393
- Huang SJ, Schatz F, Masch R, Rahman M, Buchwalder L, Niven-Fairchild T, Tang C, Abrahams VM, Krikun G, Lockwood CJ (2006) Regulation of chemokine production in response to pro-inflammatory cytokines in first trimester decidual cells. *J Reprod Immunol* 72(1-2): 60-73
- Hunt JS, Pollard JW (1992) Macrophages in the uterus and placenta. In: Gordon S, Russel SW, Current Topics in Microbiology and Immunology: Macrophages and Macrophage Activation, Springer-Verlag, New York: 39-63

- Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Tabibzadeh S (1992) Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein in human endometrium. *Biol Reprod* 47: 141-147
- Hunt JS, Roby KF (1994) Implantation Factors. In: *Clinical Obstetrics and Gynecology*, Volume 37, Number 3, JB Lippincott Co.: 635-645
- Hynes RO (1992) Integrins: versability, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
- Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA (2000) Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Rprod* 62 (5): 1285-1290
- Inagaki N, Stern C, McBain J, Lopata A, Kornman L, Wilkinson D (2003) Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. *Hum Reprod* 18(3): 608-615
- Ininns EK, Gatanaga M, Cappuccini F, Dett CA, Yamamoto RS, Granger GA, Gatanaga T (1992) Growth of the endometrial adenocarcinoma cell line AN3 is modulated by tumor necrosis factor and its receptor is up-regulated by oestrogen in vitro. *Endocrinology* 130: 1852-1856
- Jacobs AL, Decker GL, Glasser SR, Julian J, Carson DD (1990) Vectorial secretion of prostaglandins by polarized rodent uterine epithelial cells. *Endocrinology* 126: 2125-2136
- Jacobs AL, Sehgal PB, Julian J, Carson DD (1992) Secretion and hormonal regulation of interleukin-6 production by mouse uterine stromal and polarized epithelial cells cultured in vitro. *Endocrinol* 131(3): 1037-1046
- Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA (2007) Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J Reprod. Immunol* 73(1): 74-84
- Jensen EV, De Sombre ER (1972) Mechanism of action of the female sex hormones. *Ann. Rev Biochem* 41: 203-230
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257: 88-91
- Jin C, Miyaura C, Ishimi Y, Hong M, Sato T, Abe E, Suda T (1990) Interleukin 1 regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol* 74: 221-228
- Jue DM, Sherry B, Leudke C, Cerami A (1990) Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry* 29: 8371-8377
- Julian JA, Carson DD, Glasser SR (1992) Polarized rat uterine epithelium in vitro: responses to estrogen in defined medium. *Endocrinology* 130: 68-78

- Karyia M, Kanzaki H, Takakura K, Imai K, Okamoto N, Emi N, Kariya Y, Mori T (1991) Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1170-1174
- Kauma S, Dennis M, Strom S, Eierman D, Turner BS (1990) Interleukin-1beta, human leukocyte antigen HLA-Dalpha and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 163, 1430-1437
- Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986) Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25: 312-318
- Knörr K, Knörr-Gärtner H, Beller FK, Lauritzen C (1989) Sterilität - Infertilität. In: *Geburtshilfe und Gynäkologie*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S. 586-587
- Kohase M, Henriksen-DeStefano D, May LT, Vilcek J, Sehgal PB (1986) Induction of beta2-Interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell* 45: 659
- Kohase M, May LT, Tamm I, Vilcek J, Sehgal PB (1987) A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin-1. *Mol Cell Biol* 7: 273
- Korhonen M, Ylännä J, Laitinen L, Cooper HM, Quaranta V, Virtanen I (1991) Distribution of the alpha1-alpha6 integrin subunits in human developing and term placenta. *Lab Invest* 65: 347-356
- Kosaka K, Fujiwara H, Tatsumi K, Yoshioka S, Higuchi T, Sato Y, Nakayama T, Fujii S (2003) Human peripheral blood mononuclear cells enhance cell-cell interaction between human endometrial epithelial cells and BoWo-cell spheroids. *Hum Reprod* 18 (1): 19-25
- Kou S, Naoaki K, Shigetatsu S, Mamoru T, Toyohiko M, Yasunori Y (1997) Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. *Fertil Steril* 67: 799-811
- Kover K, Liang L, Andrews GK, Dey SK (1995) Differential expression and regulation of cytokine genes in the mouse uterus. *Endocrinology* 136: 1666-1673
- Laird SM, Li TC, Bolton AE (1993) The production of placental protein 14 and interleukin 6 by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod* 8 (6): 793-798
- Laird SM, Tuckerman E, Li TC, Bolton AE (1994) Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. *Hum Reprod* 9 (7): 1339-1343
- Laird SM, Tuckerman EM, Saravelos H, Li TC (1996) The production of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod* 11: 1318-1323
- Lawler J, Weinstein R, Hynes RO (1988) Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium and integrin receptors. *J Cell Biol* 107: 2351-2361

- Le PT, Lazorick S, Whichard LP, Yang Y, Clark SC, Haynes BF, Singer KH (1990) Human thymic epithelial cells produce IL-6, Granulocyte-Monocyte-CSF and Leukemia Inhibitory Factor. *J Immunol* 145: 3310-3315
- Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty Jr. KS (1988) Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 334-340
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 90: 188-195
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J (1994a) Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 62: 497-506
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SJ, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL (1994b) Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 643-649
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J (1995) Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 63: 535-542
- Lessey BA (2000) The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod* 15 (Suppl. 6): 39-50
- Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassel J, Bissell MJ (1987) Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 136-140
- Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM (1994) Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 74: 214-224
- Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM (1995) Osteopontin and beta3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circulation Res* 77: 665-672
- Lockwood CJ, Matta P, Krikun G, Koopman LA, Masch R, Toti P, Arcuri F, Huang ST, Funai EF, Schatz F (2006) Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in first trimester human decidual cells: implications for preeclampsia. *Am J Pathol* 168(2): 445-452
- Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, Buhimschi C, Huang SJ, Krikun G, Schatz F (2008) Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol* 172(6): 1571-1579
- Loy RA, Loukides JA, Polan ML (1992) Ovarian steroids modulate human monocyte tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *Fertil Steril* 58: 733-739
- Luna EJ, Hitt AL (1992) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258: 955-963

- Mackness GB (1962) Cellular resistance to infection. *J Exp. Med.* 116: 381-408
- Mahfoudi A, Nicollier M, Propper AY, Coumes-Marquet S, Adessi GL (1991) Establishment of endometrial glandular epithelial cell subculture in a serum-free, hormonally defined medium on a basement membrane matrix. *Biol Cell* 74:255-265
- Mahfoudi A, Fauconnet S, Bride J, Beck L, Remy-Martin JP, Nicollier M, Adessi GL (1992) Serum-free culture of stromal and functionally polarized epithelial cells of guinea-pig endometrium: a potential model for the study of epithelial-stromal paracrine interactions. *Biol Cell* 74:255-265
- Mahfoudi A, Nicollier M, Beck L, Mularoni A, Cypriani B, Fauconnet S, Adessi GL (1994) Effect of progesterone on proteins vectorially secreted by glandular epithelial cells of guinea-pig endometrium: modulation by homologous stroma. *J Reprod Fertil* 100:637-644
- Makkar G, Ng EH, Yeung WS, Ho PC (2006) Reduced expression of interleukin-11 and interleukin-6 in the periimplantation endometrium of excessive ovarian responders during in vitro fertilization treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 91(8): 3181-3188
- Mangan DF, Wahl SM (1991) Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and proinflammatory cytokines. *J Immunol* 147: 3408-3412
- Mani SK, Decker GL, Glasser SR (1991) Hormonal responsiveness by immature rabbit uterine epithelial cells polarized in vitro. *Endocrinology* 128: 1563-1573
- Manolagas SC, Jilka RL (1995) Bone marrow, cytokines and bone remodeling — emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *New Engl. J. Med.* 332: 305-311
- Marshall RJ, Jones DB (1988) An immunohistochemical study of lymphoid tissue in human endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 7: 225-235
- McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK (1992) Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J Immunol* 148(6): 1699-1705
- McCormack JT, Greenwald GS (1974) Progesterone and Östradiol-17beta concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J Endocrinol* 62: 101-107
- Milatovich A, Song K, Heller RA, Francke U (1991) Tumor necrosis factor receptor genes, TNFR1 and TNFR2, on human chromosomes 12 and 1. *Somatic Cell Mol Genet* 17: 519-523
- Milgrom E, Baulieu EE (1970) Progesterone in uterus and plasma. I. Binding in rat uterus 105,000 g supernatant. *Endocrinology* 87(2): 276-286
- Milgrom E, Luu T, Atger M, Baulieu EE (1973) Mechanisms regulating the concentration of the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *J Biol Chem* 248: 6366-6474
- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S (2005) In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 20(8): 2104-2117

- Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, Zamboni-Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL, Cheresch D (1991) Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 266: 20369-20374
- Miyazaki Y, Tashiro T, Higuchi Y, Setoguchi M, Yamamoto S, Nagai H, Nasu M, Vassalli P (1995) Expression of osteopontin in a macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the lung expression of a tumor necrosis factor alpha transgene. *Ann NY Acad Sci* 760: 334-341
- Mizel SB (1989) The interleukins. *FASEB J* 3: 2379-2388
- Morris H, Edwards J, Tiltman A, Malcom E (1985) Endometrial lymphoid tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol* 38: 644-652
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS (2002) Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77: 433-444
- Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E (1990) Pattern of interleukin-6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3092-3096
- Mulholland J, Winterhager E, Beier HM (1988) Changes in proteins synthesized by rabbit endometrial epithelial cells following primary culture. *Cell Tissue Res* 252: 123-132
- Navab M, Liao F, Hough GP, Ross LA, van Lenten BJ, Rajavashisth TB, Lusis AJ, Laks H, Drinkwater DC, Fogelman AM (1991) Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin43 message. *J Clin Invest* 87: 1763-1772
- Navot D, Bergh PA, Williams M, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Fox J, Schreiner-Engel P, Hofmann GE, Grunfeld L (1991) An insight into early reproductive processes through the in vivo model of ovum donation. *J Clin Endocrinol and Metab* 72: 408-414
- Negami AI, Tominaga T (1989) Gland and epithelium formation in vitro from epithelial cells of the human endometrium. *Hum Reprod* 4: 620-624
- Newman CM, Bruun BC, Mistry PK, Weissberg PL, Shanahan CM (1995) High expression of osteopontin mRNA in human macrophages but not human vascular smooth muscle cells in culture. *Ann NY Acad Sci* 760: 381-382
- Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Takagi T, Saji F, Tanizawa O (1990) Trophoblast derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 436-441
- Noda M, Yoon K, Price CW, Butler WT, Rodan GA (1988) Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor. *J Biol Chem* 263: 13916-13921
- Noda M, Vogel RL, Hasson DM, Rodan GA (1990) Leukemia inhibitory factor suppresses proliferation, alkaline phosphatase activity, and type I collagen messenger ribonucleic

- acid level and enhances osteopontin mRNA level in murine osteoblast-like cells. *Endocrinol* 127: 185-190
- Old LJ (1985) Tumor necrosis factor. *Science* 230: 631-632
- Ordi J, Creus M, Quintó L, Casamitjana R, Cardesa A, Balasch J (2003) Within-subject between-cycle variability of histological dating, alpha v beta 3 integrin expression, and pinopod formation in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5): 2119-2125
- Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, Gorstein F (1989) Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens. *Fert Steril* 32: 965-972
- Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R (1994) Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) receptors and selective effect of TNF alpha on the inner cell mass in mouse blastocysts. *Endocrinology* 134: 206-212
- Patarca R, Singh RP, Wei FY, Iregui MV, Singh P, Schwartz J, Cantor H (1990) Alternative pathways of T-cell activation and positive clonal selection. *Immunol Rev.* 116: 85-100
- Peek M, Landgen BM, Johannisson E (1992) The endometrial capillaries during the normal menstrual cycle: a morphometric study. *Hum Reprod* 7: 906-911
- Perlstein RS, Mougey EH, Jackson WE, Neta R (1991) Interleukin-1 and interleukin-6 act synergistically to stimulate the release of adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 141-146
- Pierro E, Minici F, Alesiani O, Della Monica L, Meroa AM, Muncuso S, Lanzone A (2003) In vitro regulation of beta1 and beta3 integrin subunits in endometrial epithelial cells from normal endometrium. *Am J Reprod Immun* 49: 373-376
- Polasek W (1997) *Schließende Statistik*. Berlin, Springer-Verlag
- Press MP, Nousek-Goebel N, King WJ, Herbst AL, Greene GJ (1984) Immunohistochemical assessment of estrogen receptor distribution in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Lab Invest* 51: 495
- Psychoyos A (1993) The implantation window: basic and clinical aspects. *Frontiers Endocrinol* 4: 57-63
- Qu X, Yang M, Zhang W, Liang L, Yang Y, Zhang Y, Deng B, Gao W, Liu J, Yang Q, Kong B, Gong F (2008) Osteopontin expression in human decidua is associated with decidual natural killer cells recruitment and regulated by progesterone. *In Vivo* 22(1):55-61
- Ralston SH, Russel RG, Gowen M (1990) Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Min Res* 5: 983-988
- Ravn V, Rasmussen BB, Hojholt L, Barfoed M, Heiberg I, Svenstrup B, Thorpe SM (1994) Estrogen- and progesterone receptors in normal cycling endometrium as studied by end-point titration. *Cell Tissue Res* 276: 419-428

- Remick DG, Kunkel SL (1994) Pathophysiologic alteration induced by tumor necrosis factor. *Int Rev Exp Pathol* 34B: 7-25
- Ringler GE, Kao LC, Miller WL, Strauss JF (1989) Effects of 8-bromo-cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Mol Cell Endocrinol* 61: 13-21
- Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF (1992) Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod* 46: 1069-1079
- Roby K, Hunt JS (1994) Mouse endometrial tumor necrosis factor -alpha messenger ribonucleic acid and protein: localization and regulation by Östradiol and progesterone. *Endocrinology* 135: 2780-2789
- Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA (1993) Interactions between the bone matrix protein osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 268: 9901-9907
- Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87: 1-5
- Sachs L (1984) *Angewandte Statistik*. Berlin, Springer-Verlag
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Schatz F, Gordon FE, Laufer N, Gurpide E (1990) Culture of human endometrial cells under polarizing conditions. *Differentiation* 42: 184-190
- Sehgal PB, Wang L, Rayande R, Pan H, Marguiles L (1995) Interleukin-6-type cytokines. *Ann NY Acad Sci* 762: 1-14
- Semer D, Reisler K, MacDonald PC, Caesey ML (1991) Responsiveness of human endometrial cells to cytokines. *Ann NY Acad Sci* 622: 99-110
- Senger DR, Peruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG (1989) Purification of human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochem Biophys Acta* 996: 43-48
- Shalaby MR, Laegried WW, Ammann AJ, Liggitt HD (1989) Tumor necrosis factor alpha associated uterine endothelial injury in vivo. Influence of dietary fat. *Lab Invest* 61: 564-570
- Sharkey AM, Dellow D, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones Sm Smith SK (1995) Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 53(4): 974-981
- Shi WL, Wang JD, Fu Y, Xu LK, Zhu PD (1993) The effect of RU486 on progesterone receptor in villous and extravillous trophoblast. *Hum Reprod* 8: 953-958

- Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrell CH, Sherbotie JR, Foreman JW, Przysiecki C, Neilson EG (1992) Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(1): 426-430
- Shirota K, LeDuy L, Yuan S, Jothy S (1990) Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cell. *Virchows Arch B Cell Pathol* 58: 303-308
- Shortman K, Palmer J (1971) The requirement for macrophages in the in vitro immune response. *Cell Immunol* 2: 399-410
- Sillem M, Prifti S, Schmidt M, Rabe T, Runnebaum B (1997) Endometrial integrin expression is independent of estrogen or progestin treatment in vitro. *Fertil Steril* 67 (5): 877-882
- Simón C, Piquette GM, Frances A, Westphal LM, Heinrichs WL, Polan ML (1993) Interleukin-1 type 1 receptor messenger ribonucleic acid expression in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* 59: 791-796
- Simón C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML (1994) Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrin* 134: 521-528
- Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Conner JE, Remohi J (1997) Embryonic regulation of integrins beta3, alpha4 and alpha1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrin Metab* 82: 2607-2616
- Simón C, Valbuena D, Kruessel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, Pellicer A, Polan ML (1998) Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril* 70: 896-906
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM (1988) cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241: 585-589
- Singh RP, Patarca R, Schwartz J, Singh P, Cantor H (1990) Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *J Exp Med* 171: 1931-1942
- Smith JW, Cheresch DA (1988) The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. Photoaffinity cross-linking implicates amino acid residues 61-302 of the beta subunit. *J Biol Chem* 263: 18726-18731
- Streuli CH, Bailey N, Bissel MJ (1991) Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 115: 1383-1395
- Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz APN, Roskelley C, Bissell MJ (1995) Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol* 129: 591-603
- Suehiro K, Smith JW, Plow EF (1996) The ligand recognition specificity of beta3 integrins. *J Biol Chem* 271: 10365-10371

- Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y (1997) Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. *Fertil Steril* 67: 799-811
- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH (1993) Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119: 1175-1186
- Sutton JS, Weiss L (1966) Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. An electron microscope study. *J. Cell Biol* 28: 303
- Tabatake K, Fujiwara H, Goto Y, Nakayama T, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Mori T (1997) Slenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum Reprod* 12: 2102-2107
- Tabibzadeh SS, Santhanam U, Seghal PB, May LT (1989) Cytokine induced production of IFN-B/IL-6 by freshly explanted endometrial stromal cells; modulation by Östradiol 17-beta. *J Immunol* 142: 3134-3139
- Tabibzadeh SS, Sivarajah A, carpenter D, Ohlsson-Wilhelm BM, Satyaswaroop PG (1990a) Modulation of HLA-DR expression in epithelial cells by interleukin 1 and Östradiol-17 β . *J Endocrinol Metab* 71: 749-747
- Tabibzadeh SS, Kafka KL, Satyswaroop PG, Kilian PL (1990b) IL-1 regulation of human endometrial function: Presence of IL-1 receptor correlates with IL-1 stimulated PGE₂ production. *J Endocrinol Metab* 70: 1000-1006
- Tabibzadeh SS (1991a) Human endometrium, an active site of cytokine production and action. *Endocrin Rev* 12: 272-290
- Tabibzadeh SS (1991b) Cytokine regulation of human endometrial function. *Ann NY Acad Science* 622: 89-97
- Tabibzadeh SS, Sun XZ (1992) Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 7: 1214-1221
- Tabibzadeh S, Kong QF, Sun XZ (1993) Regulatory roles of TNF-alpha on transepithelial migration of leukocytes and epithelial dyscohesion. *Endocrine* 1: 417-425
- Tabibzadeh SS (1994a) Cytokines and hypothalamic-pituiary-ovarian-endometrial axis. *Hum Reprod* 9(5): 947-967
- Tabibzadeh S, Kong QF, Satyaswaroop PG, Zupi E, Marconi D, Romanini C, Kapur S (1994b) Distinct regional and menstrual cycle dependent distribution of apoptosis in human endometrium. Potential regulatory role of T cells and TNF-alpha. *Endocrine* 2: 87-95
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT (1995a) Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation winow. *Hum Reprod* 10: 2793-2799

- Tabibzadeh S, Babaknia A, Liu R, Marconi D, Romanini C (1995b) Site and menstrual cycle - dependent expression of proteins of the TNF receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase specific production of TNF-alpha in human endometrium. *Hum. Reprod* 10: 277-286
- Tabibzadeh S, Satyaswaroop PG, von Wolff M, Strowitzki T (1999) Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by oestrogen withdrawal. *Mol. Hum Reprod* 5(12): 1141-1149
- Tartaglia LA, Ayers TM, Wong GHW, Goeddel DV (1993a) A novel domain within the 55 kDa TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV (1993b) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73: 213-216
- Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P (1998) HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 101: 1379-1348
- Thomson AW (1991) *The Cytokine Handbook*, Academic Press, London
- Tovey MG, Content J, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, Poupart P, Gigou M, Shaw A, Fiers W (1988) Genes for IFN-beta-2 (IL-6), tumor necrosis factor and IL-1 are expressed at high levels in the organs of normal individuals. *J Immunol* 141(9): 3106-3110
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474
- Tseng L, Gurpide E (1975) Effect of progestins on Östradiol receptor levels in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 402
- Tseng L (1979) Physiologic changes in binding and metabolism of Östradiol and progesterone in human endometrium during the menstrual cycle. *Obstet Gynecol Annu* 8: 1-17
- Van Le L, Oh ST, Anners JA, Rinehart CA, Halme J (1992) Interleukin-1 inhibits growth of normal human endometrial stromal cells. *Obstet Gynecol* 80: 405-409
- Van Snick J (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 8: 253-278
- Vanderpuye OA, Labarrere CA, McIntyre JA (1991) A vitronectin-receptor-related molecule in human placental brush border membranes. *Biochem J* 280: 9-17
- von Wolff M, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Karl C, Beier HM (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 5: 146-152
- von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S (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, Strowitzki T, Becker V, Zepf C, Tabibzadeh S, Thaler CJ (2001) Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril* 76: 775-781
- von Wolff M, Thaler CJ, Zepf C, Becker V, Beier HM, Strowitzki T (2002a) Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol* 16(2): 121-129
- von Wolff M, Stieger S, Lumpp K, Bücking J, Strowitzki T, Thaler CJ (2002b) Endometrial interleukin-6 in vitro is not regulated directly by female steroid hormones but by pro-inflammatory cytokines and hypoxia. *Mol Hum Reprod* 12: 1096-1102
- von Wolff M, Bohlmann MK, Fiedler C, Ursel S, Strowitzki T (2004) Osteopontin is up-regulated in human decidual stromal cells. *Fertil Steril* 81 Suppl 1: 741-748
- Vukicevic S, Kleinmann HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH (1992) Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 202: 1-8
- Waage A, Espevik T (1988) Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha / cachectin in mice. *J Exp Med* 167: 1987-1992
- Waterhouse P, Parhar RS, Cuo X, Lala PK, Denhardt DT (1992) Regulated temporal and spatial expression of the calcium-binding proteins calcyclin and osteopontin in mouse tissues during pregnancy. *Mol Reprod Devel* 32: 315-323
- Weber GF, Cantor H (1996) The immunology of Eta-1/Osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* 7 (3): 241-248
- White TEK, di Sant'Agnese PA, Miller RK (1990) Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 636-642
- Wincek TJ, Meyer TK, Meyer MR (1991) Absence of a direct effect of recombinant tumor necrosis factor-alpha on human sperm function and murine preimplantation development. *Fertil Steril* 56: 332-339
- Winterhager E, Mulholland J, Glasser SR (1994) Morphological and immunohistochemical differentiation patterns of rabbit uterine epithelium in vitro. *Anat Embryol* 189: 71-79
- Wu MH, Chuang PC, Chen HM, Lin CC, Tsai SJ (2002) Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation. *Mol Hum Reprod* 8: 456-464
- Yamaguchi M, Yoshimoto Y, Komura H, Koike K, Matsuzaki N, Hirota K, Miyake A, Tanizawa O (1990) Interleukin 1beta and tumour necrosis factor stimulate the release of gonadotrophin-releasing hormone and interleukin 6 by primary rat hypothalamic cells. *Acta Endocrinol* 123: 476-480
- Yarden Y, Ullrich A (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 443-478

- Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW (1990) cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7: 491-502
- Zarmakoupis PN, Rier SE, Maroulis GB, Becker JL (1995) Inhibition of human endometrial stromal cell proliferation by Interleukin 6. *Hum Reprod* 10 (9): 2395-2399
- Zepf C (2003) Integrin- und pro-inflammatorische Zytokine im humanen Endometrium – immunhistochemische Untersuchungen zur Expression und in vitro-Studien zur Regulation anhand eines optimierten Zellkulturmodells. Unveröffentlichte Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor i.R. der Frauenklinik im Klinikum Großhadern, Herrn Prof. Dr. med. H. Hepp für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. T. Strowitzki für die freundliche Unterstützung bei organisatorischen Fragen vor Beginn und während der experimentellen Phase meiner Arbeit.

In besonderem Maße bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. von Wolff für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation. Die stets freundschaftliche Atmosphäre und sachkundige Hilfe in allen Teilbereichen dieser Arbeit trugen entscheidend zum Gelingen bei.

Herrn Prof. Dr. med. W. Jonatha, Chefarzt der Frauenklinik des Krankenhauses München Harlaching und Herrn Dr. med. Graf Burquoy, Chefarzt der Frauenklinik des Krankenhauses Dritter Orden in München sowie deren Mitarbeitern danke ich für das Interesse an meiner Studie und die bereitwillige Kooperation bei der Asservierung der Gewebeproben.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors der Frauenklinik Großhadern - insbesondere Frau Fileki und Frau Felber - danke ich für die freundliche Aufnahme und ihre unentbehrliche Hilfestellung bei der Laborarbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. G. van den Boogaart für die fachkundliche Beratung bezüglich der statistischen Fragen meiner Arbeit.

Frau Dr. med. C. Boll danke ich für die kritische und fruchtbare Diskussionsbereitschaft beim Entwurf dieses Manuskripts.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann für sein Verständnis und seinen Beistand in jeder Phase meiner Dissertation. Meinen Eltern, meiner Schwester sowie meiner ganzen Familie und Schwiegerfamilie danke ich außerdem für ihr beständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und ihre unermüdliche Hilfe bei der Betreuung unserer Kinder, während diese Promotionsschrift entstand. Ebenso danke ich meinen Freunden (besonders Frau E. Billenstein, Familie Just und Familie Hepe) für ihre moralische und praktische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Hariett Stieger, geb. Reisenbüchler
Geburtsdatum: 10. April 1973
Geburtsort: Fogarasch/ Rumänien
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

1979 - 1986 Deutsche Allgemeinschule in Fogarasch/ Rumänien
1987 - 1990 Agnes-Bernauer-Realschule Augsburg (Mittlere Reife)
1990 - 1991 Gisela Gymnasium München (Anschlussklasse)
1991 - 1993 Rudolf-Diesel-Gymnasium Augsburg (Allgemeine Hochschulreife)

Studium

11/1993 - 11/2000 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
09/1995 Ärztliche Vorprüfung
08/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1999 - 12/1999 PJ im Stanford University Medical Center, Frauenklinik
in Stanford, USA
01/2000 -03/2000 PJ im San Jose Medical Center, Abt. Allgemeinchirurgie in San Jose,
USA
03/2000 - 04/2000 PJ im San Francisco General Hospital, Abt. Unfallchirurgie
in San Francisco, USA
05/2000 - 08/2000 PJ im Alameda County Hospital, Medizinische Klinik,
in Oakland, USA
11/2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

07/2001 - 11/2002 ÄIP in der gynäkologischen Belegarztpraxis Dr. Gautier/
Dr. Józsa/ Dr. Boll im Kreiskrankenhaus Ochsenhausen
Seit 12/2002 Assistenzärztin in der Frauenklinik im Klinikum Landsberg am Lech
(z.T. im Erziehungsurlaub)