

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Großhadern der
Ludwig- Maximilians- Universität München
Vorstand: Prof. Dr. H. Hepp

**Untersuchungen zur Expression und Regulation von Interleukin-6 und Vascular-
Endothelial- Growth- Faktor (VEGF) im humanen Endometrium**

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

vorgelegt von
Julia Bücking
aus Erlangen
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. C. J. Thaler

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Gerber

Prof. Dr. R. Mocikat

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2003

Abkürzungsverzeichnis

AF:	Amnionflüssigkeit
BSA:	Bovines Serum-Albumin
BSF-2:	B-Zellen stimulierender Faktor
CNTF:	Ciliary-neutrophic-factor
CRP:	C-reaktives Protein
DAB:	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCS:	fetal-calf-serum
flt-1:	Fms-like tyrosine kinase
β HCG:	β human chorionic gonadotropine
HIF- α :	hypoxia-inducible-factor- α
HRP:	horse-radish-peroxidase
HSF:	Hepatozyten-stimulierender Faktor
IFN- β 2:	Interferon- β 2
IFN- γ :	Interferon- γ
IL-1 α :	Interleukin-1 α
IL-1 β :	Interleukin-1 β
IL-6:	Interleukin-6
KDR:	kinase insert domain receptor
LIF:	leukaemia-inhibitory-factor
NF:	nuclear factor
OSM:	Onkostatin M
PBMC:	periphere mononukleäre Zellen
PBS:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
rzf:	relative Zentrifugalbeschleunigung
TMB:	Tetramethylbenzidin-Peroxid
tPA:	tissue-plasminogen-activator
uPA:	urokinase-plasminogen-activator
UTR:	untranslated region
VEGF:	Vascular-Endothelial-Growth-Faktor
VEGFR:	VEGF-Rezeptoren

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	3
II. MATERIAL UND METHODEN	5
2.1 Patientenauswahl und Datierung der Gewebeproben	5
2.2 Zytokinkonzentration in Uterussekreten	5
2.2.1 Sekretaufarbeitung.....	6
2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry.....	6
2.2.3 ELISA.....	7
2.2.4 Auswertung.....	7
2.3 Zytokinexpression im Gewebeschnitt.....	8
2.3.1 Anfertigung der Schnitte	8
2.3.2 Immunhistochemie.....	8
2.3.3 Auswertung.....	9
2.4 Regulation der Zytokine in vitro	10
2.4.1 Zellkultur von Epithel- und Stromazellen.....	10
2.4.2 Versuche an Zellkulturen	11
2.4.2.1 Stimulation mit 17 β -Östradiol und Progesteron	11
2.4.2.2 Entzug von 17 β -Östradiol und Progesteron.....	11
2.4.2.3 Zytokinstimulation	12
2.4.2.4 Hypoxie.....	12
2.4.3 ELISA.....	13
2.4.3.1 Etablierung und Durchführung der ELISA.....	13
2.4.3.2 Auswertung.....	14

III. ERGEBNISSE	15
3.1 Nachweis von VEGF im Gewebeschnitt.....	15
3.2 Nachweis von VEGF im Uterussektret	18
3.3 Untersuchungen im Zellkulturmodell zur Regulation von IL-6 und VEGF	20
3.3.1 Regulation von IL-6 und VEGF durch 17 β -Östradiol- und Progesteronstimulation sowie durch Östradiol- und Progesteronentzug	20
3.3.2 Regulation von IL-6 und VEGF durch IL-1 β , LIF und IL-6 Stimulation	20
3.3.3 Regulation von IL-6 und VEGF durch Hypoxie	22
IV. DISKUSSION	28
4.1 Endometriale Expression und Funktion von IL-6.....	28
4.2 Endometriale Expression und Funktion von VEGF	33
4.3 IL-6, VEGF und deren Regulation durch 17β- Östradiol und Progesteron	37
4.3.1 IL-6 und dessen Regulation durch 17 β - Östradiol und Progesteron	37
4.3.2 VEGF und dessen Regulation durch 17 β - Östradiol und Progesteron.....	39
4.4 IL-6, VEGF und deren Regulation durch Zytokine	41
4.4.1 IL-1 und dessen Regulation von IL-6 und VEGF	41
4.4.2 LIF und dessen Regulation von IL-6 und VEGF	43
4.4.3 IL-6 und dessen Regulation von VEGF.....	44
4.5 IL-6, VEGF UND DEREN REGULATION DURCH HYPOXIE	46
4.5.1 IL-6 und dessen Regulation durch Hypoxie	46
4.5.2 VEGF und dessen Regulation durch Hypoxie.....	47
V. ZUSAMMENFASSUNG	49
VI. LITERATURVERZEICHNIS	52
VII. LEBENSLAUF	59

I. EINLEITUNG

Das menschliche Endometrium ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das sehr genauen Regulationsmechanismen unterliegen muss, um die Implantation und das Wachstum eines Embryos zu ermöglichen. Diese Regulation findet zum einen über die beiden Steroidhormone 17 β -Östradiol und Progesteron statt, zum anderen durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, deren Regulation und genaue Kommunikation untereinander noch zum größten Teil unverstanden ist.

Viele vorhergehende Studien haben die Relevanz der Expression des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) im endometrialen Zellverband für das Entstehen und den Erhalt einer frühen Schwangerschaft in den Mittelpunkt gerückt. So wurde gezeigt, dass IL-6 in Zyklen von Patientinnen mit gehäuft auftretenden frühen Aborten in der mittleren Sekretionsphase supprimiert ist (von Wolff *et al.* 2000). Die Interleukin-6 Konzentration zeigt einen typischen zyklischen Verlauf mit hohen IL-6- Spiegeln in der Sekretionsphase zur Zeit des Implantationsfensters (Tabibzadeh *et al.* 1995), was eine Rolle von IL-6 bei der Implantation der Blastozyste und der Etablierung einer Schwangerschaft nahe legt. Dies hat uns dazu bewogen die Regulation von IL-6 anhand von gut charakterisierten Zellkulturen genauer zu untersuchen. Die immunhistochemische Analyse von IL-6 wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits in vorhergehenden Studien vorgenommen.

Wie schon erwähnt scheint auch den Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Implantation zuzukommen. Die erfolgreiche Etablierung einer Schwangerschaft erfordert die physiologische und anatomische Adaptation des Endometriums durch endokrine Regulation, optimale Abstimmung des Immunsystems, sowie der Gefäßversorgung. Bei letzterem scheint VEGF einer der wesentlichen verantwortlichen Faktoren zu sein. Dies machten Versuche mit VEGF- genmanipulierten Tieren deutlich, bei denen keine intakte Schwangerschaft zustande kam. Wie im Fall von IL-6 zeigt sich auch bei VEGF ein typisches Verteilungsmuster im Verlauf des Zyklus mit verstärktem Auftreten in der Sekretionsphase im Vergleich zur Proliferationsphase (Weston & Rogers 2000).

Die genauen Regulationsmechanismen sind auch im Fall von VEGF noch weitgehend ungeklärt. Dies veranlasste uns zum einen dazu die Verteilung von VEGF

immunhistochemisch in verschiedenen Zyklusphasen zu untersuchen, zum anderen parallel hierzu die Konzentration von VEGF als sekretorischem Protein im Cavum Uteri zu messen. Um die Regulation von VEGF genauer zu verstehen wurden sowohl Epithel- als auch Stromazellen unter 17β - Östradiol und Progesteron, Stimulation durch IL- 1β , LIF und IL-6 sowie unter Hypoxie kultiviert.

II. Material und Methoden

2.1 Patientenauswahl und Datierung der Gewebeproben

Folgende Kriterien waren Voraussetzung für die Teilnahme an der vorliegenden Studie: Die Patientinnen mussten sich in der prämenopausalen Phase mit regelmäßigem Zyklus befinden und durften sich bis 3 Monate vor der Operation keiner hormonellen bzw. antihormonellen Therapie unterzogen haben. Auch durfte kein maligner Prozess bekannt sein. Das maximale Alter betrug 50 Jahre. Weitere Ausschlusskriterien waren Intrauterinpolypen, Hyperplasien, Polypen, sowie zystische Veränderungen des Uterus. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen von Hysterektomien im Operationssaal der Kliniken München-Großhadern, München-Harlaching, sowie München- Klinikum Dritter Orden .

Die Datierung der Proben fand anhand folgender Kriterien statt:

- Anamnese (Zyklusdauer und letzte Blutung)
- 17 β -Östradiol- und Progesteronwert-Bestimmung im Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern
- Gewebeschnitte des Endometriums

Im Kryostatmikrotom wurden Gewebsschnitte mit einer Dicke von 7-10 μ m Stärke angefertigt, und einer HE-Färbung unterzogen. Daraufhin folgte die Datierung anhand zyklusabhängiger Merkmale. Unter Berücksichtigung dieser drei Informationen konnte eine Einteilung der Proben in folgende Zyklusstadien stattfinden:

- 1.-14. Tag: Proliferationsphase
- 15.-19.Tag: frühe Sekretionsphase
- 20.-23.Tag: mittlere Sekretionsphase
- 24.-28. Tag: späte Sekretionsphase

2.2 ZytokinKonzentration in Uterussekreten

Die Sekretentnahme erfolgte im Rahmen der Hysterektomien mit Hilfe eines Prevical-Katheters (Nourypharma, Oberschleißheim, Deutschland). Das Cavum Uteri wurde sondiert und Sekret durch axiale Drehung des Katheters aus dem Cavum entnommen. Die Probe

wurde nun in 0,5 ml PBS enthaltende Eppendorf-Cups gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1 Sekretaufarbeitung

Vor der Weiterverarbeitung wurden die Sekretproben 10 min bei 16,1 rzb (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Entzug von im Sekret enthaltenen Zellen abpipettiert und zur Proteinbestimmung nach Lowry verwendet. Die Proben für den Einsatz im ELISA unterlagen dem gleichen Vorgang.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Um die später per ELISA gemessene Menge an VEGF auf die Gesamtmenge an Protein beziehen zu können, wurde diese anhand der Proteinmessung nach Lowry bestimmt.

Dabei handelt es sich um eine Modifikation der Biuret-Methode, die sich auch für den Einsatz bei sehr niedrigen Proteinmengen eignet. Das Prinzip der Biuret-Methode beruht darauf, dass Cu^{2+} -Ionen mit Stickstoff-Atomen von Peptidbindungen im alkalischen Milieu rotviolette Komplexe bilden, die bei 546 nm photometrisch messbar sind. Zugewetztes Tartrat hat die Aufgabe, Cu^{2+} zu komplexieren, da dieses sonst als $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ausfallen würde. Bei der Proteinbestimmung nach Lowry reduzieren die Kupfer-Peptidkomplexe nachgeschaltet Folin-Reagenz (Phosphormolybdat/ Phosphorwolframat) zu Molybdänblau. Die sich ergebende Farbintensität ist proportional der Anzahl der Peptidbindungen und von der sonstigen chemischen Zusammensetzung des Proteins unabhängig.

Stark hämolytisch gefärbte Proben wurden aussortiert, da durch enthaltenes Hämoglobin die Proteinmenge stark erhöht erscheinen würde.

Der Versuchsansatz wurde folgendermaßen durchgeführt:

20 μl der Patientenprobe wurden mit 100 μl Reaktionsreagenz gemischt, das aus folgenden Substanzen bestand:

1 ml 1% Kupfersulfatlösung;

1 ml 2% Kalium-Natrium-Tartratlösung, aufgefüllt auf 100 ml mit 2% Natriumkarbonat/ Natronlauge.

Abschließend wurden 100 µl Folin-Ciocalteus Phenol-Reagenz hinzugefügt. Die nun folgende Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur, danach wurde die Extinktion bei 546 nm abgelesen. Aus der entsprechenden, im Versuchsansatz mitgeführten Standardreihe ergab sich nun die in Doppelwerten bestimmte Gesamtproteinmenge der jeweiligen Probe.

2.2.3 ELISA

Um die Menge an im Sekret enthaltenem VEGF zu messen, unterlagen die Proben der gleichen Vorbereitung wie bei obiger Bestimmung der Gesamtprotein-Menge nach Lowry. Der VEGF-Gehalt wurde mit dem kommerziell erhältlichen Quantikine, Anti-Human VEGF-ELISA der Firma R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Dieser enthielt alle benötigten Reagenzien. Die Messung und Auswertung fand an einem Mikroplatten-Photometer (MS 2, Titertek Plus ICN) mit einem verbundenen IBM-kompatiblen PC mit entsprechender Software (EIA, Version 3.10 ICN Biomedicals GmbH, Stefan Ufer) statt. Die Details zur Durchführung des Versuchs sind der beigefügten Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird unter Punkt 2.4.3.1 näher auf das Prinzip des ELISA eingegangen.

Die Sekretproben wurden unverdünnt eingesetzt und in Doppelwert-Bestimmung gemessen. Unter Berücksichtigung der Leer- und Standardwerte mit genau definierter Antigen-Menge konnten somit die korrespondierenden VEGF-Konzentrationen der Patienten-Proben bestimmt werden.

2.2.4 Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 98 und des Statistikprogramms SPSS, Version 10.0 für Windows 95/ 98/ NT des Leibniz-Rechenzentrums der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, München durchgeführt. Für die Analyse der Sekretdaten wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

2.3 Zytokinexpression im Gewebeschnitt

2.3.1 Anfertigung der Schnitte

Die im Operationssaal entnommenen Endometriumsproben wurden in Eppendorf-Cups (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) sofort in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt. Die weitere Lagerung fand bei -80°C statt. Um den Gewebeblock schnittfest zu machen, wurde Tissue Tek (Sakura, Niederlande) im Wasserbad auf circa -10°C gebracht. Nun wurden die Blöcke im Cryotom mit Tissue Tek benetzt und bei -25°C zum Erstarren gebracht. Die jetzt angefertigten Schnitte wiesen eine Dicke von 7-10 μm auf.

2.3.2 Immunhistochemie

Die im Kryotom (Shandon, Cheshire, England) angefertigten Schnitte wurden auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgebracht und zunächst 2-3 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung der Präparate erfolgte 10 Minuten in 5°C kaltem Aceton, woran sich nach erneutem Trocknen die Blockade der endogenen Peroxidase in 3% Wasserstoffperoxid in Methanol anschloss. Daraufhin wurden die Schnitte 10 Minuten in PBS (PBS-Puffer, pH 7,4, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) gewässert, um Reste des Wasserstoffperoxid- Gemisches zu entfernen.

Nun schloss sich ein erneuter Blockierungsschritt in feuchter Kammer mit 10% Serum in PBS der Spezies an, von der auch der Sekundärantikörper stammt (Inkubationszeit 30 Minuten, Raumtemperatur). Ziel ist es, die unspezifische Bindung des Primärantikörpers an freie geladene Kollagen- und Bindegewebsstellen zu verhindern.

Daraufhin wurden durch kräftiges Abklopfen Reste der Lösung entfernt.

Nun wurde die eigentliche immunhistochemische Färbung mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Methode vorgenommen. Dafür werden die drei folgenden Reagenzien benötigt: Der Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu detektierende Antigen gerichtet ist; ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet, und schließlich als drittes Reagenz ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die vier freien Bindungsstellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase - und damit das gesuchte Antigen - wird mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht.

Der Primärantikörper (monoclonal mouse anti-human VEGF-antibody, Antikörper-Typ: Ig G_{2B} (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), Konzentration: 20µg/ml) wurde in 1,5% bovinem Serum-Albumin (BSA, Sigma, Steinheim, Deutschland) in PBS aufgetragen.

Außer dem Primärantikörper stammten die Substanzen aus dem „Histostain Kit for mouse primary antibody“ (Zymed Laboratories, San Francisco, U.S.A.).

Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Wässern in PBS wurde nun der Sekundärantikörper aufgetragen (Inkubationszeit 30 Min., Raumtemperatur) und danach erneut in PBS gewässert. Die nun folgende Streptavidin-HRP(horse-radish-peroxidase)-Lösung wurde für 10 Minuten auf den Schnitten belassen, daraufhin wiederum in PBS gewässert und schließlich das Chromogen DAB aufgetragen. Unter Sichtkontrolle wurde nun eine sinnvolle Färbung abgewartet, d.h. bis eine Färbung der gewünschten Strukturen sichtbar wurde, der Hintergrund aber noch keine zu deutliche unspezifische Färbung aufwies. Die Inkubationszeit wurde dementsprechend auf 10 Minuten festgelegt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser gestoppt.

Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen der spezifische Primärantikörper durch unspezifische Antikörper der gleichen Klasse in gleicher Konzentration ersetzt wurde. Somit trat an die Stelle des Primärantikörpers Ig G_{2B} (Dako).

2.3.3 Auswertung

Die Bewertung der Präparate fand anhand der Intensität der immunhistochemischen Färbung statt, wonach vier Gruppen unterschieden wurden:

- 0= keine Anfärbbarkeit ,
- 1= sehr schwache Anfärbbarkeit ,
- 2= mittlere Anfärbbarkeit ,
- 3= starke Anfärbbarkeit .

2.4 Regulation der Zytokine in vitro

2.4.1 Zellkultur von Epithel- und Stromazellen

Die entnommenen Endometriumszellen wurden zum Transport in Röhrchen mit 4 ml 10%igem FCS-Medium gegeben.

Zusammensetzung des Mediums:

Phenolrotfreies DMEM / HAM's F12 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

+ 10 % FCS (Gibco, Eggenstein, Deutschland)

+ 0,2% Zienam 500 (MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland)

+ 0,4% Nystatin (200.000 I.E./Liter), (Lederle Arzneimittel GmbH, Wolfratshausen, Deutschland).

Eine Auftrennung des endometrialen Zellverbandes erfolgte mittels enzymatischer Digestion:

Im Labor wurde das Gewebe in einer Petrischale mit dem Skalpell in circa 1 mm³ große Stücke zerteilt. Nun wurden 500 µl Kollagenase Typ 1A zugegeben und bei 37°C 1 Stunde im Wasserbad inkubiert.

Darauf folgten zwei Filtrationsschritte:

1) Nylonfilter mit 180 µm Porengröße (Millipore, Bedford, U.S.A.), wodurch Verunreinigungen wie größere Gewebefragmente, Sekretreste, usw. eliminiert wurden.

2) 40 µm Porengröße (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, U.S.A.), wodurch eine Trennung von Stromazellen und Erythrozyten von Epithelzellschläuchen, die vom Sieb zurückgehalten wurden, erfolgte.

Die Epithelzellschläuche wurden zur weiteren Kultivierung ausgestreut.

Passagieren der Stromazellen

Die Stromazellen wurden einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen.

Der erste Mediumswechsel erfolgte 24 Stunden nach dem Ausstreuen. Dadurch wurden ein Großteil der Erythrozyten und die restlichen Epithelzellen entfernt. Nach weiteren 24 oder 48 Stunden erfolgte, je nach Morphologie des Zellteppichs, ein erneuter Mediumwechsel, woraufhin mit PBS gespült wurde, um dann 10 %-iges Trypsin hinzufügen zu können. Die

Stromazellen lösten sich vom Boden der Zellkulturflasche, wurden erneut zentrifugiert, und die Überstände abpipettiert. Sie wurden nun auf einer 24-well Platte (Becton- Dickinson, U.S.A.) mit einer Zellzahl von 100 000 / well ausgestreut.

Der Tag der Passagierung entspricht Tag 0 der Kultivierung.

2.4.2 Versuche an Zellkulturen

2.4.2.1 Stimulation mit 17 β -Östradiol und Progesteron

Es wurde zunächst 10 %-iges FCS Medium ohne Hormonzusatz verwendet und alle 2 Tage gewechselt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn fanden eine Abnahme der Überstände und die Reduktion auf 1%-iges FCS-Medium statt.

Die Zellen wurden am nächsten Tag mit folgenden Konzentrationen an Progesteron und 17 β -Östradiol stimuliert:

-10⁻⁹ molar 17- β -Östradiol

-10⁻⁷ molar Progesteron

-10⁻⁹ molar 17- β -Östradiol und 10⁻⁷ molar Progesteron (beide von Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Es wurden je zwei wells pro Versuchsansatz und Zellfraktion (Stroma- und Epithelzellen) angelegt, um Überstände nach 24 Stunden abnehmen zu können. Auch wurden je 2 Kontrollen mitgeführt, die keiner Stimulation unterlagen.

2.4.2.2 Entzug von 17 β -Östradiol und Progesteron

10 % FCS-haltiges Medium mit Hormonzusatz wurde ebenso wie im vorherigen Versuch alle 24 Stunden gewechselt. Die Konzentration an 17 β -Östradiol betrug 10⁻⁹, die an Progesteron 10⁻⁷.

Nachdem ein konfluierender Zellteppich entstanden war, wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf 1%-iges FCS Medium (hormonhaltig) umgestellt. Nun wurden die Überstände abgenommen und auf hormonfreies 1% FCS-haltiges Medium umgestellt.

Auch hier wurden wieder Doppelwerte nach 6 und nach 24 Stunden erstellt, sowie Kontrollen ohne Hormonentzug mitgeführt.

2.4.2.3 Zytokinstimulation

Die Zytokinstimulation fand mit den folgenden 3 Substanzen statt:

- 1) Interleukin-1 β
- 2) Interleukin-6
- 3) LIF (leukaemia-inhibitory-factor) (alle von R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Die Konzentration der einzelnen Zytokine betrug je 10 ng/ ml.

Es wurde bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit hormonhaltigem (10^{-9} molar 17 β -Östradiol, 10^{-7} molar Progesteron) 10 % FCS enthaltendem Medium gefüttert, dann wurde auf 1%-iges FCS- Medium reduziert. Die Überstände wurden vor Versuchsbeginn abgenommen, dann fand eine Doppelwertbestimmung nach 24 Stunden statt. Auch wurden 2 entsprechende Kontrollen ohne Zytokinstimulation angelegt.

2.4.2.4 Hypoxie

Die Zellen wurden auch hier bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit hormonhaltigem (10^{-9} molar 17 β -Östradiol, 10^{-7} molar Progesteron) 10 % FCS-haltigem Medium gefüttert; auch hier wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf 1%-iges FCS- Medium umgestellt. Wieder wurden 2 Werte 24 Stunden nach Versuchsbeginn erstellt sowie 2 Kontrollen mitgeführt. Die Zellen wurden bei 37° C und Sauerstoffkonzentrationen von 2 % +/- 0,2 % kultiviert.

2.4.3 ELISA

2.4.3.1 Etablierung und Durchführung der ELISA

1) VEGF:

Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Kit der Firma R&D Systems (siehe Kap.2.2.3).

2) IL-6 :

Hier kamen DUO SET ELISAs, von R&D Systems zum Einsatz. Alle Substanzen, die zur Entwicklung eines ELISA benötigt werden, sind darin enthalten:

- Primärantikörper
- biotinylierter Sekundärantikörper
- HRP konjugiertes Streptavidin
- Tetramethylbenzidin-Peroxid (TMB) als Substrat

Duo Set ELISAs beruhen auf dem Sandwich-Prinzip, d.h. auf der Bindung von einem bestimmten Antigen durch einen für dieses Antigen spezifischen Antikörper. Der Primärantikörper wird an eine Mikrotiterplatte (Maxi Sorp, Nunc, Land) gebunden. Proben, Standard und Kontrollen werden zugegeben. Diese zu messenden Substanzen binden nun an den Primärantikörper. Der entstandene Komplex wird nun mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert, worauf die Zugabe von HRP-konjugiertem Streptavidin folgt. Avidin bindet mit seinen vier freien Bindungsstellen das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wird nun durch das Chromogen (Substrat) Tetramethylbenzidin-Peroxid sichtbar gemacht. Die Reaktion wird durch Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers bei 450 nm abgelesen. Anhand der Standardkurve lassen sich die entsprechenden Konzentrationen bestimmen.

Entscheidend bei der Optimierung der ELISAs ist die Titration von Primär- und Sekundärantikörper, um ein optimales Verhältnis von spezifischem Signal zu Hintergrundfärbung zu erzielen.

Hierbei gilt es nun, den optimalen niedrigen Hintergrundwert und gleichzeitig den höchstmöglichen Extinktionswert des Standards im messbaren Bereich ausfindig zu machen.

Vorteile eines DUO-Sets im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Fertig-KIT :

- Flexibilität
- niedrige Kosten
- Möglichkeit den Elisa an eigene Bedürfnisse anzupassen, z.B. die Standardkurve entsprechend der erwarteten Konzentrationen zu bestimmen.

Nachteile:

- größere Intra- und Inter-Assay-Varianz bei Duo-SETs
- Notwendigkeit zeitaufwendiger Testversuche, bis optimale Konzentrationen der Antikörper und des Standards erreicht sind.

2.4.3.2 Auswertung

Für die statistische Auswertung der ELISA-Daten wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Zur graphischen Darstellung diente Microsoft Excel 98.

III. ERGEBNISSE

3.1 Nachweis von VEGF im Gewebeschnitt

Um die Verteilung von VEGF sowohl in Bezug auf Verteilungsmuster innerhalb eines Schnittes, als auch dessen Konzentration im Verlauf des Zyklus beurteilen zu können, wurden 42 Endometriumsschnitte aus vier verschiedenen Zyklusphasen immunhistochemisch auf VEGF getestet. Die Ergebnisse wurden jeweils durch Doppelanfertigung und -bewertung der Endometriumspräparate bestätigt.

In der Proliferationsphase (n=10) war in 90% der Fälle keine Färbung der Drüsenstrukturen feststellbar, nur 10% der Schnitte zeigten eine schwache Farbreaktion.

In der Sekretionsphase stellten wir eine Zunahme der stark gefärbten Drüsenstrukturen mit Gipfel in der mittleren Sekretionsphase fest.

In der frühen Sekretionsphase (n=11) waren 82% der Schnitte schwach gefärbt, in der mittleren Sekretionsphase (n=11) zeigten 18% eine mittlere und 45% eine starke Färbung, in der späten Sekretionsphase (n=10) waren 20% der Schnitte mit mittlerer und 20% mit starker Färbung zu finden.

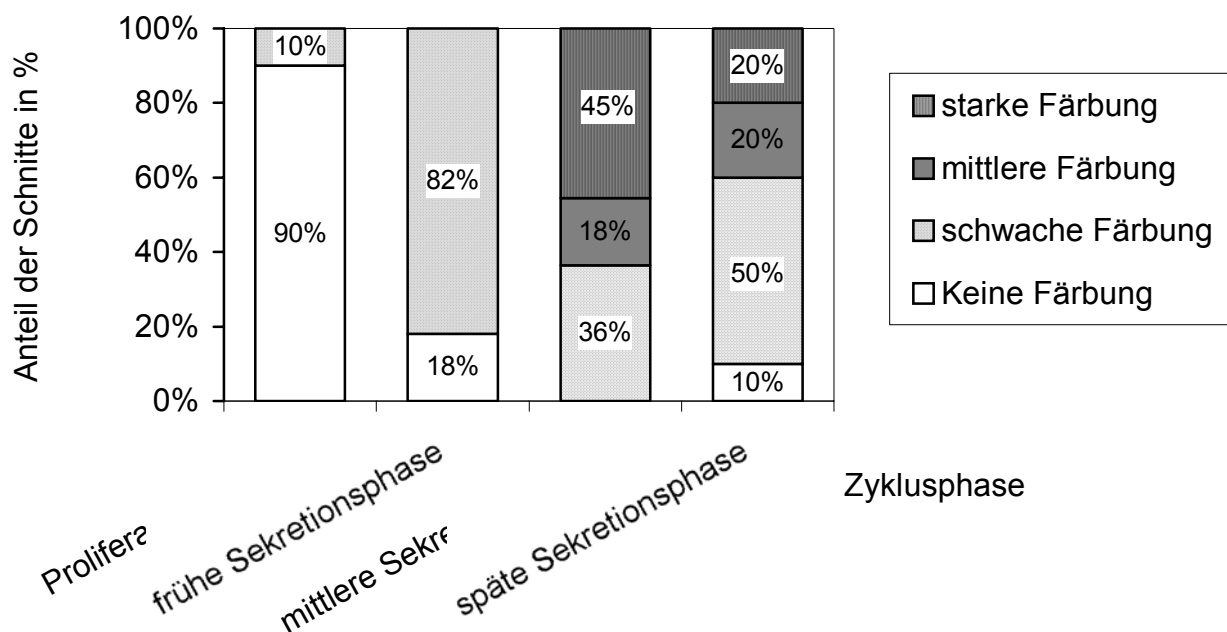


Abbildung 1:

Nachweis von VEGF durch Immunhistochemie im Verlauf des Zyklus

ZYKLUSPHASE	ZYKLUSTAG	KEINE FÄRBUNG	SCHWACHE FÄRBUNG	MITTLERE FÄRBUNG	STARKE FÄRBUNG
Proliferationsphase	1.-14.	90%	10%	0%	0%
frühe Sekretionsphase	15.-19.	18%	82%	0%	0%
mittlere Sekretionsphase	20.-23.	0%	36%	18%	45%
späte Sekretionsphase	24.-28.	10%	50%	20%	20%

Abbildung 2: Einzelwertdarstellung der Immunhistochemie

Es konnten in der Anfärbbarkeit weder Unterschiede zwischen Stratum basale und Stratum functionale des Endometriums, noch des Zytosols der epithelialen Drüsenzellen in den unterschiedlichen Zyklusphasen festgestellt werden. Im Fall der positiven Präparate zeigten sich gefärbte wie auch ungefärbte Drüsenstrukturen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander.

**BILD 1:**

Immunhistochemische Färbung des Endometriums durch VEGF- Antikörper, Kontrollschnitt, Vergrößerung 200 fach

**BILD 2:**

Immunhistochemische Färbung des Endometriums durch VEGF- Antikörper, Proliferationsphase, Vergrößerung 200 fach

**BILD 3:**

Immunhistochemische Färbung des Endometriums durch VEGF- Antikörper, Sekretionsphase, Vergrößerung 200 fach

**BILD 4:**

Immunhistochemische Färbung des Endometriums durch VEGF- Antikörper, Sekretionsphase, Vergrößerung 650 fach

Somit lässt sich ein zyklisches Verhalten von VEGF feststellen. Maximale VEGF-Konzentrationen finden sich nach unseren Ergebnissen in der mittleren Sekretionsphase. Hierbei ist jedoch kein typisches Verteilungsmuster innerhalb des Endometriums zu erkennen.

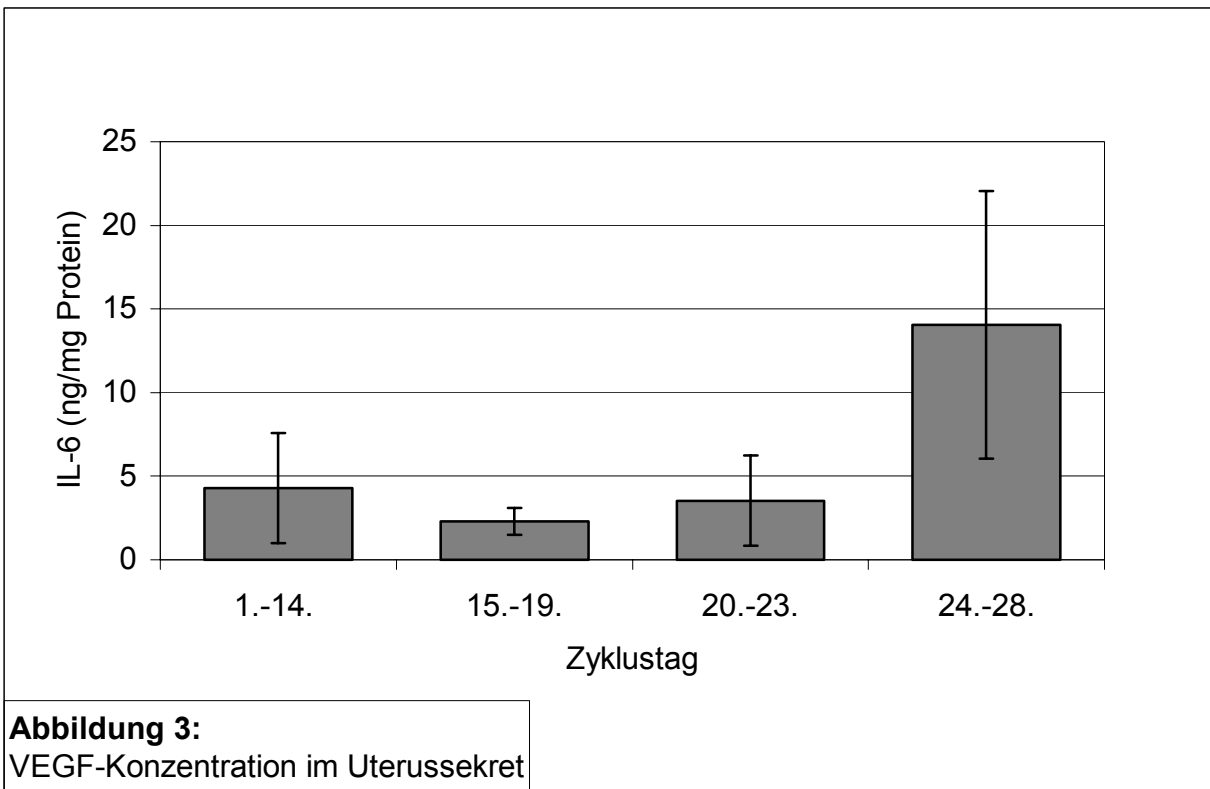
3.2 Nachweis von VEGF im Uterussekret

Nachdem im Gewebeschnitt in verschiedenen Zyklusphasen unterschiedliche Konzentrationen von VEGF vorgefunden werden konnten, interessierte uns nun die im Uterussekret vorhandene Menge an VEGF. Ziel war es auch hier, noch einmal die Veränderung der VEGF-Konzentration innerhalb des Zyklus zu beobachten. Von Bedeutung erschien auch, inwieweit die Konzentration im Schnitt und im Sekret korrelieren.

Der VEGF-Gehalt im Uterussekret im Verlauf des Zyklus wurde anhand von 39 Patientinnenproben ermittelt. Die mittels ELISA erhaltene Menge an VEGF wurde auf den Gesamtgehalt an Protein im Sekret bezogen.

Sowohl in der Proliferationsphase (n=17) als auch in der frühen (n=7) und mittleren Sekretionsphase (n=9) lagen die VEGF-Werte unter 6 % des Gesamtproteins.

Die höchsten VEGF-Konzentrationen wurden in der späten Sekretionsphase (n=6) mit einem durchschnittlichen VEGF-Wert von 14,4 ng/mg Protein gefunden; in der mittleren Sekretionsphase lag der Wert mit 3,5 ng/mg Protein deutlich niedriger. Dieses Ergebnis lässt sich mit der Immunhistochemie gut vereinbaren, bei der die Anfärbbarkeit in der mittleren Sekretionsphase am höchsten lag. Somit ist VEGF als sekretorisches Protein im Uterussekret am stärksten in der späten Sekretionsphase vorhanden.



Im Gegensatz zu dem vordergründigen Eindruck, dass ein deutlicher Anstieg des VEGF-Gehaltes in der späten Sekretionsphase stattgefunden hat, ergibt der Kruskal-Wallis-Test kein signifikantes Ergebnis. Somit ist zwar insgesamt ein positiver Trend zu verzeichnen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass lediglich ein Trend hin zu höheren VEGF-Konzentrationen gegen Ende des Zyklus auszumachen ist, sich bei der statistischen Auswertung jedoch kein signifikanter Unterschied der verschiedenen Zyklusphasen nachweisen lässt. Somit erscheint es schwierig, eine Aussage über die Korrelation der VEGF-Konzentration im Endometriumsschnitt und im Uterussekret zu treffen.

3.3 Untersuchungen im Zellkulturmodell zur Regulation von IL-6 und VEGF

3.3.1 Regulation von IL-6 und VEGF durch 17 β -Östradiol- und Progesteronstimulation sowie durch Östradiol- und Progesteronentzug

Die Zellkulturen (n=8), die einer Stimulation durch 17 β -Östradiol und Progesteron unterlagen, zeigten weder nach 6 noch nach 24 Stunden eine signifikante Änderung der VEGF- beziehungsweise der IL-6-Konzentration. Dies gilt sowohl für die Stroma- als auch für die Epithelzellkulturen.

Auch bei den Versuchsansätzen zum Verhalten der Stroma- und Epithelzellen unter Hormonentzug konnte kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden.

3.3.2 Regulation von IL-6 und VEGF durch IL-1 β , LIF und IL-6 Stimulation

Die Betrachtung der Zellkulturen unter Stimulation von IL-1 β , LIF und IL-6 erbrachten folgendes Resultat:

Ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration ist in der Stromazellkultur unter Stimulation von IL-1 β zu verzeichnen. Es war eine durchschnittliche Erhöhung auf das 77- fache nach 6 Stunden und nach 24 Stunden (n=5) auf das 286-fache des Ausgangswertes festzustellen. Bei Stimulation der Stromazellen durch LIF und IL-6 war keine Veränderung zu erkennen. Kein signifikantes Ergebnis konnte bei Betrachtung des IL-6- und VEGF-Wertes der Epithelzellkulturen verzeichnet werden. Auch der VEGF-Gehalt der Stromazellen ließ keine Veränderung erkennen.

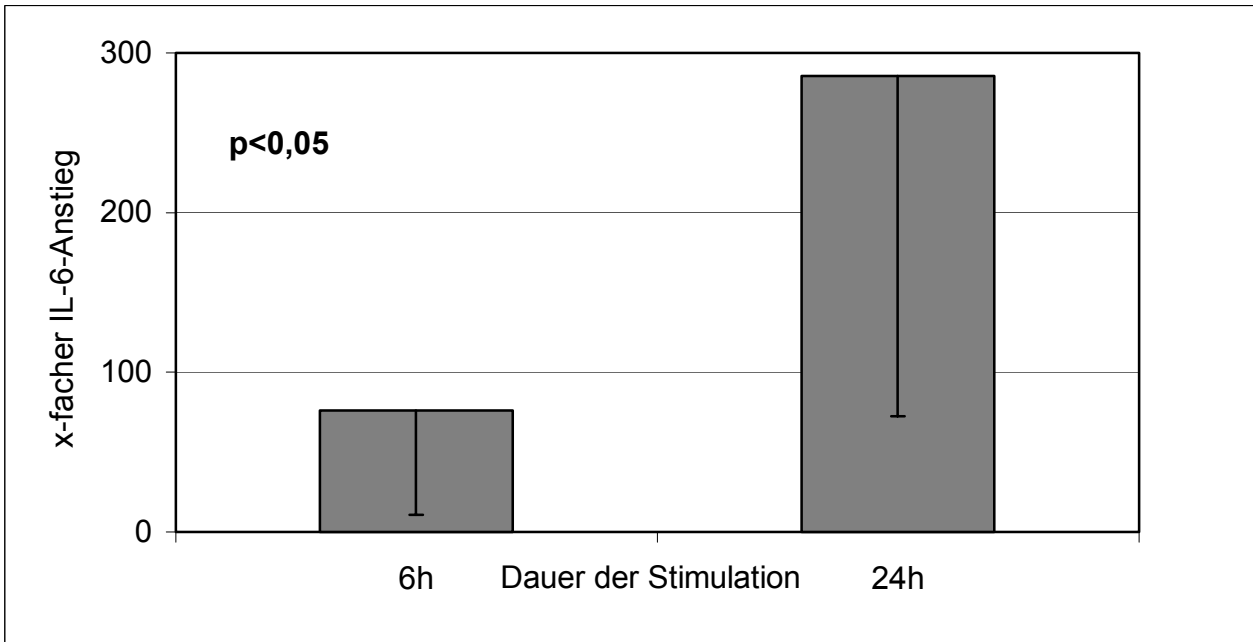


Abbildung 4:

Anstieg der IL-6-Konzentration im Stromazellüberstand unter IL-1-Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Mittelwerte

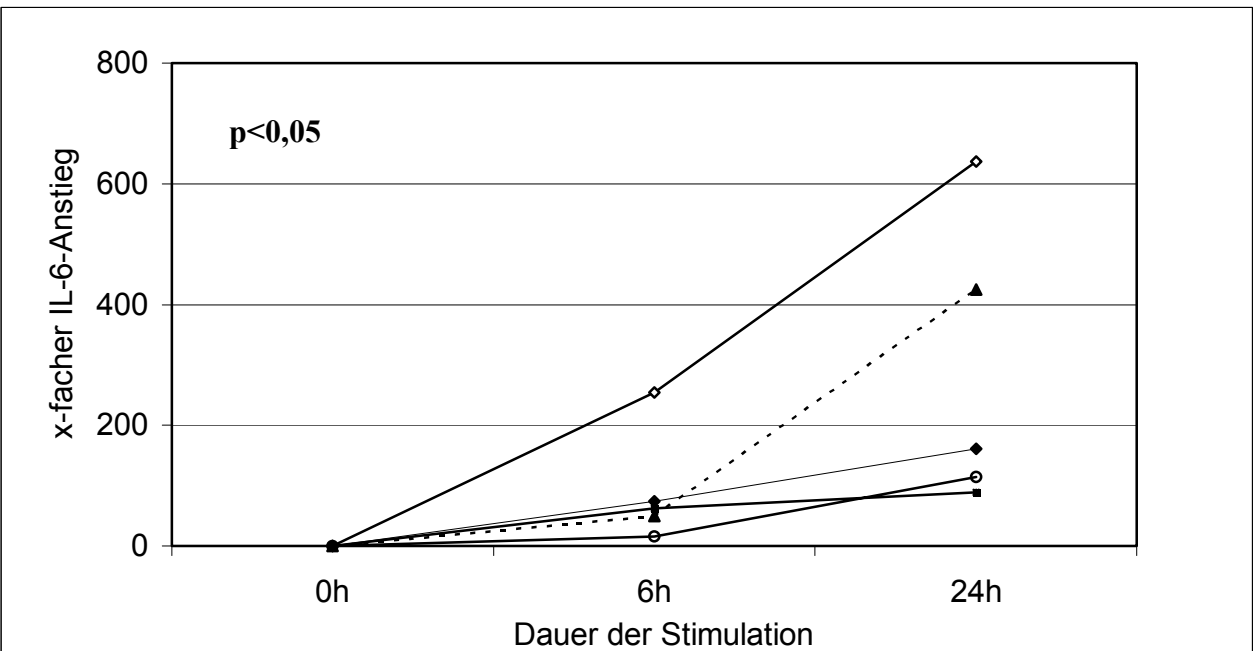


Abbildung 5 :

Anstieg der IL-6-Konzentration im Stromazellüberstand unter IL-1-Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Einzelwerte

3.3.3 Regulation von IL-6 und VEGF durch Hypoxie

Der Entzug von Sauerstoff ist in verschiedenen Zelltypen als stimulatorischer Faktor von IL-6 und VEGF bekannt. Daher sollte ein weiterer Regulationsmechanismus der beiden Faktoren genauer analysiert werden. Interessant hierbei erschien der unterschiedliche Ausprägungsgrad der Veränderung zwischen Epithel- und Stromazellen.

Der Entzug von Sauerstoff zeigte Auswirkung auf alle von uns angelegten Zellkulturen. Das Ausmaß der Veränderung unterschied sich wie im Folgenden dargestellt:

Die Stromazellen zeigten nach 6 Stunden eine Erhöhung der IL-6-Konzentration um durchschnittlich das 3,9-fache, nach 24 Stunden um das 9,6-fache; der Gehalt an VEGF stieg nach 6 Stunden um das 0,4-fache, nach 24 Stunden um das 4,7-fache.

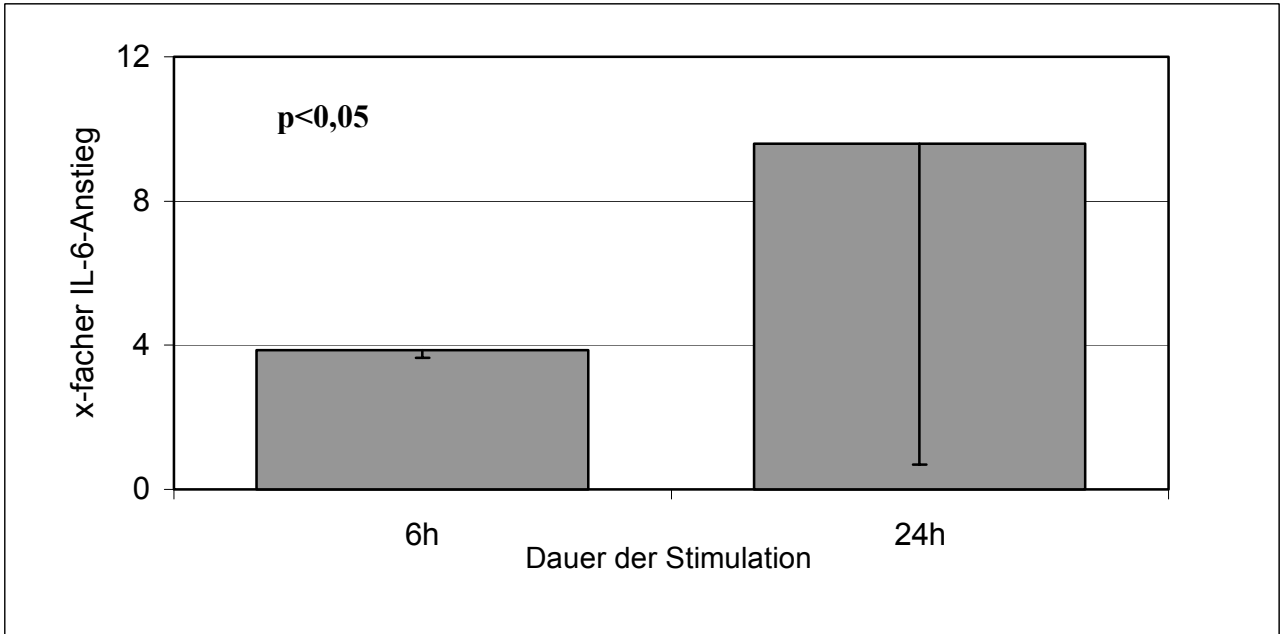


Abbildung 6 :

Anstieg der IL-6-Konzentration im Stromazellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Mittelwerte

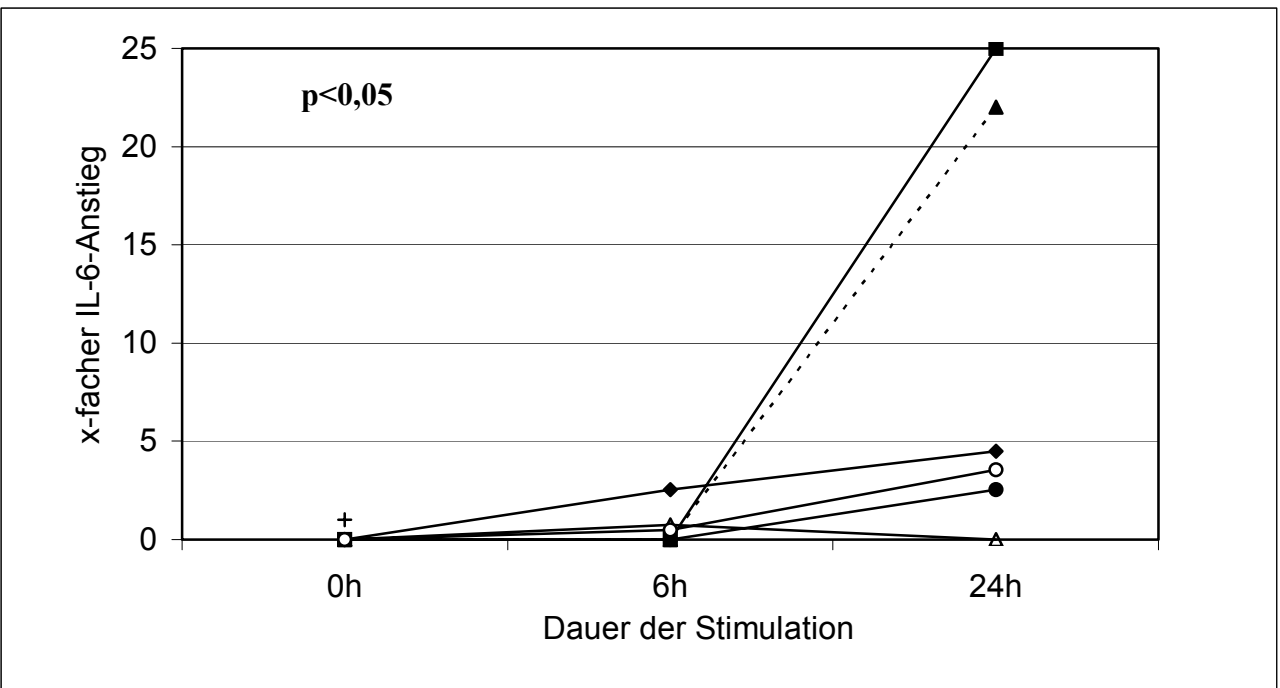


Abbildung 7 :

Anstieg der IL-6-Konzentration im Stromazellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Einzelwerte

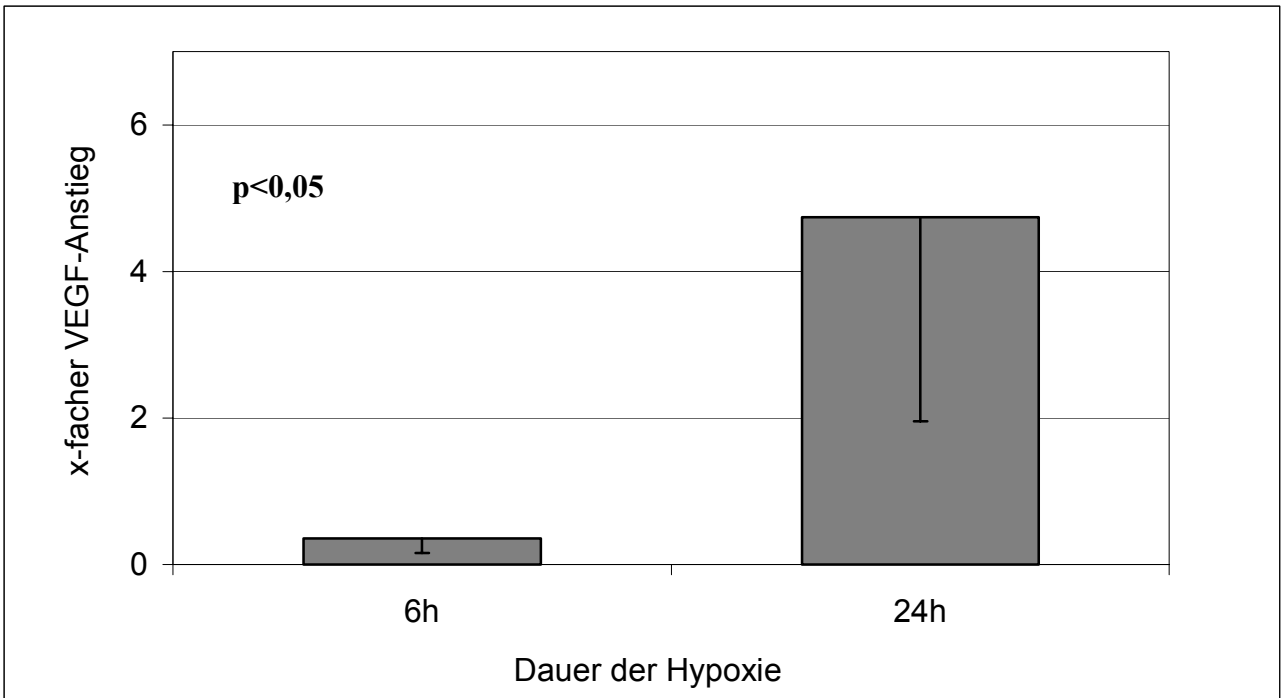


Abbildung 8 :

Anstieg der VEGF-Konzentration im Stromazellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer

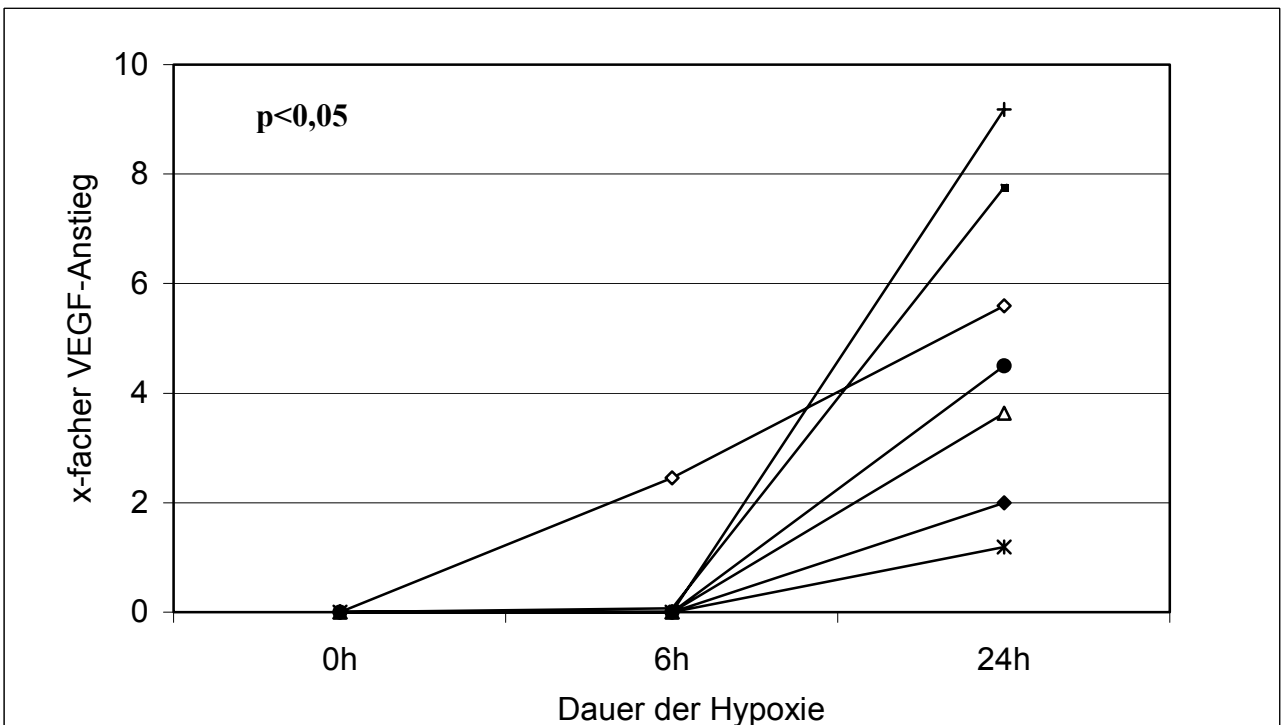


Abbildung 9 :

Anstieg der VEGF-Konzentration im Stromazellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Einzelwerte

In den Epithelzellkulturen ließen sich folgende Veränderungen feststellen:

Der IL-6 Gehalt erhöhte sich um den Faktor 0,2 nach 6 Stunden, beziehungsweise um 0,5 nach 24 Stunden. VEGF zeigte nach 6 Stunden noch keine signifikante Änderung im Vergleich zum Ausgangswert, nach 24 Stunden war jedoch eine Zunahme um das 1,6-fache auszumachen.

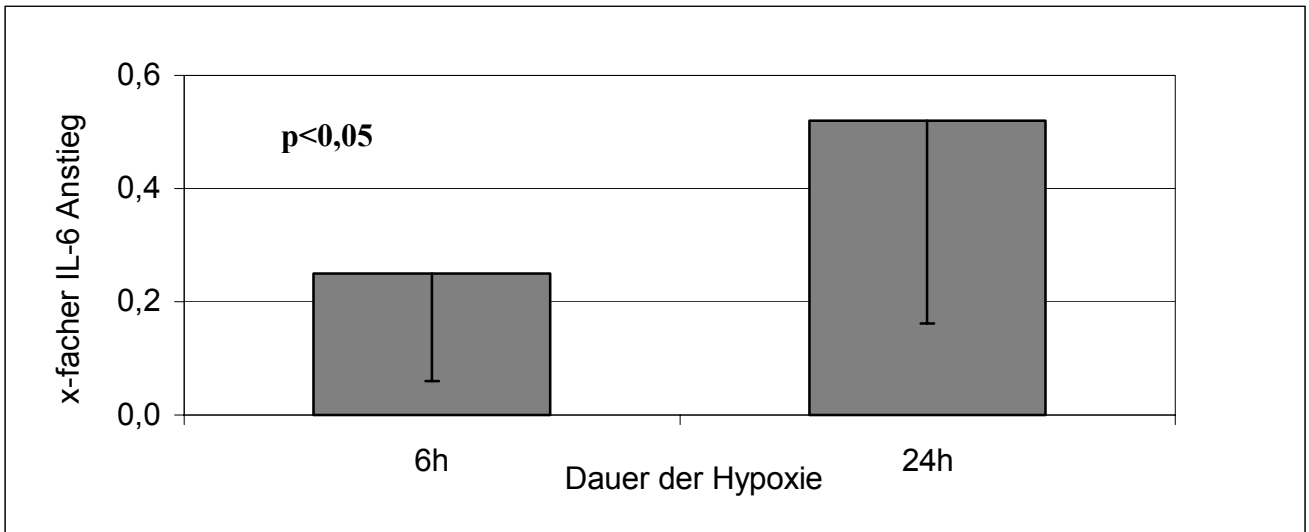


Abbildung 10 :

Anstieg der IL-6-Konzentration im Epithelzellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Mittelwerte

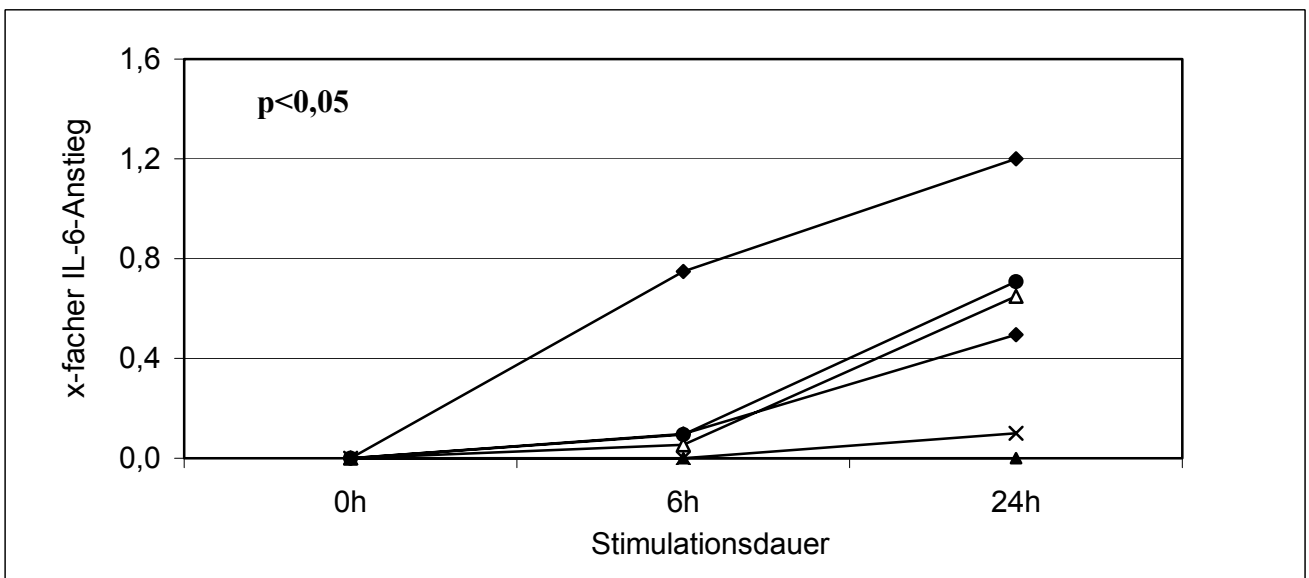


Abbildung 11:

Anstieg der IL-6-Konzentration im Epithelzellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Einzelwerte

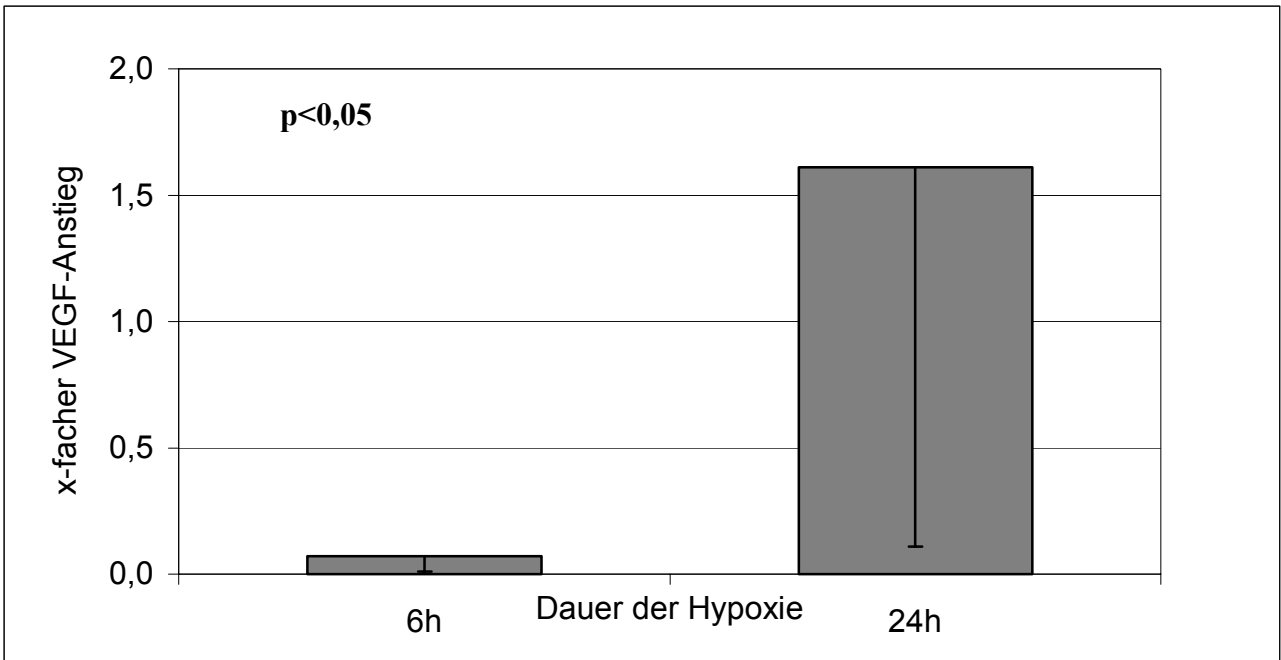


Abbildung 12 :

Anstieg der VEGF-Konzentration im Epithelzellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Mittelwerte

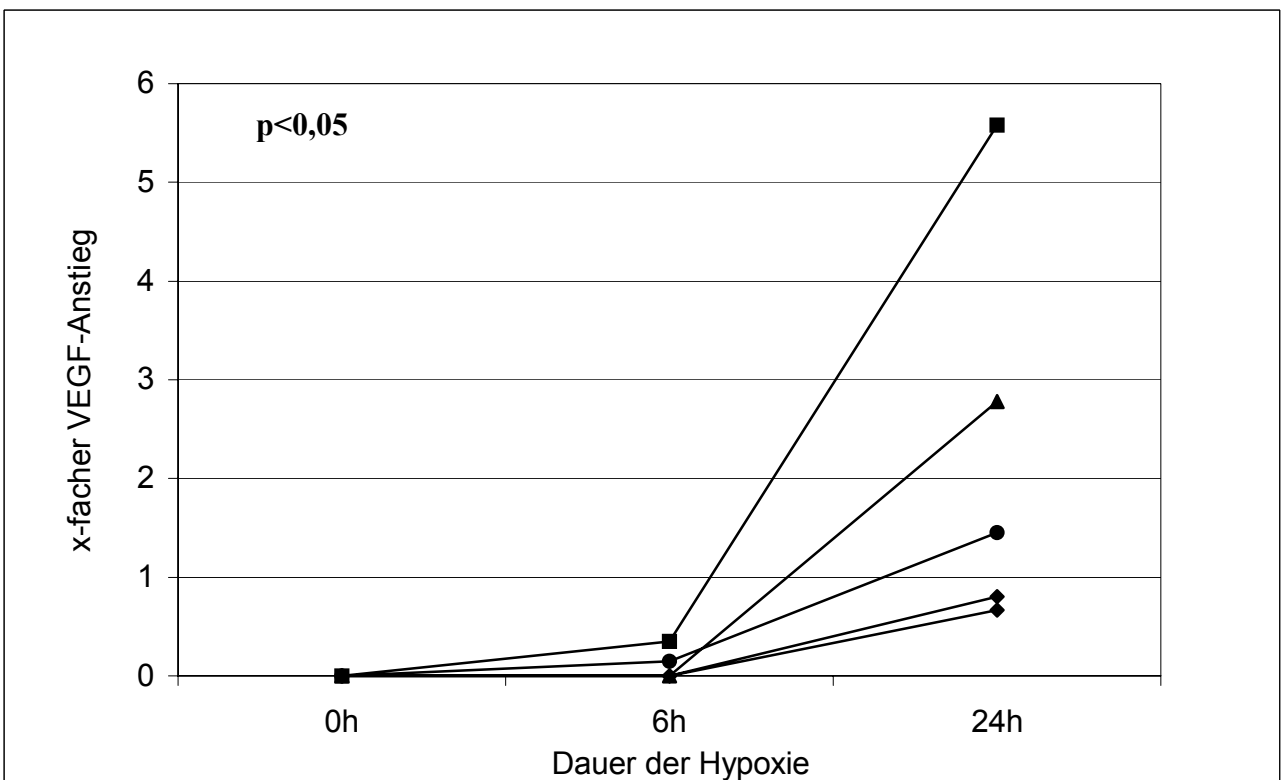


Abbildung 13 :

Anstieg der VEGF-Konzentration im Epithelzellüberstand unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, Darstellung der Einzelwerte

Somit zeigte sich, dass ein deutlicher Anstieg der VEGF- und der IL-6-Konzentration erst nach 24 Stunden Versuchsdauer zu erwarten ist. Auch zeigten die Stromazellen insgesamt eine deutlichere Erhöhung der Faktoren IL-6 und VEGF. In den Epithelzellkulturen war hingegen eine deutlich geringere Reaktion zu beobachten.

IV. DISKUSSION

4.1 Endometriale Expression und Funktion von IL-6

Zytokine haben eine vielfältige Bedeutung, z.B. als Reaktion auf Infektionen und Entzündungsprozesse, sowie als Induktoren anderer Zytokine. Sie gelten als Modulatoren der Zellproliferation und sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren und ihre Differenzierung zu beeinflussen (Giudice 1994). Im Falle eines Entzündungsprozesses wirken sie als Stimulatoren der Prostaglandine und weiterer Arachidonsäure-Abkömmlinge. Ihre Funktion beschränkt sich jedoch bei weitem nicht nur auf diesen Bereich.

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) war früher unter verschiedenen Namen bekannt, wie B-Zellen-stimulierender Faktor (BSF-2), Interferon- β 2 (IFN- β 2) oder auch Hepatozytenstimulierender Faktor (HSF). Der gemeinsame Name Interleukin-6 wurde eingeführt, als man durch Analyse der cDNA-Sequenzen bemerkte, dass all diese Moleküle in ihrer Struktur identisch sind. Bei IL-6 handelt sich um ein Phospho-Glykoprotein mit der atomaren Masse von 23-30 Kilo Dalton, das durch verschiedene Zelltypen exprimiert wird. Hierzu gehören sowohl Immunzellen, wie Monozyten und Lymphozyten, als auch Zellen, die nicht dem Immunsystem zugerechnet werden, wie Keratozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Wolvekamp & Marquet 1990). Interleukin-6 ist Teil einer Gruppe von strukturell ähnlichen Zytokinen, die den gleichen Signaltransduktions-Mechanismus über das transmembrane Protein gp 130 und über Tyrosinkinasen nutzen (Piquet-Pellorce *et al.* 1994). Weitere Vertreter dieser Gruppe von Zytokinen sind Onkostatin-M, Interleukin-11 und LIF.

Bisher bekannte Funktionen von Interleukin-6 umfassen die Regulation der Hämatopoese, sowie von Immun- und Akute-Phase-Reaktionen (Wolvekamp & Marquet 1990). Erhöhte IL-6-Spiegel konnten bei bestimmten Krankheitsbildern nachgewiesen werden, wie zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis, multiplem Myelom sowie bei systemischem Lupus erythematodes (Wolvekamp & Marquet 1990).

Eine bedeutende Funktion von IL-6 ist dessen wachstumshemmende Wirkung auf endometriale Stromazellen (Zarmakoupis *et al.* 1995). So zeigt sich in Stromazellen von Endometrioseherden, dass diese Zellen gegen die wachstumshemmende Wirkung resistent sind und auch der IL-6-Rezeptor vermindert erscheint. Im Peritonealsekret von Frauen mit

Endometriose ist der lösliche IL-6-Rezeptor verringert. Diese abweichende IL-6-Antwort könnte zum einen zu der vorhandenen Wachstums-Dysregulation beitragen, zum anderen könnten die veränderten IL-6-Spiegel eine Rolle spielen im Sinne einer erschwerten Implantation der Blastozyste (Rier *et al.* 1995). Die These, dass IL-6 bei der Implantation eine entscheidende Rolle zukommt, wird unterstützt durch die Tatsache, dass IL-6 in normalen Zyklen von Frauen mit gehäuft auftretenden frühen Aborten in der mittleren Sekretionsphase supprimiert ist (von Wolff *et al.* 2000).

Auch für den Verlauf einer Schwangerschaft scheint IL-6 eine wesentliche Rolle zu spielen, denn man findet erhöhte Werte in der Amnionflüssigkeit (AF) von Frauen mit vorzeitiger Wehentätigkeit und bei Frühgeburtlichkeit (Montes *et al.* 1995).

Eine Erhöhung der IL-6-Konzentration in der Amnionflüssigkeit gilt als aussagekräftigerer Vorhersageparameter für das Risiko einer Frühgeburt als der Nachweis einer bakteriellen Infektion. 33-70% der Frauen mit erhöhten IL-6-Konzentrationen in der AF, bei denen ein bakterieller Nachweis in der AF weder durch Kultur noch durch PCR gelingt, entbinden vor dem berechneten Geburtstermin.

Die infektionsinduzierte Stimulation von Immunzellen zur Zytokinproduktion führt zur Produktion und Ausschüttung von Prostaglandin E_2 und Prostaglandin $F_{2\alpha}$, von welchen bekannt ist, dass sie Kontraktionen des Uterus bewirken.

Klinische Studien haben gezeigt, dass bei Schwangeren mit vorzeitiger Wehentätigkeit, die erhöhte Serum-CRP (C-reaktives Protein)-Spiegel aufweisen, das Ansprechen auf die Tokolyse im Vergleich zu Frauen mit normalen CRP-Werten verringert ist. Da IL-6 eine Rolle bei der Induktion von CRP spielt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-6, angesehen als entscheidender Mediator bei der Antwort des Organismus auf Infektionen und Gewebeschädigungen, bei der Antwort auf intrauterine Infektionen ebenso entscheidend ist. Leider war es in bisherigen Studien nicht möglich, im menschlichen Organismus den zeitlichen Zusammenhang zwischen Infektion des Amnions, Erhöhung der IL-6-Spiegel und Beginn der Wehentätigkeit herzustellen. Bei Rhesus-Affen konnte gezeigt werden, dass im Anschluss an eine Amnioninfektion die IL-6-Spiegel und die Konzentration anderer Zytokine in der AF anstiegen, gefolgt von einer Erhöhung von Prostaglandin E_2 und Prostaglandin $F_{2\alpha}$. Diese Veränderungen fanden alle statt, bevor die Kontraktilität des Uterus anstieg oder klinisch Infekt-Zeichen zu beobachten waren (EL-Bastawissi *et al.* 2000).

Exkurs: Die Rolle von IL-6 für die Immunmodulation während der Schwangerschaft

Verschiedene biologische Mechanismen und Systeme, die ihren Ursprung im Embryo sowie im mütterlichen Organismus haben, scheinen bei der Entwicklung des Embryos, der Implantation im rezeptiven Endometrium, dem Erhalt der Schwangerschaft und dem Schutz des Embryos vor externen Einflüssen eine Rolle zu spielen.

Zytokine modulieren zelluläre und extrazelluläre Prozesse und ermöglichen den Austausch von Informationen zwischen mütterlichem und sich entwickelndem kindlichen Organismus. Sie scheinen das Immun- und Hormonsystem zu kontrollieren, die Funktion des Trophoblasten zu unterstützen und sorgen für die korrekte Implantation, für Wachstum und Differenzierung der Plazenta.

Die Invasion des Trophoblasten unterliegt einer strengen Kontrolle, die sowohl von endometrialen Zytokinen als auch Wachstumsfaktoren ausgeübt wird.

CD4-positive T-Zellen können anhand der von ihnen produzierten Zytokine in zwei Typen unterteilt werden, Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen sind charakterisiert durch die Produktion von IL-2, Interferon γ , Tumor-Nekrose-Faktor β , Th2-Zellen durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-6. In der Dezidua von Schwangeren dominieren die Zytokine, die durch Th2-Lymphozyten produziert werden gegenüber solchen aus Th1-Zellen (S.Saito 1999).

Des Weiteren sind auch IL-1, Leptin sowie Tumor-Nekrose-Faktor α , die alle endometrialen Ursprungs sind, an der Regulation der Implantation beteiligt. Die eben genannten Zytokine sind alle Stimulatoren von endometrialen Metalloproteinasen. Unter Metalloproteinasen fasst man eine Familie von Enzymen zusammen, die bei der Invasion des Trophoblasten ebenso wie bei anderen Prozessen, wie der Tumordinvasion, eine Rolle spielen. Durch die Sekretion von Metalloproteinasen, die die endometriale extrazelluläre Matrix verdauen, wandern trophoblastische Zellen bei der Einnistung ins Endometrium ein (P.Bischof et al. 2000).

Die nach korrekt stattgefundener Implantation ausgelöste Ausschüttung von β HCG durch den Trophoblasten wird durch die Zytokine der Th2-Zellen induziert, was wiederum die Progesteronproduktion des Corpus Luteum in der Schwangerschaft stimuliert. Hierdurch werden erneut Th2-Zellen induziert. Der Erhalt der Schwangerschaft wird erreicht, indem β HCG die Apoptose des Corpus luteum verhindert (S.Saito, 1999).

Den Zytokinen der IL-6-Familie wird eine Funktion bei der Implantation auch deshalb zugeschrieben, da durch die Blastozyste ausgeschüttete Zytokine die Empfängnisbereitschaft des Endometriums zu beeinflussen scheinen. Zytokine werden

ebenso vom Endometrium selbst produziert und unterstützen somit auch von dieser Seite den Implantationsprozess (P.Seiler et al. 2001).

Von den Zytokinen des IL-6-Systems ist bekannt, dass sie Einfluss nehmen auf die Differenzierung, das Wachstum und die Funktion von unterschiedlichsten Zelltypen. So haben sie unter anderem auch Einfluss auf die Organogenese des Embryos. Hierbei kommt ihnen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des embryonalen Herzens zu. Liegt ein Defekt des entsprechenden Signaltransduktionsproteins gp130 vor, so tritt bei Mäusen eine schwere ventrikuläre Hypoplasie auf und sie sterben noch vor dem Geburtstermin intrauterin ab (P.Seiler et al. 2001).

IL-6 wird von kultivierten Mäuse-Blastozysten, von menschlichen Oozyten sowie von 1-8 zelligen menschlichen Embryos produziert. IL-6-Protein und -mRNA sind im Synzytiotrophoblasten und in zytotrophoblastischen Zellen im ersten Trimenon der Schwangerschaft nachweisbar jedoch sind Studien zur Expression von IL-6 in der späten Embryogenese leider sehr rar. Der IL-6-Rezeptor und gp130 (das entsprechende Signaltransduktionsprotein) werden in endometrialen Epithelzellen gefunden, gp130-mRNA im ersten und zweiten Trimenon in der Dezidua, im Trophoblasten und in der Blastozyste (P.Bischof et al. 2000). Gp 130-Transkripte konnten mit Northern-Blot-Analyse ab dem 6.Tag der Schwangerschaft nachgewiesen werden, mit einem Peak am 8.Tag und einer allmählichen Abnahme in der restlichen Zeit der Embryogenese. IL-6-Rezeptor-Transkripte wurden am 8.Tag erstmals nachgewiesen, mit einem Maximum am 10.Tag und einem kontinuierlichen Abfall bis zum 14.Tag. Dies könnte bedeuten, dass in der Zeit, in der gp130-mRNA zu finden, der IL-6-Rezeptor hingegen jedoch noch nicht nachweisbar ist, eine Stimulation von gp130 durch andere Zytokine der IL-6-Familie stattfindet (P.Seiler et al. 2001). Somit sind IL-6 und sein Rezeptor während der Implantation und der Entwicklung der Plazenta zugleich in mütterlichem und kindlichem Gewebe vorhanden.

Aus den genannten Erkenntnissen kann abgeleitet werden, dass Interleukin-6 eine wesentliche Rolle und Verantwortung bei dem Prozess der Implantation, der Entwicklung der Plazenta, dem Erhalt der eingetretenen Schwangerschaft sowie der Entwicklung des Embryos zukommt.

Ein weiterer Hinweis für die Rolle von IL-6 bei der Implantation ist dessen typisches Verteilungsmuster im Verlauf des Zyklus:

IL-6 wird im Endometrium sowohl von Stroma- als auch von Epithelzellen produziert, wobei die quantitativ bedeutendere Rolle letzteren zukommt (Tabibzadeh *et al.* 1989, Laird *et al.* 1993, Laird *et al.* 1994). Immunhistochemische Analysen haben ergeben, dass sowohl der IL-6 Rezeptor als auch das Protein gp 130 während des gesamten Zyklus vor allem in den Drüsenzellen vorhanden ist, weniger ausgeprägt jedoch im Stroma. Bei IL-6 findet man eine Zunahme der Konzentration im Verlauf des Zyklus mit niedrigen Spiegeln in der Proliferationsphase und mit starker Anfärbung in der Immunhistochemie in der Zeit des Implantationsfensters um den 19.-20. Zyklustag. Zu diesem Zeitpunkt stellen sich besonders die Drüsenstrukturen und die oberflächlichen Epithelzellen deutlich dar. Weiterhin ist eine stetige Zunahme von IL-6 im Epithel der Sekretionsphase zu beobachten. In der späten Sekretionsphase weisen nur die Stromazellen des oberen Stratum funktionale eine Anfärbbarkeit auf (Tabibzadeh *et al.* 1995). Diese Ergebnisse stehen zum Teil im Widerspruch zu Ergebnissen, nach denen die IL-6-Produktion von Epithelzellen in der Proliferationsphase deutlich höher ist als in der Sekretionsphase (Laird *et al.* 1993).

Diese Tatsachen legen eine Rolle von IL-6 bei der Implantation der Blastozyste und der Etablierung einer Schwangerschaft nahe. Auch die Regulation durch Steroidhormone erscheint in Anbetracht des zyklischen Verhaltens als wahrscheinlich. Dies hat uns dazu bewogen, die Regulation von IL-6 anhand von gut charakterisierten Zellkulturen genauer zu untersuchen.

Zusammenfassung:

Interleukin-6, ein 23- 30 kDa Phospho-Glykoprotein, wird im humanen Endometrium sowohl von Epithel- als auch von Stromazellen produziert. Es wird von Fibroblasten, Monozyten, Lymphozyten und nicht-lymphozytären Zellen exprimiert. Die Funktionen von IL-6 umfassen die Regulation von Immunreaktionen, Akute-Phase-Reaktionen, sowie die Hämatopoese; auch konnten veränderte IL-6-Konzentrationen bei verschiedenen Krankheitsbildern gefunden werden. Im Endometrium scheint IL-6 eine regulatorische Funktion zuzukommen. Interleukin-6 zeigt ein zyklisches Verhalten mit niedrigen Spiegeln in der Proliferationsphase und einen Anstieg in der Sekretionsphase. Dies legt eine direkte oder indirekte Regulation durch Steroidhormone nahe.

4.2 Endometriale Expression und Funktion von VEGF

Die Neubildung von Gefäßen ist in adulten Geweben - abgesehen von einigen Krankheitsbildern wie Arthritis, chronischer Entzündung und Tumorwachstum (Cheung *et al.* 1998) - ein relativ selten stattfindender Prozess (Torry *et al.* 1996). Eine Ausnahme bilden hier die zyklischen Veränderungen des Endometriums, bei denen die Revaskularisierung eine entscheidende Rolle spielt.

Die Entwicklung neuer Gefäße kann durch zwei Mechanismen stattfinden: durch Angiogenese und durch Vaskulogenese.

Unter Angiogenese versteht man die Bildung neuer Kapillaren ausgehend von bestehenden Gefäßen. Diese muss im Endometrium erfolgreich verlaufen um die Implantation der Blastozyste zu ermöglichen; hierzu gehört die Proliferation von Endothelzellen, die Remodellierung der existierenden Basalmembran und der extrazellulären Matrix. Sowohl übermäßige als auch inhibierte Angiogenese führen zu frühen Aborten. Die Vaskulogenese bezeichnet die *de novo*- Formation von Gefäßen, die nur bei der Embryogenese stattfindet (Gordon *et al.* 1995).

Das Wachstum von Gefäßen ist nötig, um die Proliferation und die Regeneration des Endometriums während des Menstruationszyklus zu ermöglichen und ein rezeptives Endometrium zu erhalten. Hierbei kommt VEGF eine entscheidende Rolle zu.

VEGF, ein 30-46 kDa Glykoprotein (Smith 1998), entsteht durch alternatives Spleißen von 8 Exons der entsprechenden mRNA (Ferrara *et al.* 1991, Smith 1998). Aus diesem Vorgang resultieren die fünf Isoformen VEGF₁₄₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆. Die kürzeren Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ werden in löslicher Form sezerniert. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind vor allem zellassoziiert (Sharkey *et al.* 2000). Alle fünf Isoformen werden sezerniert, jedoch sind nur VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ löslich. VEGF₂₀₆ und eventuell auch VEGF₁₄₅ sind an heparin-haltige Proteoglykane auf der Zelloberfläche, an die Basalmembran oder in der extrazellulären Matrix gebunden (Cooper *et al.* 1995). Die zellassoziierten längeren Isoformen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ wirken erst bei Verletzung oder Untergang der entsprechenden Zelle und könnten daher eine Rolle während der Menstruation spielen, bei der es zu Gewebsdefekten und Autolyse kommt (Huang *et al.* 1998). Während VEGF in den meisten Geweben zu finden ist, beschränkt sich VEGF₁₄₅ auf den weiblichen Reproduktionstrakt. VEGF₂₀₆ konnte nur in der fetalen Leber nachgewiesen

werden. Im Endometrium sind laut Torry *et al.*, 1996 VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ die beiden vorherrschenden Formen.

Die drei existierenden VEGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Es sind transmembrane Rezeptoren, die aus sieben Immunglobulin-ähnlichen Schleifen und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase Domäne bestehen. VEGFR I und II sind die entscheidenden Übermittler der Vaskulo- und Angiogenese.

VEGFR I ist verantwortlich für die Zellmigration und wird außer in Endothelzellen auch vom Trophoblasten sowie von Monozyten exprimiert. VEGFR II übermittelt Proliferation und Migration von Endothelzellen und ist der Hauptregulator der Angiogenese. Er wird außerdem von Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Sowohl VEGFR Typ I als auch Typ II wurden in Spermatozoen vorgefunden (Obermair *et al.* 1999, Weston & Rogers 2000). Die Anwesenheit von VEGF- Rezeptoren auf dem Trophoblasten lässt eine Rolle von VEGF im embryo- maternalen Dialog in der Schwangerschaft vermuten (Torry & Torry 1997). Ein weiterer Effekt von VEGF ist die Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Hier erweist sich VEGF als potenter als Histamin (Torry & Torry 1997).

Hier die Darstellung weiterer Funktionen von VEGF im Überblick (Smith 1998):

- VEGF fördert die Proliferation und Migration von Endothelzellen. Dies beinhaltet den Abbau der umgebenden Matrix mit Hilfe einer Erhöhung der Kollagenase, die durch VEGF in Endothelzellen induziert wird.
- VEGF erhöht die Synthese von tPA (tissue-plasminogen-activator) und uPA (urokinase-plasminogen-activator). Daraus folgt vermehrte Plasmin-Ausschüttung durch proteolytische Spaltung von Plasmin.
- Die Koagulation wird durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität erleichtert, was wiederum die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems fördert.
- VEGF hat Einfluss auf die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen; so induziert es die Gefäßzell-Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1, die die Anheftung von Natürlichen Killerzellen über CD 18 und VLA-4-Rezeptoren ermöglichen.

- VEGF unterstützt die Akkumulation von Makrophagen über den *flt-1* (Fms-like tyrosine kinase) und KDR (kinase insert domain receptor)- Rezeptor, der durch Monozyten und Makrophagen exprimiert wird.
- VEGF fördert die Vasodilatation durch die Ausschüttung von Stickstoffoxid und Prostazyklin aus Endothelzellen.

Auch VEGF zeigt im Endometrium ein typisches Verteilungsmuster im Menstruationszyklus. VEGF konnte sowohl im Stroma, als auch im Epithel während des gesamten Zyklus sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Gordon *et al.* 1995, Hornung *et al.* 1998). Man findet im Vergleich zur Proliferationsphase 3-6 fach erhöhte Mengen der mRNA in der späten Sekretionsphase (Torry *et al.* 1996). Von dieser Erhöhung sind alle drei Isoformen in gleichem Ausmaß betroffen. Die immunhistochemische Färbung zeigt, dass vor allem die Drüsenepithelzellen der Sekretionsphase eine starke Anfärbarkeit der apikalen Oberfläche aufweisen (Zhang *et al.* 1998), nicht jedoch die Stromazellen. Diese kennzeichnet vielmehr eine diffuse Anfärbarkeit. Die Verteilung von VEGF im Epithel legt nahe, dass VEGF ins Lumen der Drüsenschläuche sekretiert wird, um dort auf die Blastozyste zu wirken (Hornung *et al.* 1998). Auch in den Schnitten der Proliferationsphase konnte VEGF durchgängig nachgewiesen werden, jedoch wesentlich weniger deutlich als in der Sekretionsphase (Torry *et al.* 1996). Die Ergebnisse konnten von uns durch die Immunhistochemie bestätigt werden. So konnten wir in der mittleren Sekretionsphase mit 45% den größten Anteil an stark gefärbten Schnitten mit Rückgang auf 20% in der späten Sekretionsphase feststellen.

Obwohl sich die endometrialen Stromazellen in der Immunhistochemie nicht anfärben ließen, konnte mittels Ribonuklease-Protection-Assay nachgewiesen werden, dass sie VEGF produzieren (Torry *et al.* 1996). Die Tatsache, dass von den Epithelzellen vorwiegend die löslichen VEGF-Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ produziert werden, lässt vermuten, dass diesen eine Rolle im embryo-maternalen Dialog zukommt. Aus diesem Grund untersuchten wir Proben des Uterussekrets auf deren Gehalt an VEGF. Es konnten hohe Werte von VEGF vorwiegend in der Sekretionsphase gefunden werden. Unser Ergebnis zeigte jedoch in der statistischen Auswertung keine signifikante Erhöhung gegenüber der Proliferationsphase. Dies könnte natürlich auf eine starke interindividuelle Varianz der VEGF- Proteinkonzentration zurückzuführen sein. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten Proben der gleichen Patientinnen im Zyklusverlauf auf deren VEGF-Gehalt hin getestet werden.

Da der Regulationsmechanismus, über den die VEGF-Erhöhung in der Sekretionsphase stattfindet, noch weitgehend ungeklärt ist, untersuchten wir den Einfluss der Steroide 17 β -Östradiol und Progesteron, der Zytokine IL-1 β , IL-6 und LIF, sowie von der Hypoxie auf die VEGF-Expression an endometrialen Stroma- und Epithelzellkulturen.

Zusammenfassung:

Bei den zyklischen Veränderungen des Endometriums nimmt die Revaskularisierung des Gewebes und hiermit auch die VEGF-Expression eine entscheidende Rolle ein. VEGF, ein 40-45 kDa Glykoprotein, existiert in den fünf Isoformen VEGF_{145,121,165,189,206}, die durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen. VEGF lässt sich sowohl in Stroma-, als auch in Epithelzellen nachweisen. Sowohl das Protein als auch die mRNA sind während des gesamten Zyklus nachweisbar; es zeigt sich jedoch ein deutlicher Anstieg in der Sekretionsphase im Vergleich zur Proliferationsphase. Dieses Ergebnis konnte von uns mit Hilfe der Immunhistochemie bestätigt werden.

4.3 IL-6, VEGF und deren Regulation durch 17 β -Östradiol und Progesteron

Das Endometrium erlaubt nur während eines sehr kurzen Zeitraums des Menstruationszyklus die Implantation der Blastozyste. Um das Endometrium darauf vorzubereiten, müssen komplexe Regulierungsmechanismen vorliegen. Die beiden Steroidhormone 17 β -Östradiol und Progesteron spielen hierbei eine wesentliche Rolle.

In der Proliferationsphase nehmen die Drüsenzellen wie auch die Fibroblasten des Stromas und Gefäßendothelzellen unter dem Einfluss des folliculären Östrogens zu. Auch die Epithel- und Stromazellen proliferieren. Nach der Ovulation steigt Progesteron an, und das Stratum funktionale unterliegt einer sekretorischen Umwandlung: intrazelluläre Glykoproteine akkumulieren, Epithelzellen synthetisieren sekretorische Proteine und Prostaglandine (Smith 1991, Tabibzadeh 1996); die Zahl der Stromazellen nimmt gegenüber der Zahl an Epithelzellen zu; zudem findet man ein Stromaödem. Der nun folgende Progesteronabfall führt zu Apoptose, Konstriktion distaler Spiralarterienanteile, und am 1.-4. Zyklustag kommt es zu diffuser Gewebsnekrose, Entzündung und Thrombosierung der Gefäße.

Leider ist jedoch der Zusammenhang zwischen diesen beiden Steroidhormonen und anderen im Endometrium relevanten Faktoren, wie zum Beispiel des Zytokins Interleukin-6, oder auch VEGF, noch weitgehend ungeklärt.

4.3.1 IL-6 und dessen Regulation durch 17 β -Östradiol und Progesteron

Um die Regulationsmechanismen von Interleukin-6 genauer zu verstehen, war es unser Ziel, die Auswirkungen der Steroidhormone 17 β -Östradiol und Progesteron in Bezug auf IL-6 genauer zu untersuchen. Dieser Regelkreis war bereits des Öfteren Thema von Veröffentlichungen. Die Ergebnisse stellten sich jedoch zum Teil als widersprüchlich dar. So fanden Jacobs *et al.*, 1992 und Ray *et al.*, 1997 sowie auch Tabibzadeh *et al.*, 1989 eine Suppression von Interleukin-6 durch Steroide in Stroma-, sowie in Epithelzellen. Ein Unterschied bestand im Ausmaß der suppressiven Wirkung von 17 β -Östradiol und Progesteron, und der Kombination aus beiden. So beschreiben Jacobs *et al.*, 1992 im Falle endometrialer Stromazellen einen deutlicheren Effekt von Progesteron als von 17 β -

Östradiol; die Steroidhormone gemeinsam entfalten einen synergistischen Effekt. In Bezug auf endometriale Epithelzellen konnte dieser Synergismus nicht festgestellt werden. Auch Ray *et al.*, 1997, beschreibt die suppressive Wirkung von 17 β -Östradiol. Hierzu widersprüchlich äußern sich jedoch Laird *et al.*, 1993. So stellen sie im Epithel der Proliferations- und der frühen Sekretionsphase eine Erhöhung von IL-6 unter Östradiol- und Progesteron-Stimulation fest, während der späten Sekretionsphase schließlich eine Verringerung. Auch die reine Östradiol-Stimulation ergibt hier andere Ergebnisse als bei den oben erwähnten Autoren. So steigert Östradiol in der frühen Sekretionsphase die IL-6-Produktion, senkt sie aber in der späten Sekretionsphase.

In Bezug auf das Verhalten endometrialer Stromazellen unter Hormonstimulation besteht größere Einigkeit. Unter Östradiol- sowie unter Östradiol- und Progesteroneinfluss wird übereinstimmend eine Abnahme der IL-6-Konzentration beschrieben.

Der wahrscheinliche Mechanismus für die Suppression von Interleukin-6 durch 17 β -Östradiol verläuft über die direkte Interaktion des Östrogen-Rezeptors mit den Transkriptionsfaktoren NF(nuclear factor)-IL-6 und NF- κ B. So ist es dem Östrogen-Rezeptor möglich, die Bindung der DNA an die Transkriptionsfaktoren zu verhindern und somit ein Absinken der IL-6-Konzentration im Gewebe herbeizuführen (Ray *et al.* 1997).

Es stellt sich schließlich die Frage, worauf die widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf die Stimulation der Endometriumszellen durch Steroidhormone zurückzuführen sind. Die augenscheinlichsten Gründe sind zum einen die Heterogenität der Gewebeproben, zum anderen die unterschiedlichen Zellkultur-Bedingungen.

Die Zellkulturansätze unterscheiden sich in folgenden Punkten:

- Verwendung von FCS- (fetal-calf-serum) freiem oder FCS-haltigem Medium
- Häufigkeit der Zellpassage
- Wachstumsuntergrund

Da es keine standardisierten Protokolle zu Entnahme-, Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen gibt, ist es schwierig und fragwürdig, die daraus gewonnenen Erkenntnisse zu vergleichen. So wurden Versuche mit Stromazellen gemacht, bei denen 4 mal passagiert wurde und Medium ohne FCS Verwendung fand (Tabibzadeh *et al.* 1989). Andere Arbeitsgruppen kultivierten Epithelzellen auf Polystyrol; Stromazellen wurden ohne weitere Passagierung in Serum-freiem Medium angesetzt (Laird *et al.* 1993). Wieder andere arbeiteten mit Zellaggregaten ohne weitere Auftrennung in Epithel- und Stromazellen (Vandermolen & Gu 1996). Tseng *et al.*, 1996 kultivierten unpassagierte Stromazellen auf Medium mit Zusatz von 2,5% FCS. Diese hier dargestellten unterschiedlichen Kulturbedingungen können die Ergebnisse natürlich stark beeinflussen.

So kann die Kultivierung von Zellen auf Polystyrol ihre Funktion verändern (Mulholland *et al.* 1988, Schatz *et al.* 1990, White *et al.* 1990). Aus diesen Gründen kultivierten wir Epithelzellen auf Matrigel, wodurch sie ihre Polarität beibehalten (Mulholland *et al.* 1988, Schatz *et al.* 1990, White *et al.* 1990) und sowohl Östradiol- als auch Progesteron-Rezeptoren exprimieren (Classen-Linke *et al.* 1997).

Weiterhin fand in unseren Versuchsansätzen eine Aufreinigung der Stromazellen durch magnetische Beads der Klasse CD 14 (Monozyten/Makrophagen), CD 45 (Pan-Leukozytenmarker), CD 31 (Endothelzellen) und CD 56 (natürliche Killerzellen) statt, wodurch Leukozyten, Endothel- und restliche Epithelzellen als Quelle einer Verfälschung der Ergebnisse eliminiert wurden. Somit kann die Beeinflussung der Interleukin-6-Produktion vor allem durch Leukozyten ausgeschlossen werden.

Uns war es jedoch weder möglich, eine Stimulation der IL-6-Produktion durch Steroidhormone nachzuweisen, noch konnten wir einen inhibitorischen Effekt durch diese zeigen. Die IL-6-Konzentrations-Veränderungen befanden sich außerhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05$.

Trotzdem zeigt IL-6 ein deutlich zyklisches Verhalten, welches einen Zusammenhang mit den Steroidhormonen Östradiol- und Progesteron vermuten lässt. Aus diesem Grund könnte überlegt werden, ob IL-6 nicht indirekt durch andere, bisher unbekannte Faktoren, wie etwa durch Zytokine, reguliert wird.

Zusammenfassung:

Das Verhalten von Interleukin-6 in Bezug auf die Stimulation durch die Steroidhormone 17β -Östradiol und Progesteron wird durch verschiedene Autoren unterschiedlich dargestellt. So wird zum einen die Erhöhung der IL-6-Konzentration in endometrialen Stroma- und Epithelzellen beschrieben, zum anderen deren Abfall. In den von uns angelegten Versuchen konnte keine statistisch signifikante Änderung von IL-6 durch Östradiol oder Progesteron festgestellt werden.

4.3.2 VEGF und dessen Regulation durch 17β - Östradiol und Progesteron

Wie bei Interleukin-6 war es auch im Fall von VEGF unser Ziel, dessen Regulationsmechanismen im Endometrium genauer zu untersuchen. Viele andere Studien

hatten den Regelkreis von VEGF und den Steroidhormonen Östrogen und Progesteron zum Thema. So untersuchten Perrot-Applanat *et al.*, 1988 das Vorkommen von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren im Uterus. Dabei stellte sich heraus, dass diese zwar in glatten Muskelzellen und in perivaskulären Zellen der Uterusgefäße zu finden sind, nicht jedoch in Endothelzellen. Dies würde nahe legen, dass hier eine indirekte Regulation der Steroidhormon-Effekte durch auto-/parakrine Faktoren vorliegt. Iruela-Arispe *et al.*, 1999 widerlegten dies, denn sie fanden sowohl Östrogen- als auch Progesteron-Rezeptoren auf endometrialen Endothelzellen. Nun stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus Östrogen und Progesteron ihre Effekte auf VEGF im endometrialen Gewebe entfalten. Es wurde nachgewiesen, dass Östrogen den mitogenen Effekt auf endometriale Endothelzellen von parallel applizierten Wachstumsfaktoren verstärkt, Progesteron diesen hingegen inhibiert. Auch die Proliferation von endometrialen Endothelzellen wurde durch Progesteron reduziert (Weston & Rogers 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Gen-Expriemierung von VEGF durch Östrogen und Progesteron im Rattenuterus (Cullinan-Bove & Koos 1993) und in endometrialen Karzinom-Zelllinien (Charnock-Jones *et al.* 1993, Smith 1996) ansteigt. Aber obwohl Uteruszellen *in vivo* sensibel sind für Östrogen, konnte keine Antwort auf physiologische Konzentrationen *in vitro* gefunden werden. Auch scheinen Endothelzellen *per se* nicht direkt auf Östrogen und Progesteron zu reagieren (Gordon *et al.* 1995). So ist es wahrscheinlich, dass Wachstumsfaktoren als lokale Mediatoren der Steroidhormone agieren.

Uns interessierte nun vor allem die Reaktion von endometrialen Stroma- und Epithelzellen in Bezug auf die Stimulation und den Entzug von Östrogen und Progesteron. So konnte mehrfach in endometrialen Stromazellkulturen gezeigt werden, dass ein VEGF-Anstieg durch physiologische Konzentrationen von 17β -Östradiol erreicht wird (Weston & Rogers 2000). Dieser Anstieg unterschied sich jedoch deutlich im Ausmaß der Änderung (Shifren *et al.* 1996, Huang *et al.* 1998). Auch stimulierten Huang *et al.*, 1998 die Zellkulturen mit einer 10 fach erhöhten Östradiol-Dosis, als unter physiologischen Bedingungen normalerweise vorzufinden ist. Östradiol stiegerte hier zudem nur die löslichen Isoformen 121 und 165, nicht aber 189 (Huang *et al.* 1998). Auch für endometriale Epithelzellen konnte dieser stimulatorische Effekt in der Zellkultur nachgewiesen werden (Zhang *et al.* 1995, Weston & Rogers 2000).

Bei den von uns angelegten Stroma- und Epithelzellkulturen konnten wir keinen Effekt durch Stimulation oder Entzug von 17β - Östradiol oder Progesteron auf die Konzentration von VEGF- Protein bemerken. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten jedoch auch hier auf die verschiedenen Wachstumsbedingungen, die unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen

und vor allem auf den Reinheitsgrad der Kulturen zurückzuführen sein. So findet man im Endometrium je nach Zeitpunkt der Entnahme bis zu 40% Leukozyten (Salamonsen & Woolley 1999), die zu stark verfälschten Ergebnissen führen können. Durch die Aufreinigung unserer Zellkulturen durch magnetische Beads ist diese Verunreinigung hier weitgehend auszuschließen.

Zusammenfassung:

Einige vorhergehende Studien legten die Regulation von VEGF durch die Steroidhormone 17β -Östradiol und Progesteron nahe. Es scheint keinen direkten Weg der Regulation durch Östrogen oder Progesteron zu geben, vielmehr findet diese über andere auto-beziehungsweise parakrine Faktoren statt. Östrogen verstärkte den mitogenen Effekt von parallel applizierten Wachstumsfaktoren, Progesteron inhibierte diesen. In endometrialen Stroma- und Epithelzellkulturen konnte die Stimulation von VEGF durch Östrogen nachgewiesen werden. Diese Stimulation konnte von uns nicht bestätigt werden.

4.4 IL-6, VEGF und deren Regulation durch Zytokine

Sowohl Zytokinen als auch Wachstumsfaktoren kommt eine entscheidende Funktion bei der Vorbereitung des Endometriums auf eine bevorstehende Implantation, bei der Menstruation und der Regeneration des Gewebes zu. Um die steroidunabhängige Regulation von IL-6 und VEGF zu untersuchen, analysierten wir die Wirkung der Zytokine IL-1 β , LIF und IL-6 auf endometriale Stroma- und Epithelzellkulturen. Diese haben sich schon in vorhergehenden Studien als relevant für das endometriale Gleichgewicht und die Implantation gezeigt.

4.4.1 IL-1 und dessen Regulation von IL-6 und VEGF

Das Peptid Interleukin-1 ist ein Produkt der im Endometrium vorhandenen Monozyten, Makrophagen und einiger anderer Zelltypen, wie zum Beispiel dezidualisierten

Stromazellen. Das IL-1 System besteht aus IL-1 α , IL-1 β , den Rezeptoren IL-1 I und II sowie dem Inhibitor IL-1ra (Laird *et al.* 1994, Simon *et al.* 1998).

IL-1 α und IL-1 β haben ähnliche biologische Funktion und nutzen den gleichen Rezeptor. Interleukin-1 zeigt ebenso wie IL-6 niedrige Spiegel in der Proliferationsphase und einen Anstieg in der Sekretionsphase zur Zeit der Implantation (Laird *et al.* 1994). Parallel hierzu ist auch ein Anstieg der Serumkonzentration (Giudice 1994) sowie des Rezeptors nachweisbar (Vandermolen & Gu 1996). Die Bedeutung von IL-1 im Endometrium wurde bei Versuchen deutlich, bei denen Mäusen der Inhibitor IL-1ra in die Uterushöhle infundiert wurde. Das Ergebnis war eine Unfähigkeit der Blastozyste zur Implantation (Simon *et al.* 1998). Auch wurde eine veränderte Expression von IL-1 β bei Frauen mit häufig auftretenden frühen Aborten gefunden (von Wolff *et al.* 2000).

IL-1 und IL-6

IL-1 ist bekannt als Stimulator der IL-6-Produktion in endometrialen Stroma- (Tabibzadeh 1991) und Epithelzellen (Laird *et al.* 1994). Dies ist sowohl auf der Ebene der mRNA als auch auf Proteinebene in allen Zyklusphasen nachweisbar (Semer *et al.* 1991, Tabibzadeh 1991, Vandermolen & Gu 1996).

Diese angegebene Stimulation von IL-6 in Stromazellen durch IL-1 konnte in unserer Studie bestätigt werden. Im Gegensatz zu Laird *et al.*, 1994, fanden wir jedoch keine IL-6 Stimulation in Epithelzellen. Da Laird *et al.*, 1993 höhere IL-6-Konzentrationen in IL-1-stimulierten Epithelzellen der Sekretionsphase fand als in Zellen aus der Proliferationsphase, könnte dieser Effekt eventuell durch die Verunreinigung durch Immunzellen zustande gekommen sein, da diese in hohen Konzentrationen in der Sekretionsphase zu finden sind (Kodama *et al.* 1998). Eine Manipulation unserer Ergebnisse durch Verunreinigungen kann praktisch ausgeschlossen werden, da die Stimulation der Sekretion nur in Stromazellen gefunden wurde, nicht jedoch in Epithelzellen. Unsere Stimulationsversuche zeigen die Regulation der IL-6-Expression in Stromazellen durch IL-1 β , wohingegen keine Stimulation in Epithelzellen gefunden wurde. Dieser Unterschied wirft die Frage auf, ob die Regulation in Epithelzellen über andere Mechanismen verläuft als in Stromazellen. Zudem ist zu überlegen, ob IL-6 in den beiden Zelltypen eventuell unterschiedliche Funktionen erfüllt.

IL-1 und VEGF

IL-1 β wurde schon des öfteren als stimulatorischer Faktor von VEGF beschrieben. So erhöht IL-1 β die Expression der VEGF-mRNA sowie des VEGF-Proteins in glatten Muskelzellen der Rattenaorta (Li *et al.* 1995). Zudem wird IL-1 β von der Blastozyste

exprimiert und induziert hier VEGF, welches wiederum die Angiogenese und Integrin-Exprimierung in endometrialen Zellen unterstützt (Sunder & Lenton 2000). Unsere Zellkulturen untersuchten nun das Verhalten von endometrialen Stroma- und Epithelzellen im Bezug auf Stimulation durch IL-1 β . In keinem der beiden Zelltypen konnte eine Veränderung der VEGF-Protein-Konzentration festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass IL-1 β seine stimulatorische Wirkung von VEGF über die Uterusgefäße und deren Endothelzellen ausübt, nicht jedoch über endometriale Stroma- oder Epithelzellen.

Zusammenfassung:

IL-1 β zeigt ein zyklisches Verhalten im Endometrium mit hohen Spiegeln in der Sekretionsphase zur Zeit der Implantation. Gleichzeitig steigt auch die Serumkonzentration von IL-1 an. IL-1 β stimuliert IL-6 in endometrialen Stromazellkulturen, nicht jedoch in Epithelzellen. Eine Stimulation von VEGF durch IL-1 β konnte von uns nicht festgestellt werden.

4.4.2 LIF und dessen Regulation von IL-6 und VEGF

Das Zytokin Leukaemia-Inhibitory-Faktor (LIF) gehört zu einer Gruppe strukturell ähnlicher Faktoren wie Interleukin-6, Onkostatin M (OSM), Ciliary- neutrophic- factor (CNTF) und teilt einige Funktionen sowie den Rezeptor mit diesen. So stimulieren LIF, IL-6 und OSM die Haptoglobin- und Fibrinogenproduktion durch Hep G2 Hepatomzellen (Piquet-Pellorce *et al.* 1994, Vogiagis & Salamonsen 1999). LIF besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher Zielzellen. Zu diesen gehören pluripotente Stromazellen, Hepatozyten, periphere Nervenzellen, Gliazellen sowie Myoblasten. Außerdem unterstützt LIF das Wachstum embryonaler Stammzellen und hält diese im undifferenzierten Zustand.

Diese Tatsachen legen eine breite biologische Funktion von LIF nahe. Auch im Endometrium scheint LIF eine entscheidende Rolle zuzukommen. Dies zeigen Experimente an Mäusen mit defektem LIF-Gen, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass zwar eine normale, funktionsfähige Blastozyste entstand, jedoch keine Implantation stattfand (Stewart & Cullinan 1997).

LIF zeigt im Endometrium eine typische Verteilung im Verlauf des Zyklus. Untersuchungen mit dem Nachweis von mRNA und auch dem Protein erbrachten folgendes Ergebnis: Das Auftreten von mRNA konnte erst nach dem 20. Zyklustag in der mittleren und späten Sekretionsphase nachgewiesen werden. Die Immunhistologie zeigte eine Anfärbarkeit der Präparate in allen Zyklusphasen: Im Stroma konnten starke interindividuelle Unterschiede ausgemacht werden, nicht jedoch ein zyklisches Verhalten. Im Epithel hingegen tritt eine leichte Färbung in der Proliferationsphase auf, die dann in der mittleren und späten Sekretionsphase einen Gipfel mit starker Anfärbarkeit erreicht, während das Endometrium unter dem Einfluss von hohen Progesteronspiegeln steht (Vogiagis *et al.* 1996). Dieses Verhalten legt eine autokrine/parakrine Rolle von LIF nahe.

Da unsere Kulturansätze keine direkte Regulation von IL-6 durch Steroide *in vitro* zeigten, wirft dies die Frage auf, ob IL-6 nicht durch andere Faktoren, wie zum Beispiel Zytokine, indirekt reguliert wird. Aus diesem Grund stimulierten wir endometriale Stroma- und Epithelzellen mit LIF und untersuchten schließlich das Verhalten von Interleukin-6.

Wir konnten weder in den Zellkulturen der Epithel-, noch der Stromazellen eine Auswirkung der Stimulation durch LIF auf die IL-6-Konzentration feststellen. Auch der VEGF-Gehalt zeigte keinerlei Veränderung.

Zusammenfassung:

LIF erfüllt breite biologische Funktionen, was die Vielzahl an Zielzellen wie Hepatozyten, Glioblasten, pluripotente Stromazellen verdeutlicht. Auch im Endometrium spielt LIF eine entscheidende Rolle, vor allem bei der Implantation der Blastozyste. Die von uns untersuchte Regulation von VEGF und IL-6 durch LIF erbrachte kein positives Ergebnis. So konnte weder in Stroma- noch in Epithelzellen eine Stimulation durch LIF nachgewiesen werden.

4.4.3 IL-6 und dessen Regulation von VEGF

Die Angiogenese kann durch verschiedene Zytokine induziert werden. So ist VEGF als spezifisches Mitogen für Endothelzellen daran beteiligt. Auch IL-6 liegt in Geweben mit aktiver Angiogenese in erhöhter Konzentration vor, induziert aber nicht die Proliferation von

Endothelzellen. Die Stimulation von verschiedenen Zelllinien mit IL-6 hat gezeigt, dass eine signifikante Induktion der VEGF-mRNA hierdurch stattfindet. Dies wird nicht nur durch DNA-Elemente in der Promoterregion vermittelt, sondern auch durch Elemente der Region 5'-UTR (untranslated region) der VEGF mRNA (Cohen *et al.* 1996). Dies ist auch bei der Induktion von VEGF durch Hypoxie der Fall. In den von uns angelegten endometrialen Stroma- und Epithelzellkulturen konnte jedoch keine Stimulation von VEGF durch IL-6 festgestellt werden.

IL-6 könnte somit indirekt zur Regulation von VEGF beitragen. Interessanterweise wird α_2 -Makroglobulin, ein Akute-Phase-Protein, durch IL-6 induziert, zudem wurde berichtet, dass VEGF durch Bindung an α_2 -Makroglobulin inaktiviert wird (Soker *et al.* 1993). Somit wäre es möglich, dass IL-6 über diesen Weg Einfluss auf die Konzentration von zirkulierendem VEGF ausübt.

4.5 IL-6, VEGF und deren Regulation durch Hypoxie

Zellen sind in der Lage, Veränderungen der Sauerstoffversorgung zu registrieren und darauf zu reagieren, so dass es dem gesamten Gewebe möglich ist, unter diesen Bedingungen zu überleben. Hierfür werden verschiedenste Gene hochreguliert, wie zum Beispiel Erythropoetin, das die Erythropoese kontrolliert und zu einer Erhöhung der Bindungskapazität für Sauerstoff führt. Weiterhin werden glykolytische Enzyme induziert, die alternative Stoffwechselwege mit reduziertem Sauerstoffbedarf aktivieren. Die Ischämie von Geweben zeigt Ähnlichkeit zu Entzündungsprozessen, wie zum Beispiel die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Auch VEGF und IL-6 sind Faktoren, deren Konzentration unter dem Einfluss von Hypoxie Veränderungen unterliegt und die für die Anpassung des Gewebes unter diesen Bedingungen entscheidend sind.

4.5.1 IL-6 und dessen Regulation durch Hypoxie

Das Verhalten von IL-6 unter Sauerstoffentzug (O_2) ist von großem Interesse, denn die Unterversorgung von Geweben mit O_2 ist im Körper kein seltenes Ereignis. So ist dies regelmäßig der Fall bei Entzündungen, im nekrotischen Bereich von Tumoren sowie bei der Wundheilung. Die Menstruation zeigt einige Parallelen zu Entzündungen, wie Ödem, lokale Ischämie, Einwanderung von Immunzellen. Auch scheint IL-6 im Wundheilungsprozess eine Rolle zu spielen, denn es wird von Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Auch die Proliferation und Differenzierung von immunkompetenten Zellen wird durch IL-6 und eine Reihe weiterer Zytokine angeregt, wie IL-2, IL-4, IFN- γ .

Die Hypoxie ist als stimulatorischer Faktor für Interleukin-6 gut bekannt. So steigt die IL-6-Produktion in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) und in Endothelzellen (Yan *et al.* 1995) unter Sauerstoffentzug deutlich an (Naldini *et al.* 1997). Naldini *et al.*, 1997 beschreiben eine Erhöhung von IL-6 in PBMCs um 36% sowie die Aktivierung der Transkription an der NF-IL-6-DNA-bindenden Stelle in der Promoterregion des Kerns und die Aktivierung von NF-kappa B (Koong *et al.* 1994, Yan *et al.* 1997). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors–NF- κ B ist in einigen Genen, die durch Hypoxie induziert werden, der gemeinsame Mechanismus, über den deren Exprimierung in Gang gesetzt wird (Koong *et al.* 1994).

Nun stellte sich die Frage, ob diese für andere Zelltypen beschriebene Steigerung von IL-6 durch Hypoxie auch in endometrialen Stroma- und Epithelzellen vorliegt. Dies konnte durch unsere Zellkulturen unter einem Sauerstoffgehalt von 2% bestätigt werden. Es fand eine deutliche Erhöhung des Proteins IL-6 sowohl in Epithel- als auch in Stromazellen statt. Wesentlich deutlicher ausgeprägt war hier die Reaktion der Stromazellen auf die Hypoxie. Hier machte sich ein durchschnittlicher Anstieg von IL-6 um den Faktor 9,6 nach 24 Stunden bemerkbar, wohingegen bei den Epithelzellen nur eine Steigerung um den Faktor 0,5 nach 24 Stunden stattfand. Somit scheint unter Hypoxie vor allem den Stromazellen eine regulatorische Funktion im Bezug auf IL-6 zuzukommen. Die Induktion von IL-6, einem Zytokin mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, könnte Prozesse in Gang setzen, die Entzündungen unter Hypoxie begrenzen.

Zusammenfassung:

Die Hypoxie ist ein relevanter Faktor für eine gesteigerte Produktion von Interleukin-6 in verschiedenen Zelltypen. Es wurde gezeigt, dass sowohl endometriale Stroma- als auch Epithelzellen auf ein verringertes Sauerstoffangebot im Sinne einer IL-6 Erhöhung reagieren.

4.5.2 VEGF und dessen Regulation durch Hypoxie

Die Hypoxie zeigt sich als relevanter Faktor für die Regulation von VEGF im Endometrium. Das endometriale Wachstum und die Reparatur nach der Menstruation sind verbunden mit profunder Angiogenese. Abnormalitäten in diesem Prozess führen zu Veränderungen der Blutung, wie zum Beispiel zu Hypermenorrhö. Hier kommt VEGF eine entscheidende Rolle zu. Da die Menstruation, wie oben erwähnt, einige Parallelen zu Entzündungsprozessen, wie Hypoxie des Gewebes aufweist, stellt sich die Frage, ob VEGF unter Hypoxie induziert wird.

Bereits durchgeführte Studien an Kulturen von Stroma- und Epithelzellen unter Hypoxie haben gezeigt, dass die VEGF-Sekretion durch diese anstieg. Der mRNA-Spiegel stieg durchschnittlich um den Faktor 1.8 in den Kulturen der Stromazellen und um 3.4 in Drüsenepithelzellen. Die mRNA stieg für jede VEGF-Isoform in gleichem Ausmaß an. Deren Induktion durch Hypoxie verläuft über den Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible-factor

(HIF)- α (Smith 1998). Proteinmessungen durch ELISA ergaben ähnliche Ergebnisse (Sharkey *et al.* 2000). Diese Ergebnisse konnten durch unsere Stroma- und Epithelzellkulturen bestätigt werden. Die Stromazellen zeigten auch hier eine deutlichere Steigerung von VEGF im Vergleich zu den Epithelzellen. So konnte die Hypoxie als relevanter Faktor für eine Erhöhung von VEGF *in vitro* bestätigt werden. Fraglich ist, ob die Regulation von VEGF *in vivo* im Gewebeverband unter Hypoxie in gleicher Art und Weise stattfindet. So fanden Sandner *et al.*, 1996 heraus, dass der Entzug von Sauerstoff *in vivo* nur einen geringen Effekt hat. Hierfür wurden Ratten unter 8% O₂ gehalten, danach wurde der Gehalt an mRNA in verschiedenen Organen gemessen. Weder in der Lunge und im Herz noch in der Niere konnte eine Veränderung des VEGF Gehaltes festgestellt werden. Lediglich in der Leber konnte man einen Anstieg um 50% beobachten (Sandner *et al.* 1996). Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Auswirkungen von Hypoxie *in vitro* und *in vivo* könnte die Existenz von Inhibitoren der VEGF-Produktion *in vivo* sein.

Zusammenfassung:

Eine Reduktion des Sauerstoffangebots induziert VEGF in endometrialen Stroma- und Epithelzellkulturen. Hierbei zeigt sich eine deutlichere Steigerung von VEGF in Stroma- als in Epithelzellen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Endometrium stellt ein komplexes Gewebe dar, das sehr genauen Kontrollmechanismen unterliegt. Die zyklischen Veränderungen und damit auch die Vorbereitung auf die Implantation einer Blastozyste werden durch verschiedene Faktoren reguliert. Hierzu gehören endokrine Mechanismen, vermittelt durch die Steroidhormone Östradiol und Progesteron, die Abstimmung des Immunsystems und die Anpassung der Gefäßversorgung. So spielen sowohl eine Vielzahl an Zytokinen als auch Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF, eine entscheidende Rolle. Das Ziel unserer Untersuchung war eine genauere Betrachtung der Regulationsmechanismen im endometrialen Zellverband anhand von Zellkulturen, durch Immunhistochemie sowie durch Analyse des Uterussekretes.

IL-6, ein gut bekanntes Phospho-Glykoprotein, wird im endometrialen Gewebe sowohl von Epithel- als auch von Stromazellen produziert. IL-6 erfüllt im menschlichen Organismus vielfältige Funktionen. Eine entscheidende Rolle scheint ihm bei Entstehung und Erhalt einer frühen Schwangerschaft zuzukommen. IL-6 zeigt ein typisches Verteilungsmuster im Menstruationszyklus mit niedrigen Spiegeln in der Proliferationsphase und einem deutlichen Anstieg in der Sekretionsphase.

Bei den zyklischen Veränderungen des Endometriums ist die Revaskularisierung des Gewebes und deren Regulation durch VEGF ein entscheidender Prozess. VEGF existiert in fünf Isoformen, die durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen. Es kann sowohl in Stroma- wie auch in Epithelzellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Proliferationsphase tritt VEGF ebenso wie IL-6 verstärkt in der Sekretionsphase auf. Dieses Verhalten konnte von uns mit Hilfe der Immunhistochemie bestätigt werden. Im Uterussekret steigt die VEGF-Konzentration im Verlauf des Zyklus an. Diese Tatsachen legen eine Regulation von IL-6 und VEGF durch die Steroidhormone 17β -Östradiol und Progesteron nahe.

Das Verhalten von Interleukin-6 in Bezug auf die Stimulation durch die Steroidhormone 17β -Östradiol und Progesteron wird in der Literatur widersprüchlich dargestellt. So wird zum einen die Erhöhung der IL-6-Konzentration in endometrialen Stroma- und Epithelzellen beschrieben, zum anderen deren Abfall. In den von uns angelegten Versuchen konnte keine statistisch signifikante Änderung von IL-6 durch Östradiol oder Progesteron festgestellt werden.

Einige vorhergehende Studien legten die Regulation von VEGF durch Östradiol und Progesteron nahe. Jedoch scheint es keinen direkten Weg der Regulation durch diese Faktoren zu geben. Östrogen verstärkte den mitogenen Effekt von parallel applizierten Wachstumsfaktoren, Progesteron inhibierte diesen. In endometrialen Stroma- und Epithelzellkulturen wurde die Stimulation von VEGF durch Östrogen von anderen Autoren nachgewiesen. Diese Stimulation konnte von uns nicht bestätigt werden. Es stellt sich die Frage, ob eine indirekte Beeinflussung von VEGF durch andere auto- beziehungsweise parakrine Mechanismen vorliegt.

Unser Ziel war es nun, die Regulation von IL-6 und VEGF durch andere Faktoren, wie beispielsweise Zytokine, zu untersuchen. IL-1 β erweist sich in diesem Zusammenhang als relevant. Es zeigt ein zyklisches Verhalten im Endometrium mit hohen Spiegeln in der Sekretionsphase zur Zeit der Implantation. Gleichzeitig steigt auch seine Serumkonzentration an. IL-1 β stimuliert IL-6 in endometrialen Stromazellkulturen, nicht jedoch in Epithelzellen. Eine Stimulation von VEGF durch IL-1 β konnte von uns nicht festgestellt werden. Ein weiterer bedeutender Faktor, der von uns genauer untersucht werden sollte, war LIF.

LIF erfüllt breite biologische Funktionen, was die Vielzahl an Zielzellen im menschlichen Organismus verdeutlicht. Auch im Endometrium spielt LIF vor allem bei der Implantation eine entscheidende Rolle. Die von uns untersuchte Regulation von VEGF und IL-6 durch LIF erbrachte kein signifikant positives Ergebnis. So konnte eine Stimulation durch LIF weder in Stroma- noch in Epithelzellkulturen nachgewiesen werden.

Des Weiteren analysierten wir die Regulation von VEGF durch IL-6. Auch hier zeigte sich weder in den Stroma- noch in den Epithelzellkulturen eine statistisch erfassbare Veränderung.

Unter verringerter Sauerstoffversorgung finden im Zellverband bestimmte Veränderungen statt, die eine optimale Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen ermöglichen. Die Hypoxie erweist sich als relevanter Faktor für eine gesteigerte Produktion von Interleukin-6 in verschiedenen Zelltypen. Es wurde gezeigt, dass sowohl endometriale Stroma- als auch Epithelzellen auf ein verringertes Sauerstoffangebot im Sinne einer IL-6 Erhöhung reagieren.

Auch VEGF wird in endometrialen Stroma- und Epithelzellkulturen durch eine Reduktion des Sauerstoffangebots induziert. Hierbei kann man eine deutlichere Steigerung von VEGF in Stroma- als in Epithelzellkulturen beobachten.

Unsere Versuchsansätze an Zellkulturen, am Uterussekret und an Endometriumsschnitten haben einen Beitrag zum genaueren Verständnis der Regulationsmechanismen im endometrialen Zellverband geleistet. Die Komplexität der Abläufe jedoch erfordert weiterhin intensive Forschungsarbeit in vivo sowie in vitro, um ein vollständiges Bild des Endometriums zu vermitteln. In diesen Erkenntnissen liegt die Chance, Therapieansätze für einige Erkrankungen, wie zum Beispiel Endometriose oder auch Infertilität zu entwickeln.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bischof P, Meisser A, Campana A 2000 Mechanisms of endometrial control of trophoplast invasion *J.Reprod.Fertil.Suppl.* **55** 65-71.
2. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA & Smith SK 1993 Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol.Reprod.* **48** 1120-1128.
3. Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY & Chung LP 1998 Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum.Pathol.* **29** 910-914.
4. 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.
5. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G & Levi BZ 1996 Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* **271** 736-741.
6. Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock-Jones DS & Smith SK 1995 Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J.Reprod.Fertil.* **105** 205-213.
7. Cullinan-Bove K & Koos RD 1993 Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* **133** 829-837.
8. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN 2000 Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: A Review *Obst.Gynecol.* **95** 1056-1064
9. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J & Leung DW 1991 The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J.Cell Biochem.* **47** 211-218.

10. Giudice LC 1994 Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil.Steril.* **61** 1-17.
11. Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN & Jaffe RB 1995 Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet.Gynecol.Surv.* **50** 688-697.
12. Hornung D, Lebovic DI, Shifren JL, Vigne JL & Taylor RN 1998 Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertil.Steril.* **69** 909-915.
13. Huang JC, Liu DY & Dawood MY 1998 The expression of vascular endothelial growth factor isoforms in cultured human endometrial stromal cells and its regulation by 17beta-oestradiol. *Mol.Hum.Reprod.* **4** 603-607.
14. Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzanique JC & Abu-Jawdeh G 1999 Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation.* **6** 127-140.
15. 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. *Endocrinology* **131** 1037-1046.
16. Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y & Ohama K 1998 Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum.Reprod.* **13** 1036-1043.
17. Koong AC, Chen EY & Giaccia AJ 1994 Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res.* **54** 1425-1430.
18. Laird SM, Li TC & Bolton AE 1993 The production of placental protein 14 and interleukin 6 by human endometrial cells in culture. *Hum.Reprod.* **8** 793-798.
19. 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** 1339-1343.
20. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F & Lee ME 1995 Induction of vascular endothelial growth factor gene

- expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **270** 308-312.
21. Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadia AC, Gonzalez-Gomez F, Ruiz C & Olivares EG 1995 Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am.J.Reprod.Immunol.* **34** 188-194.
 22. 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.
 23. Naldini A, Carraro F, Silvestri S & Bocci V 1997 Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J.Cell Physiol* **173** 335-342.
 24. Obermair A, Obruca A, Pohl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J & Feichtinger W 1999 Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil.Steril.* **72** 269-275.
 25. Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F & Milgrom E 1988 Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology* **123** 1511-1519.
 26. Piquet-Pellorce C, Grey L, Mereau A & Heath JK 1994 Are LIF and related cytokines functionally equivalent? *Exp.Cell Res.* **213** 340-347.
 27. Ray P, Ghosh SK, Zhang DH & Ray A 1997 Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett.* **409** 79-85.
 28. Rier SE, Zarmakoupis PN, Hu X & Becker JL 1995 Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **80** 1431-1437.
 29. Salamonsen LA & Woolley DE 1999 Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J.Reprod.Immunol.* **44** 1-27.

30. Saito S 1999 Cytokine network at the feto-maternal interface *J.Reprod.Immunol.* **47** 87-103
31. Sandner P, Gess B, Wolf K & Kurtz A 1996 Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo. *Pflugers Arch.* **431** 905-912.
32. Schatz F, Gordon RE, Laufer N & Gurside E 1990 Culture of human endometrial cells under polarizing conditions. *Differentiation* **42** 184-190.
33. Seiler P, Plenz G, Deng MC 2001 The Interleukin-6 cytokine system in embryonic development, embryo-maternal interactions and cardiogenesis *Eur.Cytokine Netw.* **12** 15-21
34. Semer D, Reisler K, MacDonald PC & Casey ML 1991 Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **622:99-110.** 99-110.
35. Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK & Charnock-Jones DS 2000 Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85** 402-409.
36. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB & Taylor RN 1996 Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81** 3112-3118.
37. Simon C, Valbuena D, Krussel 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.
38. Smith SK 1991 The role of prostaglandins in implantation. *Baillieres Clin.Obstet.Gynaecol.* **5** 73-93.
39. Smith SK 1996 Vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum.Reprod.* **11 Suppl 2:56-61.** 56-61.
40. Smith SK 1998 Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum.Reprod.Update.* **4** 509-519.

41. Soker S, Svahn CM & Neufeld G 1993 Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to alpha 2-macroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J.Biol.Chem.* **268** 7685-7691.
42. Stewart CL & Cullinan EB 1997 Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev.Genet.* **21** 91-101.
43. Sunder S & Lenton EA 2000 Endocrinology of the peri-implantation period. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* **14** 789-800.
44. Tabibzadeh S 1991 Cytokine regulation of human endometrial function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **622:89-98.** 89-98.
45. Tabibzadeh S 1996 The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol.Hum.Reprod.* **2** 77-92.
46. Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A & May LT 1995 Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum.Reprod.* **10** 2793-2799.
47. Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB & May LT 1989 Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 beta. *J.Immunol.* **142** 3134-3139.
48. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR & Torry RJ 1996 Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil.Steril.* **66** 72-80.
49. Torry DS & Torry RJ 1997 Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am.J.Reprod.Immunol.* **37** 21-29.
50. Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV & Taylor RN 1996 Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81** 1118-1122.
51. Vandermolen DT & Gu Y 1996 Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production, and stimulation thereof by IL-1 beta. *Fertil.Steril.* **66** 741-747.

-
52. Vogiagis D, Marsh MM, Fry RC & Salamonsen LA 1996 Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J.Endocrinol.* **148** 95-102.
 53. Vogiagis D & Salamonsen LA 1999 Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J.Endocrinol.* **160** 181-190.
 54. 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.
 55. Weston G & Rogers PA 2000 Endometrial angiogenesis. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* **14** 919-936.
 56. White TE, 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.
 57. Wolvekamp MC & Marquet RL 1990 Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol.Lett.* **24** 1-9.
 58. Yan SF, Tritto I, Pinsky D, Liao H, Huang J, Fuller G, Brett J, May L & Stern D 1995 Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J.Biol.Chem.* **270** 11463-11471.
 59. Yan SF, Zou YS, Mendelsohn M, Gao Y, Naka Y, Du YS, Pinsky D & Stern D 1997 Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in hypoxia. *J.Biol.Chem.* **272** 4287-4294.
 60. Zarmakoupis PN, Rier SE, Maroulis GB & Becker JL 1995 Inhibition of human endometrial stromal cell proliferation by interleukin 6. *Hum.Reprod.* **10** 2395-2399.
 61. Zhang L, Rees MC & Bicknell R 1995 The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *J.Cell Sci.* **108** 323-331.
 62. Zhang L, Scott PA, Turley H, Leek R, Lewis CE, Gatter KC, Harris AL, Mackenzie IZ, Rees MC & Bicknell R 1998 Validation of anti-vascular endothelial growth factor (anti-

VEGF) antibodies for immunohistochemical localization of VEGF in tissue sections: expression of VEGF in the human endometrium. *J.Pathol.* **185** 402-408.

VII. LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Julia Bücking
Geburtsdatum: 25. Juni 1975
Geburtsort: Erlangen
Wohnort: München
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1981-1985: Grundschule Dechsendorf, Erlangen-Dechsendorf
1985-1994: Albert-Schweitzer-Gymnasium, Erlangen
1. Juli 1994: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

1995: Freiwilliges-Soziales-Jahr, Universitätsklinikum Tübingen

seit Wintersemester 1995/96: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München

April 2003: 3. Staatsexamen an der LMU, München