

Der Corticotropin Releasing Hormon Rezeptor im humanen
Ovar: Funktionelle Analysen und Assoziation mit
Ovarendometriose

von Miriam Ennouri

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Der Corticotropin Releasing Hormon Rezeptor im humanen
Ovar: Funktionelle Analysen und Assoziation mit
Ovarendometriose

von Miriam Ennouri

aus Darmstadt

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Angefertigt in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Mentor: Dr. med. Roman Pavlik

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil Fred Sinowatz

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meiner Mutter gewidmet,
in Liebe und Dankbarkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Der Kinderwunsch und seine Bedeutung.....	3
1.1.	Epidemiologie	3
1.2.	Psychosomatische und psychosoziale Auswirkungen der ungewollten Kinderlosigkeit.....	3
1.3.	Finanzielle Aspekte des unerfüllten Kinderwunsches	4
2.	Stress als Ursache der Kinderlosigkeit.....	5
2.1.	Allgemeine Stresskaskade.....	5
2.2.	Stress und seine Auswirkungen auf das reproduktive System.....	7
3.	CRH und seine Rezeptoren CRH-R1 und -R2	9
4.	CRH und sein Einfluss auf die Reproduktion	12
5.	Die Follikulogenese – Grundlage der Reproduktion	12
6.	Endometriose – eine stressassoziierte Erkrankung.....	13
6.1.	Definition und Epidemiologie.....	13
6.2.	Ätiologie, Pathologie und Stadieneinteilung.....	13
6.3.	Diagnostik und Therapie	14
6.4.	Ovarielle Endometriose.....	15
6.4.1.	Diagnostik	15
6.4.2.	Therapie.....	15
6.4.3.	Endometriose und Sterilität.....	15
6.5.	Follikelreifungsstörung bei Endometriose	17
6.6.	CRH und der Rezeptor CRH-R1 bei Endometriose.....	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	20
1.	Material.....	20
1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
1.2.	Chemikalien	22
1.3.	Lösungen	23
1.4.	Substanzen.....	23
1.5.	Antikörper	24

1.5.1.	Immunfluoreszenz	24
1.5.2.	Immunhistochemie	24
1.5.3.	Immunzytochemie	24
1.6.	Zellen.....	24
1.7.	Gewebe.....	25
1.8.	Software	25
1.9.	Reagenzien, Lösungen und Zubehör	26
1.9.1.	ELISA.....	26
1.9.2.	Immunfluoreszenz	26
1.9.3.	Immunhistochemie und Immunzytochemie	26
1.9.4.	RNA-Extraktion, Reverse Transkription, Quantitative Real-time PCR	27
1.9.5.	Primer	28
1.9.6.	Bradford Assay.....	28
1.9.7.	Caspaseaktivitätsnachweis	29
2.	Methoden.....	30
2.1.	Immunhistochemische Analyse des CRH-R1 im humanen Ovar	30
2.1.1.	Material	30
2.1.2.	Aufbereitung der Parafinschnitte	30
2.1.3.	Prinzip der Immunhistochemie	31
2.1.4.	Antikörper	31
2.1.5.	Durchführung der immunhistochemischen Färbung.....	32
2.1.6.	Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	34
2.2.	Zellkultur	34
2.2.1.	Zellkultur und Zellzählung Zelllinie HGL5	34
2.2.2.	Zellkultur humane primäre Granulosazellen.....	36
2.3.	Kultivierung und Stimulation der Zellen	38
2.3.1.	HGL5.....	38
2.3.2.	Humane primäre Granulosazellen.....	39
2.4.	Die Detektion des Rezeptors CRH-R1 auf mRNA-Ebene.....	41
2.4.1.	Vorbereitung und Stimulation der Zellen.....	41
2.4.2.	RNA-Isolation	41
2.4.3.	Reverse Transkription	42
2.4.4.	Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR).....	43
2.4.5.	Auswertung der Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR).....	45

2.5.	Immunzytochemie	45
2.5.1.	Anfertigen von Chamberslides für die Immunzytochemie	45
2.5.2.	Stimulation	45
2.5.3.	Immunzytochemische Analyse des CRH-Rezeptors 1 mittels ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Peroxidase-Methode	46
2.5.4.	Analyse der immunzytochemischen Färbung	48
2.6.	Lokalisation des CRH-Rezeptors 1 in HGL5-Zellen mittels Immunfluoreszenz.....	49
2.6.1.	Anfertigen von Chamberslides für die Immunfluoreszenz	49
2.6.2.	Analyse des CRH-Reszeptors 1 mittels Immunfluoreszenz	49
2.6.3.	Analyse der Färbung	50
2.7.	Apoptosenachweis mittels Caspase-3/7 Aktivität	50
2.7.1.	Prinzip des Caspase-3/7 Aktivitätsnachweis.....	50
2.7.2.	Caspase-3/7 Aktivitätsnachweis in humanen primären Granulosazellen nach CRH-Stimulation	51
2.7.3.	Auswertung des Caspase-3/7-Aktivitätsnachweis	52
2.8.	Bestimmung der Steroidhormonkonzentration im Primärzellkulturüberstand	52
2.8.1.	Bestimmung des Östrogen- und Progesterongehalts im Primärzellkulturüberstand	53
2.8.2.	Proteinbestimmung.....	54
2.8.3.	Auswertung der Steroidhormonkonzentration im Primärzellkulturüberstand.....	55
IV.	ERGEBNISSE	56
1.	Nachweis und Lokalisation des Rezeptors CRH-R1 in HGL5 Zellen.	56
1.1.	Validierung des Färbesystems.....	56
1.2.	Nachweis des CRH-Rezeptors 1 in HGL5 Zellen.....	56
1.3.	Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Rezeptors mittels Immunfluoreszenz.....	58
2.	Regulation des Rezeptors CRH-R1 in humanen primären Granulosazellen	59
2.1.	Regulation des CRH-Rezeptors 1	59
2.2.	CRH-R1 mRNA Expression in humanen primären Granulosazellen	60

3.	Auswirkungen von CRH und Antalarmin auf die Steroidhormonbiosynthese	61
3.1.	Auswirkungen auf die Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand humaner primärer Granulosazellen	61
3.2.	Auswirkungen auf die Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand humaner primärer Granulosazellen	63
4.	Caspaseaktivität	65
4.1.	Positiv- und Negativkontrollen	65
4.2.	Caspase-3/-7 Aktivität nach CRH Stimulation	65
5.	Immunhistochemie	67
5.1.	Validierung des Färbesystems.....	67
5.2.	Hochregulation des CRH-R1 bei Ovarendometriose	69
V.	DISKUSSION	71
1.	Nachweis, Lokalisation und Rolle des CRH-R1 in HGL5 Zellen und in humanen primären Granulosazellen.....	71
2.	Stressbedingte Regulation des CRH Rezeptors 1 in humanen primären Granulosazellen.....	72
3.	Stressbedingte funktionelle Beeinträchtigung des humanen Ovars	74
4.	Die stressassoziierte Erkrankung Endometriose geht mit einer Hochregulation des CRH-R1 einher	77
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	83
VII.	SUMMARY.....	85
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	87
IX.	VERÖFFENTLICHUNGEN	104
X.	DANKSAGUNG	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
§	Paragraph
>	größer
<	kleiner
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ABC	Avidin Biotin Komplex
Ac	Adenylatzyklase
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CRH-BP	Corticotropin Releasing Hormon Binding Protein
CRH-R1	Corticotropin Releasing Hormon Rezeptor 1
CRH-R2	Corticotropin Releasing Hormon Rezeptor 2
Ct-Wert	Cycle Treshhold Wert

Cy-2	Carbocyanin 2
DAG	1,2-Diacylglycerol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E2	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
H	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HGL5	Humane Granulosaluteinzelllinie 5
HHN	Hypothalamus Hypophysen Nebennieren Achse
IBD	Inflammatory bowel disease
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IVF	In-vitro Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
Ligg.	Ligamenta
LUF-Syndrom	Luteinized unruptured follicle syndrome
M	Molar
MDB	Membranentsalzungspuffer
Mg	Magnesium
Min	Minute
ml	Milliliter

Mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Ng	Nanogramm
nM	Nano molar
Nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIP ₂	Phosphatidylinositol-Biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
Sec	Sekunde
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV-Block	Ultraviolettblock

I. EINLEITUNG

Statistisch gesehen leiden derzeit europaweit etwa 15 – 20 % der Paare unter einem unerfüllten Kinderwunsch (Breckwoldt et al., 2008). In Deutschland geht man momentan von mehr als 1,5 Millionen ungewollt kinderlosen Paaren aus (Beyer et al., 2013).

Es wird vermutet, dass – gerade in unserer leistungsorientierten Gesellschaft – eine stressbedingte Dysregulation des hormonellen Gleichgewichts zur Nichterfüllung des Kinderwunsches in dieser Patientengruppe beiträgt.

Häufiges Kennzeichen akuten und chronischen Stresses ist die Hemmung der hypothalamischen pulsatilen Sekretion des Gonadotropin Releasing Hormons als direkte Folge der vermehrten hypothalamischen Corticotropin Releasing Hormon (CRH) - und Endorphinfreisetzung. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der hypophysären Gonadotropinsekretion und zu einer konsekutiven Störung der Ovarfunktion. Zirkulierende Stresshormone führen zu einer reduzierten Progesteronverfügbarkeit, was wiederum zu einer reduzierten Chance für eine erfolgreiche Implantation führt. Sie inhibieren unter anderem auch die Sekretion der Hormone Progesteron und Östrogen. Auch im Tiermodell konnte der negative Einfluss von CRH auf das reproduktive System gezeigt werden (Nakamura et al., 2008). Als weitere Folge eines chronischen Stressgeschehens ist die Erkrankung der Endometriose bekannt. Bei 40 – 60 % der vorstelligen Sterilitätspatientinnen liegt eine Endometrioseerkrankung vor (Baumann und Gätje, 2013). Es handelt sich hierbei um eine benigne stressassoziierte Erkrankung, welche durch erhöhte Kortisolspiegel gekennzeichnet ist (Lima et al., 2006) und bei der CRH eine Rolle zu spielen scheint (Kempuraj et al., 2004).

Kortisol wie auch das CRH gelten als Effektorhormone einer stressbedingten Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HHN-)Achse. Neueren Erkenntnissen zufolge wird CRH nicht nur im Hypothalamus, sondern auch in anderen Geweben – u. a. im Ovar selbst – synthetisiert (Mastorakos et al., 1994; Asakura et al., 1997). Dabei ist das ovarielle CRH dem hypothalamischen CRH-41 strukturell identisch. Es vermittelt seine Wirkung über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren: die CRH-Rezeptoren (CRH-R) -1 und -2. Obwohl die

physiologische Funktion dieser zwei Rezeptoren bisher nicht vollständig aufgeklärt ist, scheinen sie im Ovar im Rahmen aseptischer, inflammatorischer Prozesse bei der Ovulation und Luteolyse eine wichtige Rolle zu spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen CRH, seinen Rezeptoren und einem möglichen Einfluss auf die Steroidbiosynthese humaner Granulosazellen näher untersucht werden. Es ergeben sich somit folgende Aufgabenstellungen:

Ermittelt werden soll der Einfluss von CRH auf die Steroidhormonbiosynthese in humanen Granulosazellen sowie auf die Gen- und Proteinexpression seines Rezeptors CRH-R1. Des Weiteren soll die Lokalisation des CRH-R1 im humanen Ovar analysiert werden. Darauf aufbauend soll auch untersucht werden, ob Unterschiede der CRH-R1-Immunreaktivität zwischen Normalovarien und Ovarien von Endometriosepatientinnen bestehen.

Die hieraus resultierenden Erkenntnisse sollen helfen, die Auswirkungen von Stresssituationen auf die ovarielle Funktion näher aufzuklären, um zukünftig sowohl diagnostische als auch therapeutische Konzepte im Bereich der Endokrinologie und Reproduktionsmedizin zu verbessern und neu entwickeln zu können.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Der Kinderwunsch und seine Bedeutung

1.1. Epidemiologie

Zahlen zur ungewollten Kinderlosigkeit variieren in amtlichen Statistiken wie auch in der entsprechenden Fachliteratur sehr stark. Zumeist finden sich Zahlen von 10 – 15 % bezüglich der Anzahl ungewollt kinderloser Paare. Es gibt aber auch Schätzungen, in denen davon ausgegangen wird, dass bis zu 30 % aller Paare unter einem unerfüllten Kinderwunsch leiden (Ittner et al., 2000). So sind in Mitteleuropa 6 – 9 % aller Paare ungewollt kinderlos und 3 % bleiben dauerhaft kinderlos (Stobel-Richter et al., 2013). Untersuchungen haben gezeigt, dass 30 % aller Frauen eine mindestens 12-monatige Episode während ihrer reproduktionsfähigen Lebenszeit erleben, in der der Kinderwunsch unerfüllt bleibt (The ESHRE capri workshop group, 2001). Auf internationaler Ebene wird von einer medianen Prävalenzrate für Sterilität von 9 % (Range 3,5 – 16,7 %) ausgegangen (Boivin, 2007). Unter Sterilität versteht man das Ausbleiben einer Schwangerschaft trotz regelmäßig ungeschützten Geschlechtsverkehrs über einen Zeitraum von 12 – 24 Monaten (de Gruyter, 2013). Zum Teil wird eine Lebenszeitprävalenz für Sterilität mit 4 % angegeben (Slama et al., 2012).

1.2. Psychosomatische und psychosoziale Auswirkungen der ungewollten Kinderlosigkeit

Ein unerfüllter Kinderwunsch geht für viele Paare mit einer hohen psychosomatischen und psychosozialen Belastung einher. Die Situation des unerfüllten Kinderwunsches führt bei den Betroffenen oft zu einem Gefühl der Unzulänglichkeit und des Versagens. Art und Grad der Belastung variieren jedoch sehr stark, doch ist die Belastung durch den unerfüllten Kinderwunsch für die betroffenen Paare allgegenwärtig und betrifft beide Partner gleichermaßen (Chachamovich, 2009). Das Gefühl des Nichterfüllens einer gesellschaftlichen Rolle belastet oft die Beziehung der betroffenen Paare wie auch das soziale Leben außerhalb der Beziehung. Des Weiteren nehmen die Belastungen im Zusammenhang mit einer reproduktionsmedizinischen Behandlung vor allem für

die betroffenen Frauen zu (Cousineau, 2007). Wie belastend die Behandlung von den Paaren empfunden wird, hängt einerseits vom Copingstil des Paares ab (Peterson et al., 2008), andererseits auch von der Beratungsqualität vor und während der Behandlung. Etwa 20 % der Paare empfinden die Behandlung tatsächlich als so belastend, dass sie eine entsprechende psychologische Betreuung benötigen (Stobel-Richter, 2013). Vor allem ein länger andauernder Misserfolg oder sogar die erfolglose Beendigung der reproduktionsmedizinischen Behandlung stellen für die betroffenen Paare ein gravierendes Erlebnis und einen Zustand dar, welcher nur schwer akzeptiert werden kann.

1.3. Finanzielle Aspekte des unerfüllten Kinderwunsches

Neben der enormen psychosomatischen und psychosozialen Belastung geht die ungewollte Kinderlosigkeit auch mit einem hohen finanziellen Aufwand auf dem Weg zum eigenen Kind einher. Hierbei muss zwischen privatärztlich versicherten Paaren und einer Versicherung der gesetzlichen Krankenversicherung unterschieden werden. Bei den privaten Krankenversicherungen wird die Problematik meist nach dem „Verursacherprinzip“ gehandhabt. Lässt sich die Ursache der ungewollten Kinderlosigkeit an einer Person festmachen, so muss dessen Versicherung im Regelfall für die Behandlung des Paares aufkommen. Ist das betroffene Paar gesetzlich versichert, so findet sich die hier geltende Regelung im § 27 a des Sozialgesetzbuches V (SGB V). Die zugehörigen Ausführungsbestimmungen sind in den „Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über Maßnahmen der künstlichen Befruchtung“ vom 14.08.1990 geregelt (aktuelle Fassung vom 18.12.2012) (Kentenich et al., 2013). So ist hier geregelt, dass nur verheiratete Ehepaare 50 % der Leistungen für beispielsweise eine In-vitro-Fertilisationsbehandlung erstattet bekommen. Nicht verheiratete Paare erhalten keine anteilige Kostenübernahme. Generell bekommen Frauen unter 25 Jahren und über 40 Jahren sowie Männer unter 25 Jahren und über 50 Jahren keine Kosten erstattet. Nach aktueller Gesetzeslage übernimmt die gesetzliche Krankenversicherung 50 % der Kosten der ersten drei Behandlungszyklen. Vor der letzten Gesetzesänderung im Jahre 2003 wurden die Kosten von vier Behandlungszyklen zu 100 % von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen. Wurden im Jahr 2003 noch insgesamt 105.854 Behandlungen registriert, fiel die Anzahl der Behandlungen im darauffolgenden Jahr nach der

Gesetzesänderung auf 59.448 Behandlungen insgesamt. Bis hin zum Jahre 2012 konnte ein schwankender Anstieg der Gesamtbehandlungen auf 77.378 verzeichnet werden (Jahrbuch 2013 Deutsches IVF-Register, 2014). Im Rahmen der „Richtlinie über die Gewährung von Zuwendungen zur Förderung von Maßnahmen der assistierten Reproduktion“ gibt es eine Bezuschussung durch den Bund, wenn das Bundesland, in dem das betroffene Paar beheimatet ist, die assistierte Reproduktion ebenfalls finanziell unterstützt. Bis heute ermöglichen dies die Bundesländer Sachsen, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen, Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen. Auch bieten einige Krankenkassen bisweilen zusätzliche Satzungsleistungen im Bereich der künstlichen Befruchtung an (Kentenich et al., 2013).

2. Stress als Ursache der Kinderlosigkeit

2.1. Allgemeine Stresskaskade

Die physiologische Reaktion des Organismus auf einen Stressor, also einen stressauslösenden Stimulus, erfolgt im Wesentlichen über zwei verschiedene Systeme. Einerseits kommt es zur Aktivierung noradrenerger Neurone im Bereich des Hirnstammes. Hauptlokalisierung ist hier vor allem der Locus coeruleus, welcher sich im dorsalen Tegmentum des Pons befindet und einen Großteil des cerebralen Noradrenalins produziert und sezerniert. Die hier ausgelösten Aktionspotentiale enden über das sympathische Nervensystem unter anderem in der Medulla der Nebenniere. Hier kommt es zur Ausschüttung von Catecholaminen wie beispielsweise Adrenalin. Das führt zu einer Erweiterung der Bronchiolen, einem Anstieg des Blutdrucks, einer Steigerung der Herzfrequenz sowie zu einer Zentralisierung der Durchblutung und zur Hemmung der Darmperistaltik.

Das zweite System, welches aktiviert wird um auf Stress zu reagieren und damit umzugehen, ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Eine zentrale Rolle spielt hier das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH). Als Reaktion auf einen internen oder externen Stressor kommt es zur verstärkten Sekretion von CRH aus Neuronen des paraventriculären hypothalamischen Nukleus. Über die axonalen Fortsätze der Neuronen gelangt CRH in der Eminentia mediana in die

portalen Blutgefäße. Von dort aus gelangt es zur Adenohypophyse und bindet dort an seine Rezeptoren CRH-R1 und -2 an. Die Aktivierung des Rezeptors hat eine erhöhte Transkription des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens zur Folge. Aus diesem Prohormon entsteht in der Adenohypophyse β -Lipoprotein und das für die Weiterleitung der Stressantwort bedeutsame Adrenocorticotropin (ACTH). ACTH findet hier seinen Eintritt in den Blutkreislauf und gelangt somit zu seinem Hauptzielorgan, der Nebenniere. Es handelt sich hierbei um eine paarig angelegte Hormondrüse, welche dem oberen Pol der Niere aufsitzt. Man unterscheidet die äußere Zona glomerulosa, in welcher Mineralcorticoide gebildet werden, die mittlere Zona fasciculata, aus der Glucocorticoide ausgeschüttet werden, und die innere Zona reticularis, in der hauptsächlich Androgene synthetisiert werden.

Das Nebennierenmark ist Teil des sympathischen Nervensystems und verantwortlich für die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin. Erreicht ACTH die Zona fasciculata der Nebennierenrinde, so stimuliert es dort die Synthese und Freisetzung von Glucocorticoiden, den eigentlichen Effektor-Molekülen der Stressantwort. Über die Blutzirkulation gelangen die ausgeschütteten Glucocorticoide in alle Organsysteme und ermöglichen so eine Koordination derjenigen Gehirn- und Körperfunktionen, die für die Auseinandersetzung mit dem Stressor sowie für die anschließende Erholungs- und Adaptationsphase essentiell sind.

Über einen inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und damit die gesamte Stresskaskade reguliert. Dies erfolgt über Glucocorticoidrezeptoren wie auch über hochaffine Mineralocorticoidrezeptoren in den Bereichen des Hippocampus, des Hypothalamus und der Hypophyse und führt letztendlich zur Beendigung der neuroendokrinen Stressreaktion (Jacobson und Sapolsky, 1991; de Kloet, 1995).

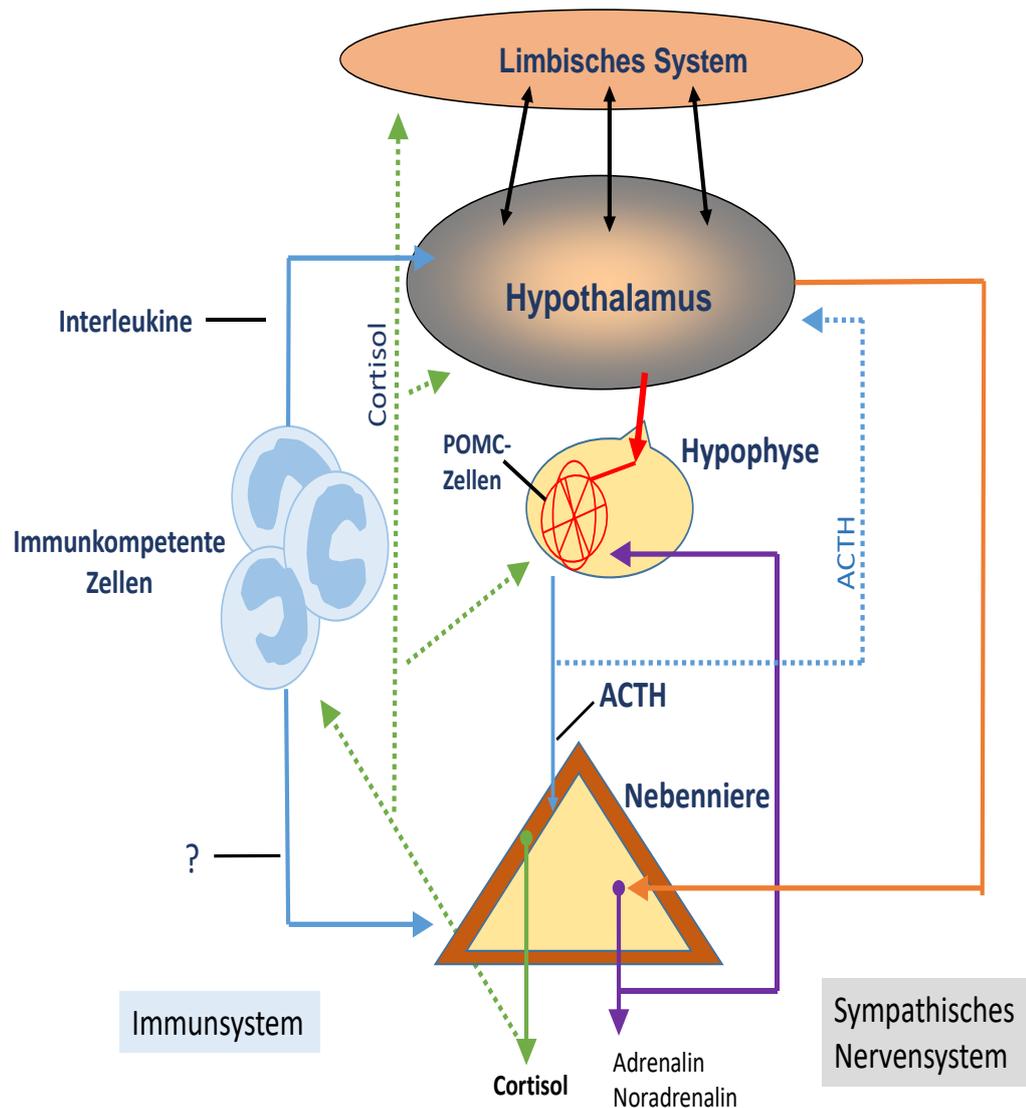


Abbildung 1: Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Neben der neuroendokrinen Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde und der Feedback-Wirkung durch Cortisol sind auch die Interaktionen mit dem Immunsystem und dem sympathischen Nervensystem auf allen Ebenen dargestellt (modifiziert nach Klinke et al., 2010).

2.2. Stress und seine Auswirkungen auf das reproduktive System

Der negative Einfluss von Stress auf das reproduktive System konnte an verschiedenen Stellen gezeigt werden. So ist bereits bekannt, dass eine Erhöhung der zirkulierenden Stresshormone zu einer Verschiebung des Ovulationszeitpunktes sowie zu einer Verkürzung der Lutealphase führen kann

(Mastorakos et al., 1993). Eine damit einhergehende reduzierte Progesteronverfügbarkeit in der Lutealphase verschlechtert die Chancen auf eine erfolgreiche Implantation. Dementsprechend könnten erhöhte Serumspiegel der Stresshormone in der Zeit vor der Konzeption bis zur Frühschwangerschaft die Implantation wie auch die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft mittels Beeinträchtigung der Lutealphase verhindern. Erhöhte Glucocorticoidspiegel inhibieren das von der Hypophyse sezernierte luteinisierende Hormon ebenso wie die Östrogen- und Progesteronsekretion (Magiakou et al., 1997). Diese inhibitorischen Effekte von Stresshormonen führen zu nicht ausreichenden Progesteronkonzentrationen während der Schwangerschaft, welche einen Verlust des Fetus zur Folge haben (Neponmaschy et al., 2007).

Progesteron wird am Anfang der Schwangerschaft im Corpus luteum gebildet, danach, etwa ab der 8. Schwangerschaftswoche, wird es von der Plazenta produziert und ist für die Erstellung einer sicheren immunologischen Umgebung des Fetus von großer Wichtigkeit, was wiederum für den Erhalt einer Schwangerschaft von essenzieller Bedeutung ist (Stites et al., 1983b; Piccinni et al., 1995). Die fetoplazentäre Einheit stellt durch den Anteil der väterlichen Gene ein für den Körper der Mutter fremdes Objekt dar. Es kommt in der Folge somit zu einer Immunreaktion der Mutter auf die Schwangerschaft (Druckmann et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Progesteron die immunologische Reaktion maternaler Lymphozyten *in vitro* reduziert (Salomon et al., 2005), es fungiert während der Schwangerschaft somit als natürlicher Immunsuppressor (Stites und Siiteri, 1983a) und kann dementsprechend als eines der wichtigsten Hormone für den Erhalt einer Schwangerschaft bezeichnet werden.

Auch konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass tragende Mäuse, die einem massiven Stressor ausgesetzt werden, aufgrund signifikant erniedrigter Progesteronkonzentrationen abortierten, einhergehend mit einer reduzierten Expression des Progesteronrezeptors am fetomaternalen Übergang (Wiebold et al., 1986; Joachim et al., 2003; Blois et al., 2004).

Des Weiteren konnte im Rahmen zweier IVF-Studien ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Stress und einem negativen Outcome bezüglich IVF-assistierter Schwangerschaften und Lebendgeburten gezeigt werden (Klonoff-Cohen et al., 2001; Cooper et al., 2007).

3. CRH und seine Rezeptoren CRH-R1 und -R2

Das Corticotropin-Releasing-Hormon ist ein aus 41 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches erstmalig 1981 aus dem Hypothalamus des Schafes isoliert wurde (Vale et al., 1981). Es wird durch proteolytische Prozessierung aus einem aus 196 Aminosäuren bestehenden Prohormon gebildet. Beim Menschen und der Ratte ist es sequenzidentisch. Bei Amphibien und Fischen hingegen herrscht bezüglich der homologen CRH-ähnlichen Peptide (Sauvagine bei Amphibien, Urotensin I bei Fischen) eine 50%ige Sequenzübereinstimmung (Dautzenberg und Hauger, 2002).

CRH wird als hauptregulierendes Hormon der HHN-Achse vor allem im paraventriculären hypothalamischen Nucleus gebildet. Es findet sich allerdings auch in anderen Bereichen des zentralen Nervensystems wie beispielsweise dem frontalen Cortex oder dem Cerebellum wieder (Swanson et al., 1983). Auch in der Peripherie konnte die Synthese von CRH bereits gezeigt werden. Hierzu gehören das Nebennierenmark, Ovar, Hoden, Herz, Lunge, Leber, Magen, Duodenum, Pankreas, Plazenta und Haut (Thompson et al., 1987; Bruhn et al., 1987; Grino et al., 1987; Yoon et al., 1988; Fabbri et al., 1990; Mastorakos et al., 1993; Aird et al., 1993; Slominski et al., 2007). Ein weiteres Protein, welches im funktionellen Zusammenhang mit CRH steht, ist das CRH-Bindeprotein (CRH-BP). Dieses konnte bei Nagern und Menschen im Gehirn und der Hypophyse sowie in der Leber, der Plazenta und innerhalb des Blutkreislaufes nachgewiesen werden (Potter et al., 1994; Cortright et al., 1995). Das CRH-BP dient der funktionellen Inaktivierung von CRH und bindet dieses mit hoher Affinität.

CRH und seine homologen Peptide sind Liganden zweier G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Man unterscheidet den Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1 (CRH-R1) und den Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 2 (CRH-R2). Es handelt sich hierbei um membranständige Rezeptoren, welche sieben Transmembrandomänen besitzen. Die mRNA von *crhr1* findet sich im Säugergehirn und der Hypophyse. Peripher findet sich der CRH-R1 vor allem im Hoden, Ovar und der Nebenniere (Chalmers et al., 1995). Der CRH-R2 findet sich zwar ebenfalls im Bereich des ZNS, eine ausgedehntere Expression des Rezeptors findet sich jedoch in peripheren Organen wie Herz, Gastrointestinaltrakt,

Skelettmuskulatur, Lunge, Gefäßsystem und Ovar (Lovenberg et al., 1995). CRH und seine homologen Peptide zeigen bezüglich beider Rezeptoren eine unterschiedliche Spezifität. CRH bindet sowohl an CRH-R1 als auch an CRH-R2. Es bindet an den CRH-R1 mit einer etwa 10-fach höheren Affinität im Vergleich zu CRH-R2 (Bale und Vale, 2004). Bei der Frage nach dem funktionellen Zusammenhang zwischen den Liganden und Rezeptoren des CRH-Systems geht man inzwischen von einer teilweisen antagonistischen Wirkungsweise von CRH-R1 und CRH-R2 aus. Bei einer unmittelbaren Stressantwort erfolgt somit die Aktivierung des CRH-vermittelten CRH-R1-Systems, während eine Aktivierung der Urocortine und deren Bindung an den CRH-R2 zu einer langsam eintretenden Erholungsphase führt und den Organismus so vor potentiell negativen Begleiteffekten bewahrt, die durch zu starke und langandauernde Stressreaktion verursacht werden (Steckler und Holsboer, 1999; Hsu and Hsueh, 2001; Van Praag et al., 2004). Hat CRH an seinen Rezeptor gebunden, so wird das Gs-Protein aktiviert. Es kommt somit zu einer Aktivierung und Stimulierung der Adenylatcyclase. Dies führt zur Aktivierung des second messengers cAMP, welcher seinerseits die Proteinkinase A stimuliert. Durch die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor kommt es zu einer allosterischen Veränderung innerhalb des Rezeptors, welche eine Erhöhung seiner Affinität für das Gs-Protein zur Folge hat und gleichzeitig die Aktivierung und Dissoziation des G-Protein Heterotrimers in seine Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta$ auslöst. Gleichzeitig erhöht die Bindung des Gs-Proteins an den intrazellulären Loop des CRH-R1 die Affinität des Rezeptors für CRH um das 1300-fache.

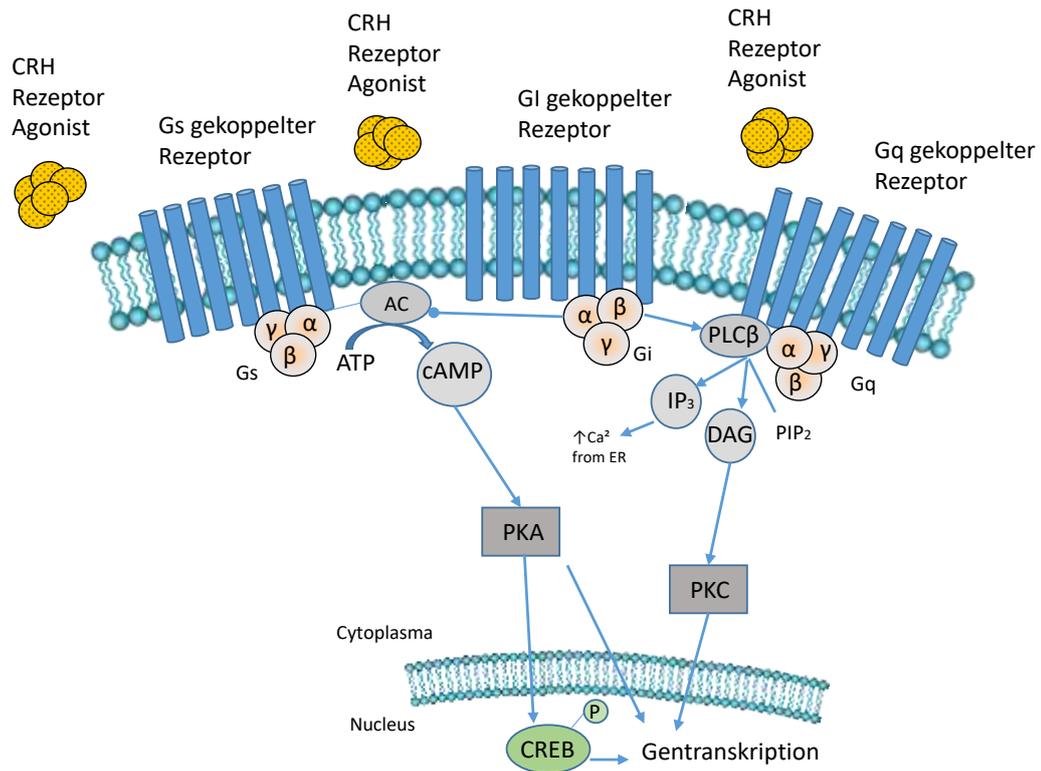


Abbildung 2: G-Protein (Gs, Gi, Gq) – vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion des CRH-Rezeptors: Die intrazelluläre Signalkaskade, die CRH über seine Rezeptoren auslöst, läuft in den meisten Geweben über Gs-Proteine ab. Die Aktivierung des Gs-Proteins führt hierbei über die Adenylatcyclase (AC) zur erhöhten Konzentration an cyclischem AMP (cAMP). cAMP aktiviert die Protein-Kinase A (PKA). PKA führt unter anderem zur Aktivierung des cAMP-response-element binding Proteins (CREB) mit konsekutiv veränderter Expression bestimmter Genabschnitte. Das Gq-Protein vermittelt seine Wirkung über den Phospholipase-C-Pathway (PLC-Pathway). PLC generiert Inositoltriphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂). IP₃ erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, während DAG die Protein-Kinase C (PKC) aktiviert. Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt vorwiegend über das Gs- und Gq-Protein. Abb. modifiziert nach Hauger 2006 und Dautzenberg 2002.

4. CRH und sein Einfluss auf die Reproduktion

Das Corticotropin-Releasing-Hormon, der Hauptregulator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, konnte bereits in einigen peripheren Geweben, wie beispielsweise dem Uterus, der Plazenta und dem Ovar, nachgewiesen werden (Mastorakos und Ilias, 2003). CRH, welches im Endometrium produziert wird, scheint eine Rolle bei der Dezidualisation, Implantation und der maternalen Toleranz gegenüber dem Embryo zu spielen (Kalantaridou et al., 2007). Ovarielles CRH spielt eine Rolle bei der Follikelreifung, Ovulation und Luteolyse. Plazentares CRH moduliert die endokrine Funktion von Trophoblasten, was die Produktion von Östrogen, ACTH und Prostaglandin beeinflusst. Außerdem ist bereits bekannt, dass es den Zeitpunkt der Geburt beeinflusst (Kalantaridou et al., 2007; Makrigiannakis et al., 2003; Vitoratos et al., 2006).

5. Die Follikulogenese – Grundlage der Reproduktion

Die Entwicklung der Keimzellen erfolgt bei der Frau in den Ovarien. Sie beginnt bereits in der Embryonalphase mit der Einwanderung der Urkeimzellen in die Gonadenanlage, wo sie sich zu Oogonien differenzieren. Durch mitotische Teilung vermehren sie sich so bis zum 5. Embryonalmonat auf ca. 6 – 7 Millionen. Es folgt eine Phase der Zelldegeneration, sodass die Mehrzahl der Oogonien bis zur Geburt zu Grunde geht. Ein Teil der Oogonien entwickelt sich während des 3. und 7. Embryonalmonats zu primären Oozyten weiter. Zum Zeitpunkt der Geburt befinden sich diese im Diktyotänstadium, also zwischen Prophase und Metaphase der ersten Reifeteilung, und treten nun in ein Ruhestadium ein. Dieser Vorgang wird als Arretierung bezeichnet. Im Anschluss bildet sich eine Epithelschicht um jede primäre Oozyte und es entstehen somit die Primordialfollikel. Zum Zeitpunkt der Geburt enthält das Ovar noch ca. 400.000 bis 500.000, zu Beginn der Pubertät noch ca. 40.000 Primordialfollikel. Der Großteil der Oozyten ist bis zu diesem Zeitpunkt atresiert. Ab Beginn der Pubertät reifen in jedem Ovarialzyklus Primordialfollikel zu Primärfollikeln und über die Stadien des Sekundär- und Tertiärfollikels zum sprungreifen Graaf'schen Follikel heran. Kurz vor der Ovulation wird die erste meiotische Reifeteilung fortgesetzt bzw. abgeschlossen. Die zweite meiotische Reifeteilung schließt sich nun direkt an. Allerdings wird diese nur vollendet, wenn die Oozyte befruchtet wird (Behrends et al., 2012).

6. Endometriose – eine stressassoziierte Erkrankung

6.1. Definition und Epidemiologie

Als Endometriose wird das Vorkommen endometriumartiger Zellverbände außerhalb des Cavum uteri bezeichnet. Sie zählt zu den am häufigsten auftretenden gynäkologischen Erkrankungen. Leitsymptom dieser Erkrankung ist der Unterbauchschmerz. Häufig geht diese Erkrankung mit Sterilität einher. Die Prävalenzraten bei Frauen werden in der Literatur zwischen 20 – 30 % (– 50 %) variierend angegeben. Es wird geschätzt, dass jährlich etwa 40.000 Neuerkrankungen auftreten. Etwa 20.000 Frauen werden in Deutschland jedes Jahr wegen Endometriose zur Krankenhausbehandlung eingewiesen (Haas et al., 2012). In 52 % der Fälle sind die Ovarien betroffen. Die volkswirtschaftliche Bedeutung durch medizinischen Aufwand und Arbeitsausfall ist beachtlich. Trotzdem ist die Erkrankung in der klinischen und basiswissenschaftlichen Forschung unterrepräsentiert (Schweppe, 2003). In Deutschland vergehen im Durchschnitt zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnosestellung 10 Jahre (Hudelist et al., 2012). Histopathologisch gesehen handelt es sich bei der Endometriose um eine benigne Erkrankung, allerdings kann ein mögliches infiltratives organübergreifendes Wachstum eine ausgedehnte Operation erfordern (Ulrich et al. 2012).

6.2. Ätiologie, Pathologie und Stadieneinteilung

Zur Ätiologie und Pathogenese der Endometriose existieren verschiedene Theorien: Implantationstheorie (Sampson, 1927a; Sampson, 1927b), Zöliom-Metaplasie-Theorie (Meyer, 1919), Archimetra- bzw. „Gewebe-Verletzungs- und Reparatur-Konzept“ (Leyendecker et al., 1998; Leyendecker et al., 2009) und weitere. Auch existieren verschiedene Schemata zur Stadieneinteilung der Endometriose. Am weitesten verbreitet ist die Einteilung der American Society for Reproductive Medicine (sog. rASRM-Score; ASRM, 1997). Des Weiteren existiert die sogenannte ENZIAN-Klassifikation der Stiftung Endometrioseforschung (Tuttlies et al., 2005; Haas et al., 2011; Haas et al., 2013a; Haas et al., 2013b; revidierte ENZIAN-Klassifikation 2012). Auch die klassische Einteilung nach ihrer Lokalisation in Endometriosis genitalis externa und interna sowie extragenitalis (Albrecht, 1955) findet im klinischen Alltag Verwendung. Folgende Organe bzw. Strukturen sind in abnehmender Häufigkeit betroffen:

Beckenperitoneum, Ovarien, Ligg. sacrouterina, Septum rectovaginale/ Fornix vaginae sowie extragenitale Manifestationen (z. B. Rektosigmoid und Harnblase). Manifestationen in Milz, Lunge, Nieren, Gehirn oder im Skelett sind sehr selten. Die Inzidenzen des Befalls von Uterus (Adenomyose) und Tube sind nicht genau bekannt. Seltene, aber typische extragenitale Lokalisationen sind das Zwerchfellperitoneum (Redwine, 2002; Nezhat et al., 1998), die Appendix vermiformis (Gustofsson et al., 2006) und der Nabel (Victory et al., 2014). Endometriose kommt weiterhin in Operationsnarben nach Hysterektomie, Sectio caesarea und Episiotomie bzw. Dammrissen vor (Bektas et al., 2010; Francica, 2012; Ozel et al., 2012; Schuster et al., 2012). Hierfür wird als Ursache die mechanische Übertragung von Endometriumpartikeln diskutiert.

6.3. Diagnostik und Therapie

Die Diagnosestellung erweist sich oft als schwierig, da ein Teil der betroffenen Frauen asymptomatisch ist. Eine asymptomatische Endometriose bei einer Patientin ohne Kinderwunsch ist keine generelle Anzeige für eine chirurgische oder medikamentöse Maßnahme, allerdings gibt es Ausnahmen, wie z. B. die endometriosebedingte Harnleiterstenose mit Hydronephrose (absolute Indikation) (Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose; AWMF, 2010). Eine histologische Abklärung ist grundsätzlich anzustreben (Walter et al., 2001). Somit ist die Laparoskopie in der Regel zentraler Bestandteil der Diagnostik. Indikationen zur endoskopischen Abklärung sind: Schmerzen, Organveränderungen und/ oder Sterilität. Die operative Entfernung der Herde gilt zur Symptomkontrolle als "Goldstandard" (Abbott et al., 2004; Deguara et al., 2012; Garry, 2004).

6.4. Ovarielle Endometriose

6.4.1. Diagnostik

Bei 20 – 50 % aller Frauen mit Endometriose sind die Ovarien betroffen (Hudelist u. Keckstein, 2009). Die präoperative Abklärung erfolgt durch die klinische Untersuchung und die transvaginale Sonographie, wobei das ovarielle Endometriom häufig ein typisches Echomuster aufweist (Hudelist et al., 2009b; Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010).

6.4.2. Therapie

Die effektivste Therapie der ovariellen Endometriome besteht in deren chirurgischer Entfernung. Methode der Wahl dafür ist die operative Laparoskopie (Busacca et al., 1998). Die ovarerhaltende Entfernung (Extraktion) des Zystenbalges ist der thermischen Destruktion durch Hochfrequenz-Strom, Laser-Vaporisation oder Argon-Plasma-Koagulation hinsichtlich der Schmerzsymptomatik sowie der Rezidiv- und Schwangerschaftsraten insgesamt überlegen (Hart et al., Cochrane, 2008; Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010). Die alleinige medikamentöse Therapie der Ovarialendometriome ist unzureichend und wird nicht empfohlen. Eine präoperative GnRH-Analagon-Gabe kann zur Verkleinerung des Endometrioms führen. Ob dadurch operationstechnische Vorteile erzielt oder die Rezidivraten vermindert werden, wird in der Literatur kontrovers dargestellt (Donnez et al., 1996; Muzii et al., 1996). Die postoperative Gabe von GnRH-Analoga kompensiert eine unvollständige Operation nicht (Busacca et al., 2001; Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010).

6.4.3. Endometriose und Sterilität

Sterilität und Endometriose sind häufig assoziiert, wobei der kausale Zusammenhang noch nicht geklärt ist. Eine mechanische Alteration der Adnexe ist als Sterilitätsursache bereits erwiesen. Nach D’Hooghe et al. ergibt sich jedoch ein kausaler Zusammenhang in mehreren Bereichen, wie z. B. eine erhöhte Prävalenz von Endometriose bei subfertilen Frauen im Vergleich zu Kontrollen, eine reduzierte monatliche Fertilitätsrate bei infertilen Frauen mit minimaler bis

leichter Endometriose verglichen mit Frauen mit nicht geklärter Infertilität, eine reduzierte Implantationsrate pro Embryo nach IVF-Behandlung bei Frauen mit mäßiger und schwerer Endometriose verglichen mit Kontrollen sowie eine erhöhte monatliche Fertilitätsrate und kumulative Schwangerschaftsrate nach chirurgischer Entfernung von minimaler und leichter Endometriose (D'Hooghe, 2003; Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010).

Ob die Endometriose eine für die Implantation immunologisch "feindliche" Umgebung erzeugt oder zu einer Beeinträchtigung des Spermatozoentransports, der Eileiterbeweglichkeit und der Eizellreifung führt, ist nach Kissler et al. unklar (Kissler et al., 2006). Allerdings weisen Ergebnisse aus Eizellspende-Programmen darauf hin, dass die Eizellentwicklung und die frühe Embryonalentwicklung bei Frauen mit Endometriose gestört sein können (Garrido et al., 2002; Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010).

Bei mehr als 50 % der diagnostischen Laparoskopien bei Sterilitätspatientinnen können Endometrioseherde verifiziert werden (D'Hooghe, 2003). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Risiko von Sterilität/ Infertilität bei Frauen mit Endometriose 20-fach höher ist als ohne Nachweis von Endometriose und dass die spontane Schwangerschaftsrate mit steigendem Endometriosestadium abnimmt (D'Hooghe, 2003). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei Baboons mit minimaler Endometriose eine monatliche spontane Schwangerschaftsrate von 18 % erreicht wurde, verglichen mit 24 % bei Tieren ohne Endometriose (Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010).

Zusammenfassend stellt sich der Einfluss der Endometriose auf die Fruchtbarkeit wie folgt dar: Nicht betroffene Paare haben eine Wahrscheinlichkeit auf eine Schwangerschaft mit Lebendgeburt von 0,15 – 0,20 /Monat, bei unbehandelten Frauen mit Endometriose und Fertilitätsstörungen liegt diese bei 0,02 – 0,10 /Monat (Practice Committee Am. Soc. Reprod. Med., 2004).

6.5. Follikelreifungsstörung bei Endometriose

Endometriose bedingt kann es zu einer Follikelreifungsstörung kommen. So ist bekannt, dass Endometriose mit einer ovariellen Dysfunktion einhergeht (Cunha-Filho et al., 2000). Nachgewiesen wurde eine verminderte ovarielle Reaktion auf Gonadotropine, eine geringere Zahl an sich entwickelnden Follikeln und niedrigere Estradiolspiegel (Felberbaum et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Granulosazellen von Frauen mit Endometriose eine geringere Steroidproduktion aufweisen; dies könnte im Zusammenhang mit einer verzögerten Follikelentwicklung stehen (Germayer und Gludize, 2003). Als Auslöser wird die verminderte LH-Aktivität in den Follikeln und im Serum diskutiert. Hiermit gehen niedrige Estradiol- wie auch verminderte Progesteronspiegel einher (Harlow et al., 1996). Besonders deutlich wird dies bei stimulierten Zyklen. Die verminderte LH-Aktivität könnte durch erhöhtes Interleukin-6 und damit reduzierte Aromataseaktivität bedingt sein (Deura et al., 2005; Felberbaum et al., 2007). Frauen mit minimaler Endometriose hatten mehr und kleinere Follikel zum Zeitpunkt der mittzyklischen LH-Ausschüttung. Dies war vergesellschaftet mit niedrigen präovulatorischen Estradiol-Konzentrationen und niedrigen E2-Werten bei der LH-Ausschüttung. Kennzeichnend war zudem eine verringerte LH-Ausschüttung sowie eine verkürzte Follikelphase (Felberbaum et al. 2007).

Bekannt sind ebenfalls Lutealphasendefekte bei Frauen mit leichter Endometriose (Pittaway et al., 1983). Diese sind mit einer Dysfunktion der kleinen und großen Lutealzellen vergesellschaftet. Charakterisiert ist dies einerseits durch eine abnormale Follikelphase (niedriger Östradiolspiegel) und andererseits durch eine mäßige LH-abhängige Progesteronsekretion (Cunha-Filho et al., 2000). Auch die Häufigkeit des LUF-Syndroms ist bei Frauen mit Endometriose signifikant höher als bei Frauen, die nicht erkrankt sind ($p < 0,01$; 32,7 vs. 6,9 %). Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung, bei der der Follikel nicht rupturiert und es somit zu einer Follikelpersistenz kommt. Dies geht mit verzögerter Progesteronsekretion und verkürzter Lutealphase einher (Cheesman et al., 1983). Bei Endometriose mit ovarieller Beteiligung lag der Anteil beim LUF-Syndrom noch wesentlich höher (Endometriose mit ovarieller Beteiligung 45,9 % vs. Endometriose ohne ovarielle Beteiligung 9,8 %; $p < 0,001$); beim Vergleich mit Frauen ohne Endometriose lag kein signifikanter Unterschied vor (9,5 vs. 6,9 %) (Pittaway et al., 1983).

6.6. CRH und der Rezeptor CRH-R1 bei Endometriose

Über das Vorkommen von CRH und seinen Rezeptoren bei Patientinnen mit Endometriose ist bislang noch nicht viel bekannt. In einer Studie von Vergetaki et al., in der ektopes (peritoneal, rectovaginal, rectouterin, ovariell, uterosacrales Ligament) wie auch eutopes Endometriosegewebe untersucht wurde, konnte mittels real-time PCR gezeigt werden, dass CRH in endometrialem Gewebe transkribiert wird. Ebenso konnte dies für die beiden Rezeptoren CRH-R1 und -R2 gezeigt und auf Proteinebene mittels Westernblot bestätigt werden. Im eutopen Endometrium konnte gezeigt werden, dass die Expression von CRH-R1 und -R2 bei Frauen mit Endometriose signifikant erhöht ist im Vergleich zu gesunden Frauen. Dies konnte ebenfalls auf Proteinebene verifiziert werden. Im Vergleich von eutopem und ektopem Endometrium derselben Frau konnte gezeigt werden, dass die Expression von CRH und seinen Rezeptoren im ektopen Endometrium signifikant erhöht war im Vergleich zu dem eutopen Endometrium derselben Frau. Für CRH konnte dies auch immunhistochemisch betätigt werden. Für die beiden Rezeptoren CRH-R1 und -R2 konnte dies auf Proteinebene ebenfalls bestätigt werden (Vergetaki et al., 2013).

Auch in einer anderen Studie konnte die Expression von CRH in endometrialem Gewebe mittels Immunhistochemie belegt werden (Kempuraj, 2004).

Für die Klärung aller Zusammenhänge werden weitere Studien benötigt. Jedoch existieren bereits Theorien zur Erklärung der Zusammenhänge von CRH, seinen Rezeptoren und der Erkrankung Endometriose. Stress und die damit einhergehenden Reaktionen des Organismus scheinen hier eine entscheidende Rolle zu spielen. So ist bereits erwiesen, dass der Einfluss von massiven Stressoren gesundheitsschädlich sein kann und Erkrankungen wie eine IBD (inflammatory bowel disease) auslösen (Qui et al., 1999; Levenstein, 2003) und zur Progression einer Endometriose beitragen kann (Lima et al., 2006).

Nach heutigem Stand der Wissenschaft sind die Zusammenhänge von Kinderwunschpatientinnen, die zu einem hohen Prozentsatz an Endometriose erkrankt sind, und dem erhöhten Stresslevel in der heutigen Gesellschaft nicht ausreichend geklärt. Auch wenn bereits geklärt scheint, dass es sich bei der Endometriose um eine stressassoziierte Erkrankung handelt.

Die als mögliche Ursache der ungewollten Kinderlosigkeit angesehene

Endometriose – einhergehend mit einer nachgewiesenen Follikelreifungsstörung sowie einer reduzierten Steroidhormonproduktion – und die bereits beschriebene stressbedingte Reduktion des für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft essenziellen Hormons Progesteron bedarf weiterer Untersuchungen eines hier möglicherweise zu findenden Zusammenhangs zwischen Stress und unerfülltem Kinderwunsch.

Dies führt zu der in der vorliegenden Studie behandelten Fragestellung. CRH gilt als ein Effektorhormon der stressbedingten Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HHN-)Achse. Außerdem ist bekannt, dass es nicht nur zentral, sondern auch peripher, so auch im Ovar, eine Rolle spielt. Somit liegt das Hauptaugenmerk in dieser Studie auf diesem Hormon und seinem G-Protein-gekoppelten Rezeptor CRH-R1, über welchen es seine Wirkung vermittelt. Um zum einen zu klären, wie sich Stress auf die für eine Schwangerschaft essenzielle Steroidhormonbiosynthese auswirkt, wird der Einfluss von CRH auf die Steroidhormonbiosynthese in humanen Granulosazellen sowie auf die Gen- und Proteinexpression seines Rezeptors CRH-R1 untersucht. Des Weiteren soll untersucht werden, wo der Rezeptor CRH-R1 im Ovar lokalisiert ist. Da Vergetaki et al. bereits zeigen konnten, dass der CRH-R1 in Bezug auf die Endometriose eine Rolle im eutopen und ektopen Endometrium der Frau zu spielen scheint, soll in der hier vorliegenden Studie näher untersucht werden, ob Unterschiede bezüglich der CRH-R1 Ausprägung im Vergleich von Normalovarien und Ovarien von Patientinnen, die an einer ovariellen Endometriose erkrankt sind, bestehen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Adhesive Film (Abdeckfolie) MicroAmp® für RT-PCR	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Adhesive Film Applikator MicroAmp®	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Chamberslides, 8-Well	Nalge-Nunc, Rochester, USA
Deckgläser „Thermo Scientific“ 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Digitales Kamerasystem, AxioCam MRm	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
ELISA Reader MRX II	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 2ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Fluoroskan Ascent Fl.	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank, -20 °C	Siemens, München, DE
Gefrierschrank, -80 °C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Immunfluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Jena, DE
Kamerasystem Immunfluoreszenz AxioVision Rel. 4.8	Zeiss, Jena, DE
Kamerasystem JVC	JVC, Yokohama, Japan
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Biberach an der Riss, DE
Lichtmikroskop Diaplan	Leitz, Wetzlar, DE
Mastercycler Gradient für Reverse Transkription	Eppendorf, Hamburg, DE

Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
NucleoSpin-Filter für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® RNAII Säule für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Objektträger Superfrost®	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Optical Fast 96-Well-Platte für RT-PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen, 1 µl – 10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettenspitzen 10 µl- 100 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettenspitzen 100 µl- 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettenspitzen 20 µl- 300 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettierhilfe „Pipet Boy“	Eppendorf, Hamburg, DE
Serologische Pipetten, 2 ml – 25 ml	Becton Dickinson, New-Jersey, USA
RNAse-freie Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Sammelgefäß für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Sterilwerkbank	Uniequip, Planegg, DE
Sterile Spitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Stickstofftank	Talor-Wharton, Theodore, USA
Tischzentrifuge Mini Spin®	Eppendorf, Hamburg, DE
Falcon 50 ml, 15 ml	Becton Dickinson, New-Jersey, USA
Waage „Sartorius“	Kremer und Kreiler Laborgeräte, München, DE
Wellplatten Multiwell™, 24-Well, 96-well	Becton Dickinson, New-Jersey, USA Corning Incorporated, Corning, USA

Zellkulturflasche T75 cm ²	Falcon Becton Dickinson Labware, New-Jersey, USA
Zellscraper	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifuge „Stratos“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

1.2. Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, DE
Ethanol	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Methanol	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Formalin	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Wasserstoffperoxid	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Xylol	Apothekenbedarf der LMU, München, DE

1.3. Lösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) Flüssigmedium ohne Na-Pyruvat mit stabilem Glutamin (3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l D-Glucose)	Biochrom, Berlin, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, A
Hanks' Salzlösung (HBSS) mit 0,35 g/l NaHCO ₃ , ohne Phenolrot, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, DE
Gibco Medium M 199	Life Technologies, Darmstadt, DE
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, DE
Ultrosor G	Pall Life Sciences, New York, USA
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g / 0,2 g)	Biochrom, Berlin, DE
Penicillin-Streptomycin Liquid	Invitrogen, Darmstadt, DE
100 x Antibiotic Antimycotic	Life Technologies, Darmstadt, DE

1.4. Substanzen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Androstendion	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antalarmin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CRH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

1.5. Antikörper

1.5.1. Immunfluoreszenz

Bezeichnung

Kaninchen anti-Maus IgG (H+L)-
Alexa Fluor 488

Bezugsquelle

Dianova, Hamburg, DE

1.5.2. Immunhistochemie

Bezeichnung

CRFR1 antibody (N1N2) N-term
Rabbit (CRFR1= CRH-R1=
Corticotropin Releasing Hormon
Rezeptor 1)

Bezugsquelle

Gene Tex, Irvine, USA

1.5.3. Immunzytochemie

Bezeichnung

Anti human CRHR-1 Antibody
Monoclonal Mouse

Bezugsquelle

R&D Systems, Abingdon, UK

1.6. Zellen

Bezeichnung

HGL5 (Zelllinie)

Bezugsquelle

Dr. Sonntag, Münster, DE

(Transformation of Human Granulosa
Cells with E6 and E7 Regions of Human
Papillomavirus (Rainey, 1994))

Humane primäre Granulosazellen (Bewilligt von der Ethikkommission der LMU München, Projektnummer: 395/04)	Zentrum für Reproduktionsmedizin München, DE und Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin am Klinikum der Universität München, München, DE
Ishikawa cell line human (Zelllinie)	ECACC, Salisbury, UK

1.7. Gewebe

Bezeichnung	Bezugsquelle
Paraffinschnitte von Normalovarien (Bewilligt von der Ethikkommission der LMU München, Projektnummer: 301- 10)	Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München – Campus Innenstadt, München, DE
Paraffinschnitte von Endometriose- Ovarien (Bewilligt von der Ethikkommission der LMU München, Projektnummer: 301- 10)	Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München – Campus Innenstadt, München, DE

1.8. Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABI PRISM 7500 Fast Axio Vision, V.4.5	Applied Biosystems, Forster City, USA Carl Zeiss, Oberkochen, DE

SPSS für Windows, Social Sciences Computer Software Version V.15.01	SPSS, Chicago, USA
Revelation ELISA Reader	Dynex Technologies, Chantilly, USA

1.9. Reagenzien, Lösungen und Zubehör

1.9.1. ELISA

Bezeichnung	Bezugsquelle
Estradiol-ELISA Kit DRG EIA-2693	DRG Instruments GmbH, Marburg, DE
Progesteron-ELISA Kit DRG EIA-1561	DRG Instruments GmbH, Marburg, DE

1.9.2. Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Bezugsquelle
Eindeckmedium VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

1.9.3. Immunhistochemie und Immunzytochemie

Bezeichnung	Bezugsquelle
Eindeckmedium Eukitt® quick- hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Hämalaun	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Substrat Chromogen	Dako, Glostrup, DK
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) plus Vectastain Elite ABC-Kit rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Liquid DAB + Substrate chromogen system	Dako, Glostrup, DK

1.9.4. RNA-Extraktion, Reverse Transkription, Quantitative Real-time PCR

Bezeichnung	Bezugsquelle
RNA Extraktion	
NucleoSpin® RNAII Kit	Macherey-Nagel, Düren, DE
Reverse Transkription	
10 x RT Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
25 x dNTP Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Nuclease-freies Wasser	Applied Biosystems, Foster City, USA
Oligo-dT Primer	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Foster City, USA

TaqMan®-PCR

Nuclease-freies Wasser	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2 x	Applied Biosystems, Foster City, USA

1.9.5. Primer

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>CRHR1</i> (Hs00366363_m1)	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>ACTB</i> (Hs99999903_m1)	Applied Biosystems, Foster City, USA

1.9.6. Bradford Assay

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bradford-Reagenz, Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, DE
Bradford-Standard, Protein Assay Standard II	Bio-Rad, München, DE
Küvette (Halb-Mikro-Küvette 10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellysepuffer zusammengesetzt aus:	
- Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- RIPA-Puffer	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

1.9.7. Caspaseaktivitätsnachweis

Bezeichnung	Bezugsquelle
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent	Life Technologies, Darmstadt, DE

2. Methoden

2.1. Immunhistochemische Analyse des CRH-R1 im humanen Ovar

2.1.1. Material

Es wurden 22 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Ovarien von Patientinnen, bei denen eine Endometriose diagnostiziert wurde ($n = 8$), wurden aus dem Archiv der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität ausgewählt. Als Kontrolle ($n = 14$) dienten Normalovarien von Patientinnen, die aufgrund einer nicht das Ovar betreffenden Erkrankung adnexektomiert wurden. Diese wurden ebenfalls aus dem Archiv der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität ausgewählt. Die eingeschränkte Größe des Kollektivs ist durch mehrere Faktoren bedingt und ist somit als Screening zu verstehen. Es handelt sich bei dem Kollektiv um sehr seltene und teilweise auch sehr alte Fälle. Bei den medizinischen Indikationen, aus denen die Normalovarien stammen, wird nach heutigem Stand der Medizin nicht mehr adnexektomiert. Im Bezug auf die hier verwendeten Ovarien der Endometriosepatientinnen, handelt es sich zumeist um Kinderwunschpatientinnen. In einer anderen Patientengruppe als den Kinderwunschpatientinnen spielt die Endometriose fast keine Rolle und man bekommt sie somit, auch aufgrund der häufig fehlenden Symptomatik, eher selten zu Gesicht. Im Hinblick auf den vorherrschenden Kinderwunsch der Patientinnen, wird auch hier nur selten adnexektomiert.

Im Färbeprozess wurde eine Negativ- wie auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Dies dient der Evaluierung der Funktionalität des Färbesystems. Als Positivkontrolle wurden Plazentaschnitte verwendet. Hier konnte der CRH-R1 bereits nachgewiesen werden (Hatzoglou, 1996; Karteris, 1998). Als Negativkontrolle wurden die Schnitte mit einer Kaninchen-IgG-Isotypen-Kontrolle inkubiert. Diese gewährleistet, dass die Spezies des Antikörpers keine unspezifische Anfärbung verursacht.

2.1.2. Aufbereitung der Parafinschnitte

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurde von den Paraffinblöcken jeweils 2 – 3 μm dicke Gewebeschnitte gewonnen, im 45 °C warmen Streckbad geglättet und auf Objektträger aufgezogen. Um eine bessere Haftung zu erzielen, wurden die

Schnitte bei 56 – 58 °C im Brutschrank über Nacht getrocknet.

Bis zur eigentlichen Verwendung der Schnitte, der immunhistochemischen Färbung, wurden die Schnitte gekennzeichnet und in Objektträgermappen bei Raumtemperatur verwahrt.

2.1.3. Prinzip der Immunhistochemie

Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop am Gewebeschnitt. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein auf dem Gewebeschnitt sichtbar macht. Mittels des verwendeten Detektionssystems können schon geringe Mengen an Epitop verstärkt dargestellt werden. Das Ziel ist es, ein Signal am Ort des Epitops in ausreichender Stärke zu erkennen (Lang, 2013). Dies geschieht mittels primärer und sekundärer Antikörper.

2.1.4. Antikörper

Der hier verwendete CRH-R1-Antikörper „rabbit IgG polyklonal“ wurde von der Firma Gene Tex bezogen. Er wurde für die immunhistochemische Färbung 1 : 500 in PBS verdünnt.

2.1.5. Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde gemäß nachfolgendem Protokoll durchgeführt.

Färbeprotokoll:

- Entparaffinieren für 20 min im Xylol
- in 99%igem Ethanol schwenken
- 20 min in 3%igem H₂O₂ in Methanol, zur Blockierung der endogenen Peroxidase
- in 100%igem Ethanol schwenken
- nacheinander in 70%igem und 50%igem Ethanol schwenken
- in Aqua dest. spülen
- Demaskierung durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer mit Lösung A, Lösung B, Na-Citratpuffer Gebrauchslösung, pH 6,0
- in Aqua dest. spülen
- 2 x 2 min in PBS waschen
- 20 min Blockierungsserum
- Abschütten des Blockierungsserums
- Primärantikörper bei 4 °C über Nacht, CRH-R1 Verdünnung 1 : 500 in PBS
- nach 16 h 2 x 2 min in PBS waschen
- 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubieren
- währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes
- 2 x 2 min in PBS waschen
- 30 min mit ABC-Komplex inkubieren
- 2 x 2 min in PBS waschen
- 2 min Substratfärbung mit DAB (3,3 Diaminobenzidin)
- 2 x 2 min in Aqua dest. spülen

- 2 min Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
- 5 min in Leitungswasser bläuen
- aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
- Eindecken mit „Eukitt“

Gebrauchslösungen:

3%iges H₂O₂ für Paraffinschnitte: 150 ml Methanol + 4,5 ml H₂O₂

Natrium-Citratpuffer: 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B + 900 ml Aqua dest.:

- Lösung A: 21,01 g 0,1 M Citronensäure + 1 l Aqua dest.
- Lösung B: 29,41 g 0,1 M Na-Citrat + 1 l Aqua dest.

Vectastain Elite IgG-Kits:

- Blockierungsserum: 3 Tropfen Normalserum + 10 ml steriles PBS (1,5%ig)
- Sekundärantikörper: 3 Tropfen Normalserum (1,5%ig) + 1 Tropfen Antirabbit-IgG (0,5%ig) + 10 ml steriles PBS
- ABC-Komplex: 4 Tropfen Reagenz A (2%ig) + 4 Tropfen Reagenz B (2%ig) + 10 ml

steriles PBS (30 min vor Gebrauch herstellen)

DAB (3,3 Diaminobenzidin): 1 Tropfen DAB Chromogen (5%ig) + 1 ml Substratpuffer

2.1.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der Schnitte wurde mit einem Lichtmikroskop (Firma Leitz, Wetzlar, DE) vorgenommen. Als erstes wurden die Schnitte bei Lupenvergrößerung (10-fach) begutachtet und anschließend bei teils stärkerer Vergrößerung (25-fach) ausgewertet.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach folgendem System: In jedem Schnitt wurde die Anzahl der einzelnen Follikelstadien (primordial, primär, sekundär, tertiär), gemäß den von Welsch et al. publizierten Kriterien ermittelt (Welsch et al., 2010). Innerhalb eines jeden Follikelstadiums wurde unterschieden zwischen negativ bzw. positiv gefärbten Follikeln. Hierbei wurde auf eine rötlich-braune Anfärbung der Granulosazellschicht geachtet. War eine rötlich-braune Anfärbung der Granulosazellschicht vorhanden, wurde der Follikel als positiv gewertet. Positive Follikel wurden mit dem Score 1 bezeichnet, Negative mit dem Score 0. Die einzelnen Follikelstadien konnten somit untereinander wie auch zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Ovarendometriose verglichen werden.

Mittels digitalem Kamerasystem und entsprechender Software (Kamera: Olympus, Tokyo, Japan; Software: Axio Vision, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) konnten Abbildungen der einzelnen Follikelstadien gemacht werden.

Für die statistische Auswertung wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows® v21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zellkultur und Zellzählung Zelllinie HGL5

Zur Etablierung der Methoden wurden Zellen der Zelllinie HGL5 verwendet. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM Nährmedium (+10 % Ultrosor, + 1 % Penicillin/Streptomycin, + 1 % Antibiotic Antimycotic) ausgesät und bei 37 °C kultiviert. Einmal pro Woche wurde das Nährmedium steril entnommen und durch frisches Nährmedium ersetzt, bei dieser Gelegenheit erfolgte auch die Zellzählung.

Zuerst wurde das Nährmedium abgezogen und verworfen. Im Anschluss wurden 10 ml PBS auf die Zellen in der Zellkulturflasche gegeben um diese zu waschen, dieses wurde gleich darauf wieder verworfen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen aufgebracht und die Zellen in der Zellkulturflasche für 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dies dient dem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche.

Danach wurden die Zellen in 9 ml Nährmedium verdünnt und davon 20 µl mit 20 µl Trypanblau für die Zellzählung vermischt. Hierdurch lassen sich vitale von beschädigten Zellen unterscheiden, da der verwendete Farbstoff aufgrund der beschädigten Zellmembran in die Zelle eindringen kann und diese dann blau färbt. Für die Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer mit dieser Zellsuspension beschickt und dann 4 x 16 Kästchen ausgezählt. Die gezählte Summe der Zellen wurde durch 4 dividiert und anschließend aufgrund der verwendeten Verdünnung mit 2 multipliziert.

Die vorhandene Konzentration ergab sich dann aus der gezählten Zellzahl (X) wie folgt: $X \cdot 10^4$ Zellen pro ml.

Anschließend wurde eine definierte Menge an Zellen in eine Zellkulturflasche in 10 ml Nährmedium angelegt.

2.2.2. Zellkultur humane primäre Granulosazellen

Die Follikelpunktionen wurden gemäß folgendem Protokoll bearbeitet, um die humanen primären Granulosazellen in Kultur zu bringen:

- Follikelaspirat in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen pipettieren
- Die Follikelflüssigkeit 10 min bei 1000 g zentrifugieren
- Überstand (Follikelflüssigkeit) abnehmen, ca. 5 ml im Falcon belassen, resuspendieren
- Mit HBSS auffüllen und 10 min bei 1000 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen, resuspendieren
- Schräg auf ein 40 % Percoll-HBSS-Gemisch aufschichten:
 - 4,8 ml HBSS
 - 3,2 ml Percoll
 - + 3 - 5 ml Zellgemisch pro 15 ml Falcon
- 10 min bei 2000 g zentrifugieren
- Interphase abnehmen, in Falcon (50 ml) mit vorgelegtem HBSS einspülen, mit HBSS auffüllen
- 5 min bei 400 g zentrifugieren
- Überstand komplett abnehmen, 1 - 2 ml Trypsin dazugeben, resuspendieren
- Gemisch 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren
- Gemisch resuspendieren, mit HBSS + FCS 1 % auffüllen
- 5 min bei 400 g zentrifugieren
- Überstand abpipettieren, resuspendieren, mit HBSS + FCS 1 % auf 5 ml auffüllen
- Schräg auf Percoll-HBSS-Gemisch aufschichten
- 10 min bei 2000 g zentrifugieren

- Interphase abnehmen, in Falcon (50 ml) mit vorgelegtem HBSS einspülen, mit HBSS auffüllen
- 5 min bei 400 g zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Filter auf Falcon geben
- ca. 2 ml Medium zum Zellpellet geben, resuspendieren
- auf Filter pipettieren, Falcon in dem das Zellpellet war, mit Medium „waschen“, ebenfalls auf den Filter pipettieren bis ca. 25 ml im Falcon sind
- Filter verwerfen
- 5 min bei 400 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen, mit 5 ml Medium resuspendieren
- 20 μ l zum Zählen in ein Eppendorf-Tube pipettieren
- 20 μ l Trypanblau dazugeben, vermischen
- Gemisch für die Zellzählung in eine Neubauer-Zählkammer geben
- Zellen (4×10^5) auf vorkollagenisierte Chamberslides und Platten auftragen

2.3. Kultivierung und Stimulation der Zellen

2.3.1. HGL5

Immunfluoreszenz und Immunzytochemie

	Immunfluoreszenz	Immunzytochemie
Kultivierung der Zellen	1 Chamberslide (4 Kammern) Pro Kammer: 200.000 Zellen	2 Chamberslides (8 Kammern) Pro Kammer: 100.000 Zellen
Verwendetes Nährmedium	Pro Kammer: 250 µl DMEM +2 % Ultroser, + 1 % Penicillin/Streptomycin, + 1 % Antibiotic Antimycotic	Pro Kammer: 250 µl DMEM +2 % Ultroser, + 1 % Penicillin/Streptomycin, + 1 % Antibiotic Antimycotic
Mediumwechsel nach X Stunden	24	24
Mediumwechsel zu	DMEM + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin ohne Ultroser	DMEM + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin ohne Ultroser
Stimulation nach X Stunden (h)	Keine Stimulation	24
Stimulationsdauer (h)	Keine Stimulation	24
Verwendete CRH-Konzentration	Keine Stimulation	100 ng/ml

2.3.2. Humane primäre Granulosazellen

Immunzytochemie und PCR

	Immunzytochemie	PCR
Kultivierung der Zellen	1 Chamberslide (8 Kammern) Pro Kammer: 100.000 Zellen	24-well Platte Pro Vertiefung: 200.000 Zellen
Verwendetes Nährmedium	Pro Kammer: 250 µl M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FCS	Pro Vertiefung: 500 µl M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic, + 1 % Penicillin/Streptomycin, + 10 % FCS
Mediumwechsel nach X Stunden	72	72
Mediumwechsel zu	M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Androstendion ohne FCS	M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Androstendion ohne FCS
Stimulation nach X Stunden (h)	24	24
Stimulationsdauer (h)	24	1
Verwendete CRH-Konzentration	100 ng/ml	1 µg/ml
Verwendete Antalarmin-Konzentration	100 nM	Keine Stimulation

ELISA und Caspase-Aktivitäts Messung

	ELISA	Caspase-Aktivitäts Messung
Kultivierung der Zellen	24-well Platte Pro Vertiefung: 200.000 Zellen	96-well Platte Pro Vertiefung: 40.000 Zellen
Verwendetes Nährmedium	Pro Kammer: 500 µl M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FCS	Pro Vertiefung: 100 µl M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic, + 1 % Penicillin/Streptomycin, + 10 % FCS
Mediumwechsel nach X Stunden	72	72
Mediumwechsel zu	M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Androstendion ohne FCS	M199 + 1 % Antibiotic Antimycotic + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Androstendion ohne FCS
Stimulation nach X Stunden (h)	24	24
Stimulationsdauer (h)	48	48
Verwendete CRH-Konzentration	1 µg/ml	10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml
Verwendete Antalarmin-Konzentration	20 nM	Keine Stimulation

2.4. Die Detektion des Rezeptors CRH-R1 auf mRNA-Ebene

Mit der quantitativen Real-time PCR wird die Evaluierung der Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene möglich. Hierzu wurde das Prinzip TaqMan®-PCR von Applied Biosystems verwendet. Die Isolation der RNA sowie die Reverse Transkription sind der PCR vorgeschaltet. Diese dienen als Grundlage für die TaqMan®-PCR.

2.4.1. Vorbereitung und Stimulation der Zellen

Die Zelllinie wie auch die primären humanen Granulosazellen wurden, wie bereits beschrieben, kultiviert und stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation. Insgesamt erfolgten drei voneinander unabhängige Experimente.

2.4.2. RNA-Isolation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das NucleoSpin® RNAII Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Zellen wurden entsprechend kultiviert und stimuliert. Anschließend wurden die Überstände abgezogen und verworfen. Als Erstes wurden 200 µl des RA1-Lysepuffers auf die Zellen gegeben, um die Zellen von dem Lochplattenboden zu lösen. Hier wurden jeweils die Zellen aus drei Vertiefungen zusammengeführt und anschließend in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 200 µl 70%iger Ethanol hinzugegeben. Nun wurde das Zellysate auf einen Filter in einem Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 sec bei 11.000 rpm zentrifugiert. Hierbei wird die benötigte RNA an die Matrix gebunden. Als nächster Schritt erfolgte die Entsalzung der Silica-Membran durch Zugabe von 350 µl Membran-Entsalzungspuffer (MDB) auf die Säule mit einer anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 11.000 rpm. Dieser Schritt erhöht die Effektivität des sich anschließenden r- (rekombinanten) DNase-Verdaus.

Als Vorbereitung für den nächsten Schritt zur RNA-Isolation musste zuerst der DNase-Mix erstellt werden. Hierfür wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß für jede zu isolierende Probe 90 µl Reaktionspuffer und 10 µl rekonstituierte rDNase vermischt. Aus dieser Lösung wurden darauffolgend 95 µl direkt auf die Silica-Membran gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei

Waschschritte mit zwei verschiedenen Waschpuffern. Zuerst wurden 200 µl RA2-Waschpuffer auf die NucleoSpin® RNAII Säule pipettiert, welche dann bei 11.000 rpm für 30 sec zentrifugiert wurde. Nun wurde die NucleoSpin® RNAII-Säule in ein neues Sammelgefäß überführt. Es schließen sich zwei weitere Waschschritte mit dem RA3-Waschpuffer an. Zuerst wurden 600 µl des RA3-Waschpuffers auf die Säule gegeben und für 30 sec bei 11.000 rpm zentrifugiert, gleich darauffolgend wurden 250 µl des RA3-Waschpuffers auf die Membran gegeben und für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Zum Abschluss der RNA-Isolation wurde die Säule in ein nucleasefreies Mikrozentrifugenröhrchen überführt, 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert um die RNA zu eluieren.

2.4.3. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die einzelsträngige RNA in die stabilere copyDNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Reverse Transkription wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zuerst wurden die Kitkomponenten aufgetaut. Diese wurden anschließend für 10 sec zentrifugiert und bis zu Versuchsbeginn in Eis kühl gestellt. Für jede Reaktion wurden 10 µl des 2xRT-Mastermix und 10 µl der mRNA vermischt.

Der 2xRT-Mastermix wurde aus folgenden Komponenten hergestellt:

Komponente	Volumen pro Probe (µl)
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (mM)	0,8
Oligo-dT Primer	2,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuclease-freies Wasser	3,2
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0
Gesamtvolumen pro Reaktion	10

Abhängig von der Anzahl der RNA-Proben wurde das notwendige Gesamtvolumen des 2xRT-Mastermixes bestimmt. Für jede Reaktion wurden 10 µl des 2xRT-Mastermixes und 10 µl der mRNA in ein 0,5 ml PCR Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 11.000 rpm für 10 sec zentrifugiert und in einen Eppendorf Mastercycler® Gradienten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert. Im Mastercycler wurde die RNA für 10 min bei 25 °C, für 2 h bei 37 °C, für 5 sec bei 85 °C inkubiert und abschließend auf 4 °C abgekühlt. Die so gewonnene cDNA wurde daraufhin bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

2.4.4. Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR)

Das Prinzip der quantitativen Real-time PCR beruht auf der Vervielfältigung und quantitativen Bestimmung von Transkripten. Mit der quantitativen Real-Time-PCR kann DNA amplifiziert und zusätzlich das Ausgangsprodukt in Echtzeit quantifiziert werden. Die Produkte vorheriger Zyklen dienen als Ausgangsmaterial sich anschließender Zyklen, was eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht. Die Amplifikation erfolgt unter folgenden thermischen Bedingungen: Als erstes wird die Platte für 20 sec auf 95 °C erhitzt. Es folgen 40 Amplifikationszyklen bei 95 °C für je 3 sec und 30 sec bei 60 °C.

Die ersten 20 sec bei 95 °C werden als Initialisierung bezeichnet. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen werden aufgebrochen. Diese Phase dient dazu, dass weitestgehend nur noch Einzelstränge vorliegen. Danach folgt eine rasche Abkühlung auf 60 °C, um die Rückbildung der Doppelhelix zu vermeiden. Diese Temperatur wird dann für 30 sec gehalten und erlaubt die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge. Es schließt sich die letzte Phase eines jeden Zyklus an, die sogenannte Verlängerung. In dieser Phase füllt die Polymerase die Einzelstränge vom Primer ausgehend mit freien Nukleotiden auf. Die Quantifizierung der Amplifikate erfolgt in Echtzeit in der exponentiellen Phase eines jeden Zyklus mittels Fluoreszenzmessung.

Bei der TaqMan® PCR kommen sogenannte TaqMan®-Sonden zum Einsatz, an deren 5'-Ende sich ein Reporterfarbstoff und am 3'-Ende ein sogenannter Quencher befindet. Der Quencher dient hier als Akzeptorfarbstoffmolekül. Aufgrund der Nähe des Quenchers zum Reporter absorbiert dieser die

Reporterfluoreszenz. Eine Besonderheit der hier verwendeten Taq-Polymerasen ist die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Sobald die Polymerase die TaqMan®-Sonde bei der Verlängerung des Primers erreicht, wird die TaqMan®-Sonde am 5'-Ende abgebaut. Dadurch wird der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt und eine steigende Reporterfluoreszenz kann gemessen werden. Dies ist Grundlage der Quantifizierung der Genexpression.

Die TaqMan®-PCR wurde in einer 96-Well Reaktions-Mikrotiter-Platte durchgeführt. Pro Vertiefung wurden 18 µl Mastermix und 2 µl Probe eingesetzt. Als Kontrolle wurde als Probenvolumen 2 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt.

Der Mastermix wurde vor Durchführung der PCR nach folgendem Schema hergestellt:

Komponente	Volumen pro Probe (µl)
TaqMan® Gene Expression Assay; 20x Konzentration	1,0
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix; 2x Konzentration	10,0
Nucleasefreies Wasser	7,0
Gesamtvolumen pro Reaktion	18,0

Als Referenzgen wurde zur Durchführung der PCR *ACTB* verwendet. Referenzgene kodieren Proteine, die von allen Zellen weitestgehend unabhängig von jeglicher Stimulation produziert werden. *ACTB* diene hier somit als Housekeeping-Gen, welches zur Normierung von Abweichungen der Ausgangsmenge dient.

Es wurde der Primer CRHR 1 (Hs0036636_m1, Applied Biosystems) und der Primer ACTB (Hs9999903_m1, Applied Biosystems) verwendet.

Nachdem alle Proben auf der Mikrotiterplatte aufgebracht worden waren, wurden diese mit einer MicroAmp® Abdeckfolie (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) versiegelt. Die Folie dient der Vermeidung der Austrocknung der Proben wie auch einer möglichen Kontamination. Zur Fixierung der Folie auf der Platte wurde ein MikroAmp® Adhesive Film Applikator verwendet.

Anschließend wurde die Platte durch das 7500 ABI PRISM Fast Real-Time PCR Gerät ausgelesen.

2.4.5. Auswertung der Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR)

Die relative Quantifizierung erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Der cycle-threshold-Wert (Ct-Wert) (engl. Cycle threshold für dt. Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet hierbei den Zyklus, der den Beginn der exponentiellen Phase (log-Phase) markiert. Es wird der ΔCt -Wert der Kontrolle vom ΔCt -Wert der Probe subtrahiert, um den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zu erhalten. Der ΔCt -Wert ist der Wert der Probe bzw. Kontrolle normiert auf das Housekeeping-Gen. Durch die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode können Unterschiede in der Genexpression zwischen zwei Proben ausgewertet werden. Hier wurde jeweils die CRH-stimulierte Probe in Relation zur unstimulierten Probe gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kolmogorov-Analyse und Student's t-Test.

2.5. Immunzytochemie

2.5.1. Anfertigen von Chamberslides für die Immunzytochemie

Pro Versuch wurden zwei Chamberslides (je eines mit HGL5 und eines mit humanen primären Granulosazellen) für die Immunzytochemie angelegt.

2.5.2. Stimulation

Die verschiedenen Stimulantien wurden in folgenden Konzentrationen zugefügt.

CRH: 100 ng/ml

Antalarmin: 100 nM

Forskolin: 10 μM

In die Kontrollen, sowie in alle Kammern außer diejenigen die Forskolin enthielten, wurde eine äquivalente Menge an DMSO zugegeben, da das in den Versuchen verwendete Forskolin in DMSO gelöst wurde.

Forskolin diente hier als Positivkontrolle, da es über eine Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung von cAMP führt und somit das aktive Gs-vermittelte GPCR-signalling imitiert (Seamon, 1981).

2.5.3. Immunzytochemische Analyse des CRH-Rezeptors 1 mittels ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Peroxidase-Methode

Zum Nachweis des CRH-Rezeptors 1 wurde die Avidin-Biotin-Complex-Peroxidase-Methode angewendet. Grundlage dieser Methode bildet die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin zu dem B-Vitamin Biotin.

Ein mit Biotin markierter Antikörper fungiert als Brückenantikörper zwischen dem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex.

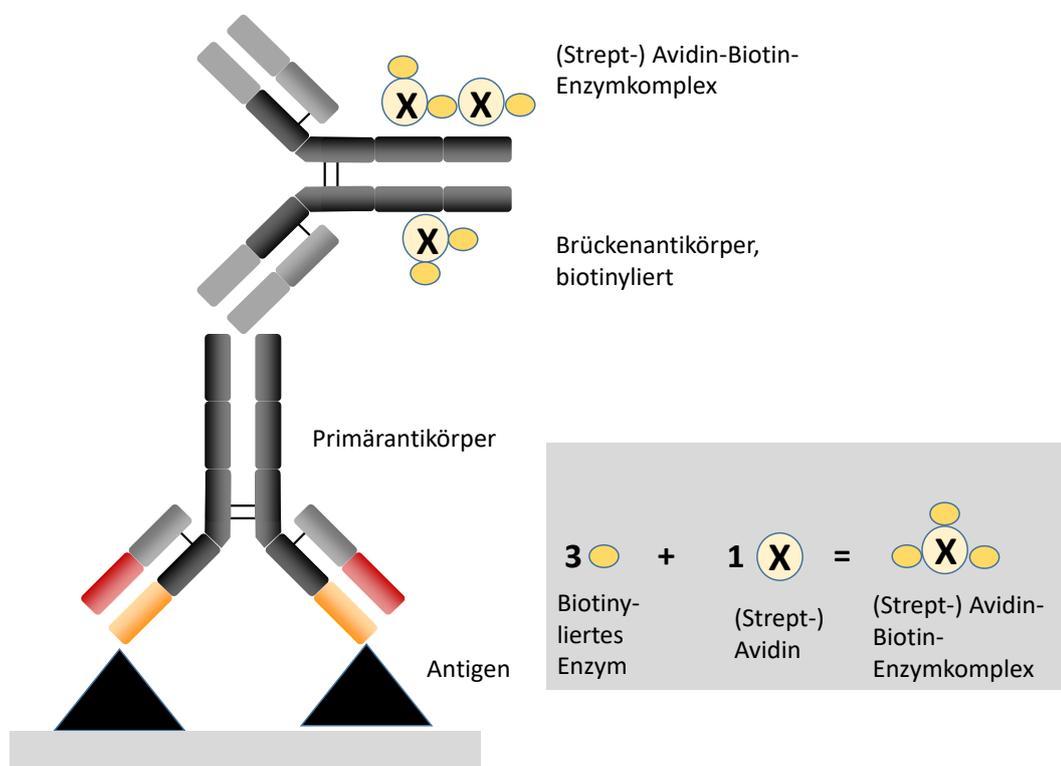


Abbildung 3: Die Avidin-Biotin-Methode. Der Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Antigen und über einen Brückenantikörper bindet er an den ABC-Komplex. Dieser besteht aus Streptavidin, Biotin und der Peroxidase (modifiziert nach Noll und Schaub-Kuhnen (2000)). Praxis der Immunhistochemie. München, Jena, Urban & Fischer Verlag

Dies führt zu einer Farbreaktion, da das Enzym Peroxidase mit dem Substratpuffer und dem Chromogen, in diesem Fall AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), ein rotbraunes Endprodukt bildet. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung mit einem pH-Wert von 4,5. Das hier vorhandene saure Milieu führt zur Anlagerung der positiv geladenen Farbstoffe an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNA im Kern. Im Anschluss erfolgt das Auswaschen und Bläuen der Objektträger in Leitungswasser. Da AEC in organischen Lösungsmitteln löslich ist, erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Aquatex auf wässriger Basis. Die Zellen wurden wie beschrieben auf Chambersslides ausgesät, kultiviert und stimuliert. In Folge wurden die Zellen 15 min mit 50 % Ethanol/ 50 % Methanol fixiert und getrocknet. Anschließend wurden die Zellen 2 x 5 min in PBS gewaschen, um Reste des Ethanols und Methanols zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Digitonin (0,01 mg/ml) für 20 min permeabilisiert und anschließend erneut 2 x 5 min in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Objektträger mit UV-Block bedeckt. Die enthaltenen Proteine lagern sich an die für den Primärantikörper spezifischen, aber auch an unspezifischen Epitopen an und blockieren diese. Aufgrund der höheren Affinität bzw. Avidität des Primärantikörpers für seine spezifischen Bindungsstellen kommt es zu einer spezifischen Bindung und damit Anfärbung. Die unspezifischen Bindungsstellen bleiben blockiert. Somit wird eine unspezifische Anfärbung reduziert bzw. nahezu verhindert. Nach 30 min wurde die Flüssigkeit entfernt.

Für die immunzytochemischen Reaktionen wurden die jeweiligen Chambersslides nun mit dem entsprechenden Primärantikörper gegen CRH-R1 bedeckt: die Inkubation erfolgte 16 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die optimale Verdünnung der Primärantikörper musste vorher ermittelt werden, um eine deutliche Anfärbung bei reduzierter Hintergrundfärbung zu erreichen. Der CRH-R1 Antikörper wurde 1 : 50 in Antibody Diluent verdünnt.

Am nächsten Tag wurden die Chambersslides zuerst 2 x 5 min mit PBS gewaschen. So konnten überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt werden. Nun wurden die Chambersslides 30 min mit dem biotinylierten Brückenantikörper inkubiert und anschließend erneut 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Chambersslides 30 min mit dem ABC-

Elite-Komplex bedeckt und darauffolgend 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte eine 4–6 minütige Inkubation der Chamberslides mit AEC-Reagenz. Es wurde währenddessen kontrolliert, wann die positiven Zellen ihre typische braunrote Färbung erreichen. Nach Spülung mit Aqua dest. wurden die Chamberslides für 30 sec in Hämalan getaucht, um eine Gegenfärbung zu erreichen. Anschließend wurden die Chamberslides für 5 min in Leitungswasser gebläut. Die Chamberslides wurden daraufhin mit Aquatex eingedeckt. Die positiven Zellen färbten sich braun-rötlich. Positiv- wie auch Negativkontrollen wurden im Vorgang mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde die CRH-R1 positive Endometriumsadenokarzinom-Zelllinie Ishikawa mitgeführt (Graziani et al., 2002). Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit einer Maus-IgG-Isotypenkontrolle anstelle des Primärantikörpers inkubiert. Es wurde die gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers verwendet. Hierdurch lässt sich kontrollieren, ob es sich um eine spezifische Bindung handelt oder ob der Sekundärantikörper unspezifisch mit dem Fc-Teil des Maus-IgG reagiert. Für die Zelllinie HGL5 wie auch für die Primärzellen wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

2.5.4. Analyse der immunzytochemischen Färbung

Die CRH-R1-Expression in den HGL5-Zellen sowie in den humanen primären Granulosazellen wurde mittels Lichtmikroskop (Leitz Diaplan) beurteilt. Die abgebildeten Aufnahmen wurden mittels digitalem Kamerasystem (JVC) mittig in der jeweiligen Chamberslide-Kammer aufgenommen. Ein Überblick wurde bei einer 10-fachen Vergrößerung gewonnen. Die Auswertung fand bei einer 10- wie auch bei einer 25-fachen Vergrößerung statt. Pro Versuchsansatz und pro Substanz bzw. Kontrolle wurden jeweils 10 Gesichtsfelder ausgezählt. Es wurden negativgefärbte Zellen von positivgefärbten Zellen unterschieden. Es wurde jeweils der Anteil der positiv gefärbten Zellen verglichen. Die Auswertung erfolgte nach Kolmogrov-Analyse mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben (SPSS, V21, IBM, Chicago, USA).

2.6. Lokalisation des CRH-Rezeptors 1 in HGL5-Zellen mittels Immunfluoreszenz

2.6.1. Anfertigen von Chamberslides für die Immunfluoreszenz

Es wurde ein Chamberslide mit 4 Kammern für die Immunfluoreszenz angelegt.

2.6.2. Analyse des CRH-Reszeptors 1 mittels Immunfluoreszenz

Diese Methode basiert auf der Bindung eines Primärantikörpers an ein nachzuweisendes Antigen. Durch speziesspezifische Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper wird diese Bindung sichtbar gemacht. Fluorochrome können Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Photonen einer anderen Wellenlänge emittieren. Die Lichtemission durch Moleküle oder Atome, die durch Aufnahme energiereicher Strahlen ausgelöst wird, bezeichnet man als Fluoreszenz. Es handelt sich hierbei um eine Sekundärfluoreszenz. Dabei kommt es zu einem Aufleuchten eines Fluorochroms durch Energieanregung. Die Färbung der in dem Chamberslide ausgesäten HGL5-Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll.

Die Zellen wurden zuerst für 15 min in 4 %igem Formalin fixiert. Anschließend wurden sie für 2 x 3 min in PBS gewaschen. Die anschließende Blockierung erfolgte mit PBST, welches sich wie folgt zusammensetzt. In 50 ml PBS werden 0,125 g BSA (Bovines Serum Albumin) und 50 µl Triton X gelöst. Die Inkubation erfolgte hiermit für eine Stunde. Die Primärantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der Primärantikörper CRH-R1 wurde 1 : 50 in PBST verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zuerst 2 x 3 min in PBS gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper vom Objektträger zu entfernen. Anschließend wurde für 30 min mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Hier wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 verwendet und hierfür 1 : 300 in PBST verdünnt. Es handelt sich um einen Cy-2 (Carbocyanin)-konjugierten Rabbit-Anti-Mouse-IgG-Antikörper mit einem Absorptionsspektrum von 490 nm und einem Emissionsspektrum von 570 nm. Ab dem Zeitpunkt, wo Fluorochrome zum Einsatz kamen, musste der Versuch im Dunkeln stattfinden, damit die Fluorochrom-Lichtemission nicht vorzeitig durch Licht zerfällt. Nach Ablauf der 30 min wurden die Zellen erneut für 2 x 3 min in PBS gewaschen und anschließend im Dunkeln getrocknet. Eingedeckt wurde mit 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) Mounting Eindeckmedium, welches den Kernfarbstoff

enthält und selektiv an die DNA bindet. Nachdem die Schnitte mit Deckglas eingedeckt und dieses mit Nagellack fixiert worden war, folgte die Auswertung der Präparate.

2.6.3. Analyse der Färbung

Ausgewertet wurde mit dem Immunfluoreszenz Mikroskop Axioskop der Firma Leitz. Dieses erzeugt mittels einer Quecksilberlampe ein diskontinuierliches Licht, welches ein definiertes Lichtspektrum bzw. eine definierte Wellenlänge abgibt. Anregungsfilter im Mikroskop ermöglichen das Durchdringen von Licht einer bestimmten Wellenlänge zu den Schnitten. Dies führt zu einer Anregung des jeweiligen Fluorochroms. Zusätzlich existieren Emissionsfilter im Mikroskop, die die emittierende Wellenlänge durchlassen und das Anregungslicht zurückhalten. Der hier verwendete Sekundärantikörper bzw. sein Fluorochrom besitzt ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum. Er bindet an Epitope des Primärantikörpers der entsprechenden Spezies, was fluoreszenzmikroskopisch dann sichtbar wird. Zur digitalen Bilderzeugung diente das Kamerasystem AxioVision der Firma Leitz. Die Auswertung erfolgte bei einer 63-fachen Vergrößerung. Es fand eine qualitative Auswertung statt. Vor allem wurde die Lokalisation qualitativ untersucht, um ein in der Mehrheit der Zellen vorherrschendes Muster zu ermitteln.

2.7. Apoptosenachweis mittels Caspase-3/7 Aktivität

Um zu evaluieren, ob die CRH-vermittelten Effekte am Ovar auf eine direkte funktionelle Beeinträchtigung oder aber auf dosisabhängige apoptotische Effekte zurückzuführen sind, wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7 Green Detection Reagent der Firma CellEvent ermittelt.

2.7.1. Prinzip des Caspase-3/7 Aktivitätsnachweis

Caspasen sind cysteinyl-aspartat-spezifische Proteasen. Sie werden ausschließlich als katalytisch inaktive Proenzyme exprimiert. Während der Apoptose kommt es durch proteolytische Spaltung ihrer Untereinheiten zur Aktivierung der Caspasen.

Bei dem hier verwendeten Kit zum Aktivitätsnachweis der Caspasen 3 und 7 handelt es sich um ein die Zelle permeabilisierendes Reagenz, welches den Caspasen

als Substrat dient. Es handelt sich um ein Peptid (DEVD), welches aus vier Aminosäuren besteht und welches an einen konjugierten Farbstoff mit einem Absorptions-/Emissionsmaximum von 502/ 530 nm gekoppelt ist. Dieser Farbstoff führt zu einer Fluoreszenz, sobald er an DNA binden kann. Ohne Aktivierung des Komplexes ist dieser nicht-fluoreszierend, da das Peptid verhindert, dass der Farbstoff an Nukleinsäure bindet, wodurch der eigentliche fluoreszierende Effekt entstehen würde. Durch die Aktivierung der Caspasen in apoptotischen Zellen wird das Peptid abgespalten. Somit kann der Farbstoff an Nukleinsäure binden und somit ist ein fluoreszierendes Signal messbar.

2.7.2. Caspase-3/7 Aktivitätsnachweis in humanen primären Granulosazellen nach CRH-Stimulation

Für die Ermittlung der Caspase-3/7 Aktivität in den Zellen wurden diese wie beschrieben kultiviert und stimuliert. 5 Stunden vor Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit wurde, ebenfalls 4-fach, die Positivkontrolle auf die Platte aufgebracht. Die hierfür verwendeten Vertiefungen blieben bis auf den Mediumwechsel nach den ersten 72 h ohne Manipulation. Als Positivkontrolle diente Staurosporin in einer Konzentration von 1 μ M. Staurosporin ist ein aus dem Pilz *Streptomyces staurospore* gewonnenes Alkaloid, welches bereits als potenter Apoptose-Induktor und Caspase-Aktivator etabliert ist (Belmokhtar, 2001; Sánchez-Margalet, 1993). Nach fünf Stunden Inkubationszeit zeigt sich Staurosporin als Kontrolle für das Detektionssystem positiv und kann als valides Signal ausgewertet werden. Als Negativkontrolle dienten unmanipulierte Zellen der gleichen 96-Well-Platte. Als Leerwert dienten Vertiefungen, die lediglich Medium, jedoch keine Zellen enthielten. Nach erfolgter CRH-Inkubation wurde jeder Vertiefung 8 μ l der gebrauchsfähigen Reagenz hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Platte in den Fluoreszenz-Reader gegeben und das fluoreszierende Signal erfasst.

2.7.3. Auswertung des Caspase-3/7-Aktivitätsnachweis

Zur Auswertung des Caspase-3/7-Aktivitätsnachweises wurden die CRH-stimulierten Zellen mit der Kontrolle in ihrer Intensität des Fluoreszenzsignals verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte nach Kolmogorov-Analyse mittels Student's t-Test. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

2.8. Bestimmung der Steroidhormonkonzentration im Primärzellkulturüberstand

Für die Bestimmung der Östrogen- und Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand wurden die primären humanen Granulosazellen gemäß beschriebenen Protokoll in Kultur gebracht, kultiviert und stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte primäre humane Granulosazellen. Als Positivkontrolle diente hier, wie auch in der Immunzytochemie, Forskolin. Es führt über eine Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung von cAMP und imitiert somit das aktive Gs-vermittelte GPCR-signalling (Seamon, 1981).

Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und die zugehörigen Proteinlysate verwendet, um den Proteingehalt pro Probe zu bestimmen. Dies erfolgte mittels Proteinbestimmung nach Bradford, welche nachfolgend beschrieben wird. Die Proteinlysate dienten somit der Normierung aller Proben.

Für die colorimetrische Messung wurden die abgenommenen Überstände 1 : 100 in Standard Zero verdünnt und der Östrogen- und Progesterongehalt im Zellkulturüberstand gemessen. Diese Messung erfolgte mittels Estradiol-ELISA Kit DRG EIA-2693 und Progesteron-ELISA Kit DRG EIA-1561.

Es handelt sich bei den verwendeten Kits um ein auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basierenden Festphasen-Enzymimmunoassay.

Die Mikrotiterplatten (96 wells) sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet. Dieser ist gegen Estradiol bzw. Progesteron gerichtet.

2.8.1. Bestimmung des Östrogen- und Progesterongehalts im Primärzellkulturüberstand

Es wurden die im Kit enthaltenen Standards sowie die zu messenden Proben in Doppelbestimmung auf der Mikrotiterplatte angelegt. Zu jeder Probe bzw. Standard (25 µl) wurde das Enzymkonjugat zugegeben, für 10 sec geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit kompetitiert das Estradiol bzw. Progesteron aus der Probe mit dem Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Vertiefungen. Zur Estradiolbestimmung wurden pro Vertiefung 200 µl verwendet und für 2 h inkubiert. Zur Progesteronbestimmung wurden pro Vertiefung 200 µl verwendet und für 1 h inkubiert.

Im Anschluss wurde das Enzymkonjugat von den Vertiefungen abgeschüttelt und 3 x hintereinander mit dem gemäß der Herstellerangaben verdünnten Waschpuffer gewaschen. Hierdurch wird das nicht gebundene Konjugat entfernt.

Darauffolgend wurde die Substratlösung in jede Vertiefung gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Stopplösung in jede Vertiefung gegeben, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Zur Estradiolbestimmung wurden 100 µl Substratlösung und 50 µl Stopplösung verwendet. Für die Progesteronbestimmung wurden 200 µl Substratlösung und 100 µl Stopplösung verwendet.

Die Intensität der in den Vertiefungen gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zu der Estradiol- bzw. Progesteronkonzentration in der Probe. Die Extinktion wurde gemäß Herstellerangaben bei 450 nm innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Stopplösung mit einem Mikrotiterplattenmesser (ELISA Reader MRX II, Dynex Technologies, Chantilly, USA) gemessen.

2.8.2. Proteinbestimmung

Zur Ermittlung der genauen Proteinmenge in den angefertigten Lysaten wurde die Methode „Proteinbestimmung nach Bradford“ gewählt.

Hierfür benötigt es eine Standardkurve, die nach folgendem Protokoll erstellt wurde:

Verdünnung des Bradfordstandards zur Erstellung der Standardkurve

Verdünnungen:

1000 µg/ml = 840 µl Standard (unverdünnt) + 160 µl Aqua ad inj.

800 µg/ml = 400 µl Standardlösung (1000 µg/ml) + 100 µl Aqua ad inj.

400 µg/ml = 200 µl Standardlösung (800 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

200 µg/ml = 200 µl Standardlösung (400 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

100 µg/ml = 200 µl Standardlösung (200 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

50 µg/ml = 200 µl Standardlösung (100 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

Es wurde zunächst das Bradford-Reagenz 1 : 5 in Aqua ad inj. verdünnt.

Die zu bestimmenden Proben wurden bei 4 °C für 15 min bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in Reagenzgefäße (Fa. Eppendorf 0,5 ml) überführt. Aus den angefertigten Überständen wurden 10 µl entnommen und in jeweils 1 ml verdünnte Bradford-Reaktionslösung eingespült. Hierbei kommt es zur Bindung von Coomassie blue an die in der Probe vorhandenen Proteine. Dies führt zu einer Farbveränderung und damit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Die in der Probe enthaltene Proteinmenge errechnet sich somit aus der Veränderung der Absorption. Anschließend wurden die Proben gevortext und in Küvetten zur Messung im Photometer überführt. Anhand der zu Beginn der Messung gemessenen Standardkurve wurde die Proteinkonzentration in den zu messenden Proben bestimmt.

2.8.3. Auswertung der Steroidhormonkonzentration im Primärzellkulturüberstand

Zur Auswertung der Steroidhormonkonzentration im Primärzellkulturüberstand wurden die Steroidhormonkonzentrationen der Proben und Kontrollen auf die Proteinkonzentration der zugehörigen Proteinlysate normiert. Anschließend konnte die Probe mit der Kontrolle verglichen werden. Die Auswertung erfolgte nach Kolmogrov-Analyse mittels Student's t-Test. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Nachweis und Lokalisation des Rezeptors CRH-R1 in HGL5 Zellen

1.1. Validierung des Färbesystems

Als Positivkontrolle wurde die CRH-R1 positive Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa sowie Zellen der Zelllinie HGL5 mitgeführt. Bei den Ishikawazellen handelt es sich um eine Zelllinie, bei welcher bereits nachgewiesen werden konnte, dass der CRH-R1 exprimiert wird (Graziani et al., 2002). Bei den HGL5-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus humanen Granulosaluteinzellen (Rainey et al., 1994). Zum Nachweis des Rezeptors wurde, wie unter 3.2.5.3 beschrieben, die Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode verwendet. Es ließ sich ein rötliches flächiges Signal im Bereich des Zytoplasmas der Zellen erkennen (Abbildung 4). Auch in den HGL5-Zellen gelang der Nachweis des CRH-R1 als rötliches flächiges Signal im Zytoplasma der Zellen und diente somit ebenfalls als Positivkontrolle des Färbesystems (Abbildung 4).

Als Negativkontrolle wurden die Ishikawazellen sowie die Zellen der Zelllinie HGL5 mit einer Maus-IgG-Isotypen-Kontrolle anstelle des Primärantikörpers inkubiert. Es wurde die gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers verwendet. Weder in den Ishikawazellen noch in den Zellen der Zelllinie HGL5 konnte ein spezifisches Signal des CRH-R1 im Zytoplasma der Zellen festgestellt werden (Abbildung 4).

1.2. Nachweis des CRH-Rezeptors 1 in HGL5 Zellen

Der Nachweis des Rezeptors gelang in der Zelllinie HGL5. Das beste Ergebnis zeigte sich bei einer Antikörper-Verdünnung von 1 : 50, was einer Konzentration von 10 µg/ml entspricht. Es gelang der spezifische Rezeptornachweis im Zytoplasma der Zellen, während keine unspezifische Hintergrundanfärbung zu erkennen war. Es zeigte sich ein rötliches, feingranuläres, flächiges zytoplasmatisches Signal. Weder eine spezifische Färbung des Zellkerns noch eine Membranassoziation des Signals waren zu erkennen (Abbildung 4).

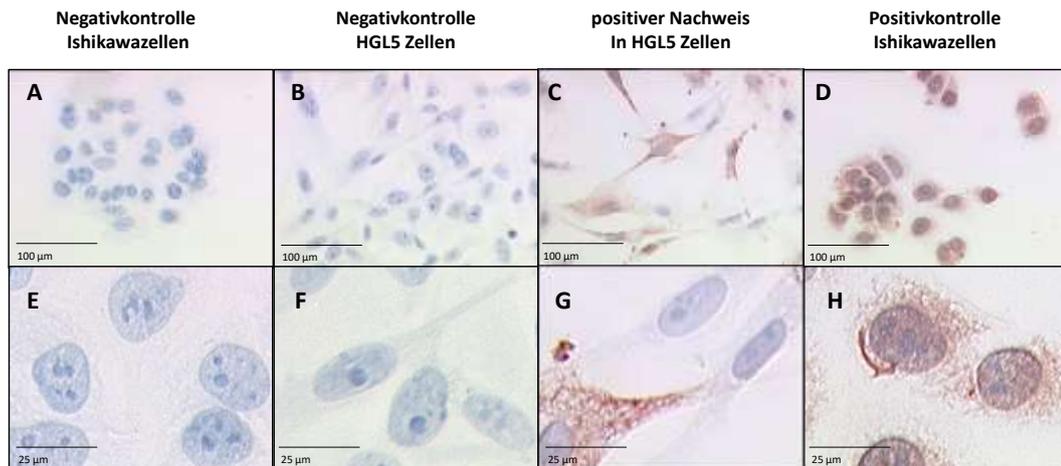


Abbildung 4: Positivkontrollen und Negativkontrollen der immunzytochemischen CRH-R1-Färbung und Nachweis des CRH-R1 in HGL5-Zellen. Als Negativkontrolle dienten Ishikawazellen (A, E) und HGL5-Zellen (B, F), die mit einer Maus-IgG-Isotypenkontrolle inkubiert wurden. Es war keine spezifische Anfärbung des Zytoplasmas zu erkennen. Der CRH-R1 ließ sich im Zytoplasma der HGL5-Zellen nachweisen (C, G). Erkennbar war ein rötliches feingranuläres, flächiges Signal ohne Kern- oder Membranassoziation. Als Positivkontrolle dienten Ishikawazellen. Es ließ sich eine spezifische rötliche Färbung des Zytoplasmas erkennen (D, H).

1.3. Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Rezeptors mittels Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz, die wie unter 3.2.6 beschrieben durchgeführt wurde, konnte der CRH-R1 fluoreszenzmikroskopisch in HGL5-Zellen nachgewiesen und lokalisiert werden. Mit Hilfe von Konzentrationsreihen war zuvor die optimale Verdünnung des primären und des sekundären Antikörpers ermittelt worden. Das beste Ergebnis zeigte sich bei der Verdünnung 1 : 50 für den primären und 1 : 300 für den sekundären Antikörper. Es wurde jeweils eine Probe ohne Primär- und ohne Sekundärantikörper mitgeführt, um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen.

Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigte sich, wie auch schon in der immunzytochemischen Färbung der Zellen, eine diffuse Zytoplasmafärbung mit feingranulärem flächigem Signal. Des Weiteren fanden sich punktförmige perinukleäre Hyperintensitäten. Im Bereich des Kerns konnte keine Färbung festgestellt werden. Auch ist keine Membranassoziation des Signals zu erkennen (Abbildung 5).

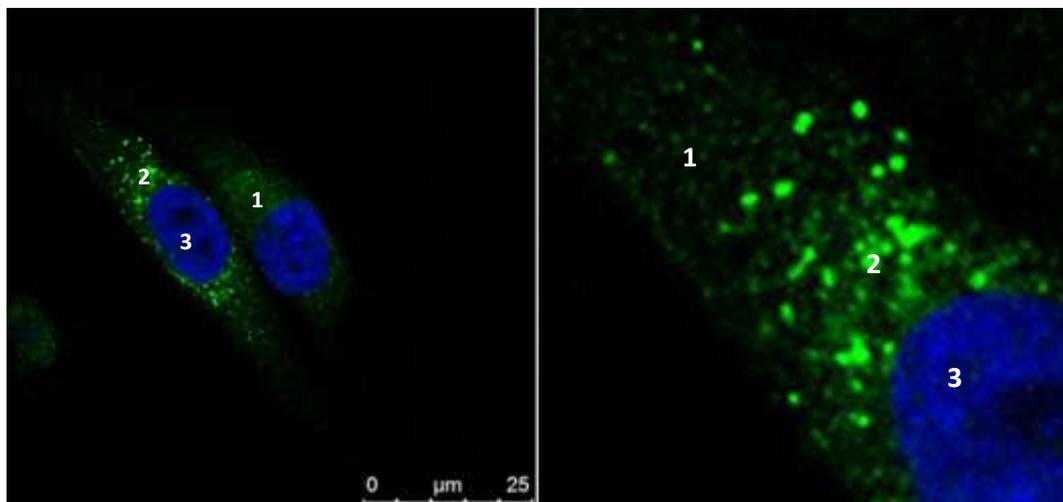


Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des CRH-R1 in HGL5-Zellen. Links 63-fache Vergrößerung, rechts: vergrößerte Darstellung der linken Zelle im Bild (noch einmal 4-fach vergrößert). Flächiges Signal im Bereich des Zytoplasmas (1) mit punktförmigen perinukleären Hyperintensitäten (2). Im Bereich des Kerns konnte kein spezifisches Signal festgestellt werden (3).

2. Regulation des Rezeptors CRH-R1 in humanen primären Granulosazellen

2.1. Regulation des CRH-Rezeptors 1

Die Immunzytochemie, wie unter 3.2.5 beschrieben, diente zur Detektion des CRH-R1 in primären humanen Granulosazellen. Gleichzeitig sollte ermittelt werden, inwiefern die Proteinexpression des CRH-R1 durch CRH und den CRH-R1-Antagonisten Antalarmin beeinflusst wird. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ, wobei der Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt wurde. Zur Überprüfung der Spezifität des Färbesignals der untersuchten Zellen wurden Positiv- sowie Negativkontrollen mitgeführt.

Die Behandlung der humanen primären Granulosazellen, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, mit einer CRH-Konzentration von 1 µg/ml führte bei einer Inkubationszeit von 24 h zu einer erhöhten Anzahl positiv gefärbter Zellen. Von den Zellen, die als Referenz fungierten, waren 1212 von insgesamt 1872 gezählten Zellen CRH-R1 positiv (64,74 %), während bei den CRH stimulierten Zellen 1718 von insgesamt 1891 gezählten Zellen eine positive Zytoplasmafärbung aufwiesen (90,85 %). Somit führte die Stimulation mit CRH zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung der CRH-R1-Proteinexpression um das 1,4-fache im Vergleich zu denen als Referenz fungierenden unstimulierten humanen primären Granulosazellen (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu zeigte eine 24-stündige Stimulation der Zellen mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin keine signifikante ($p = 0,057$) Beeinflussung der CRH-R1-Proteinexpression. Hierbei waren 1176 von insgesamt 1898 gezählten Zellen (61,96 %) CRH-R1-positiv (Abbildung 6). Eine parallel durchgeführte 24-stündige Stimulation der Zellen mit der Kombination aus CRH (1 µg/ml) und Antalarmin (100 nM) induzierte hingegen eine signifikante ($p = 0,017$) Verringerung der CRH-R1-Proteinexpression auf das 0,9-fache im Vergleich zu den als Referenz fungierenden humanen primären Granulosazellen. Hierbei waren 1108 von insgesamt 1908 gezählten Zellen (58,01 %) CRH-R1 positiv im Vergleich zu 1212 von insgesamt 1872 gezählten Zellen in der Kontrolle (64,75 %) (Abbildung 6). Ansätze, die nicht mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin inkubiert wurden, wurden mit einer äquivalenten Menge der Trägersubstanz (Methanol) inkubiert.

2.2. CRH-R1 mRNA Expression in humanen primären Granulosazellen

Mit Hilfe der der quantitativen TaqMan®-PCR, wie unter 3.2.4.4 beschrieben, gelang der Nachweis der CRH-R1-mRNA in humanen primären Granulosazellen. Als Housekeeping Gen diente β -Aktin. Die mRNA Expression wurde relativ zu β -Aktin bestimmt.

Die Behandlung der humanen primären Granulosazellen (siehe 3.2.3.2) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CRH induzierte bei einer Inkubationsszeit von 1 h eine signifikante ($p = 0,031$) Erhöhung der CRH-R1-mRNA-Expression um das 3,37-fache im Vergleich zu den als Referenz fungierenden unstimulierten Granulosazellen (Abbildung 6).

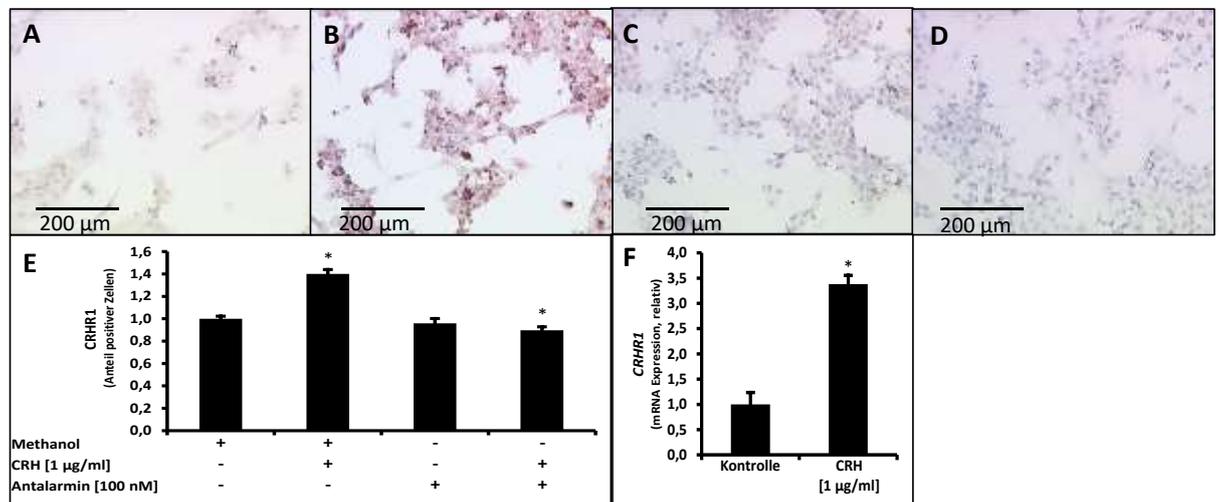


Abbildung 6: Regulation der CRH-R1-Protein-mRNA-Expression über CRH

in humanen primären Granulosazellen. Der CRH-R1 konnte im Zytoplasma der humanen primären Granulosazellen nachgewiesen werden (A-D). Eine 24-stündige Inkubation der Granulosazellen mit CRH (1 $\mu\text{g/ml}$) führte zu einer signifikanten Erhöhung der CRH-R1-Proteinexpression (E), einhergehend mit einer stark erhöhten rötlichen Färbung des Zytoplasmas (B). Auch auf mRNA-Ebene kam es nach CRH-Inkubation (1 h) zu einer signifikanten Erhöhung der CRH-R1-Genexpression (F). Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin konnte kein signifikanter Unterschied der CRH-R1-Proteinexpression im Vergleich zu den als Referenz fungierenden Zellen festgestellt werden (C und E). Die Stimulation der humanen primären Granulosazellen mit einer Kombination aus CRH und Antalarmin führte hingegen zu einer signifikanten Verringerung der CRH-R1-Proteinexpression im Vergleich zu den als Referenz fungierenden Zellen; die Anzahl der Rezeptor-positiven

Zellen im Zytoplasma war deutlich reduziert (D und E). Alle Zellen, die nicht mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin inkubiert wurden, wurden mit einer äquivalenten Menge der Trägersubstanz (Methanol) behandelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, welche zu gleichen Ergebnissen führten.

3. Auswirkungen von CRH und Antalarmin auf die Steroidhormonbiosynthese

Für die Bestimmung der Östrogen- und Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand wurden die primären humanen Granulosazellen gemäß beschriebenem Protokoll (siehe 3.2.3.2 und 3.2.8.1) in Kultur gebracht, kultiviert und stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte humane primäre Granulosazellen. Es sollte ermittelt werden, inwiefern CRH einen funktionellen Einfluss auf die humanen primären Granulosazellen hat, indem das Steroidhormonprofil beeinflusst wird. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob der CRH-R1-Antagonist Antalarmin in der Lage ist etwaige CRH-vermittelte Effekte zu beeinflussen.

3.1. Auswirkungen auf die Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand humaner primärer Granulosazellen

Die Behandlung der Granulosazellen mit 1 µg/ml CRH führte bei einer Inkubationszeit von 48 h zu einer 0,42-fachen Verringerung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen. Allerdings war diese knapp nicht signifikant ($p = 0,091$). Bei einer 48-stündigen Stimulation der Zellen mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin (20 nM) konnte keine signifikante ($p = 0,687$) Veränderung der Östrogenkonzentration im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen festgestellt werden. Bei der Stimulation der Granulosazellen mit einer Kombination aus 1 µg/ml CRH und 20 nM Antalarmin für 48 h kam es im Gegensatz zu den nur mit CRH stimulierten Zellen zu keiner signifikanten ($p = 0,292$) Veränderung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand. Im Vergleich von Zellen, die mit einer Kombination aus Antalarmin (20 nM) und

CRH (1 mg/ml) stimuliert wurden, zu Zellen, die ausschließlich mit Antalarmin (20 nM) stimuliert wurden, kam es zu einer beinahe signifikanten ($p = 0,094$) 0,67-fachen Verringerung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand. Im Vergleich der CRH-stimulierten Zellen zu den Antalarmin-stimulierten Zellen ließ sich eine signifikante ($p = 0,003$) 0,42-fache Verringerung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand erkennen (Abbildung 7).

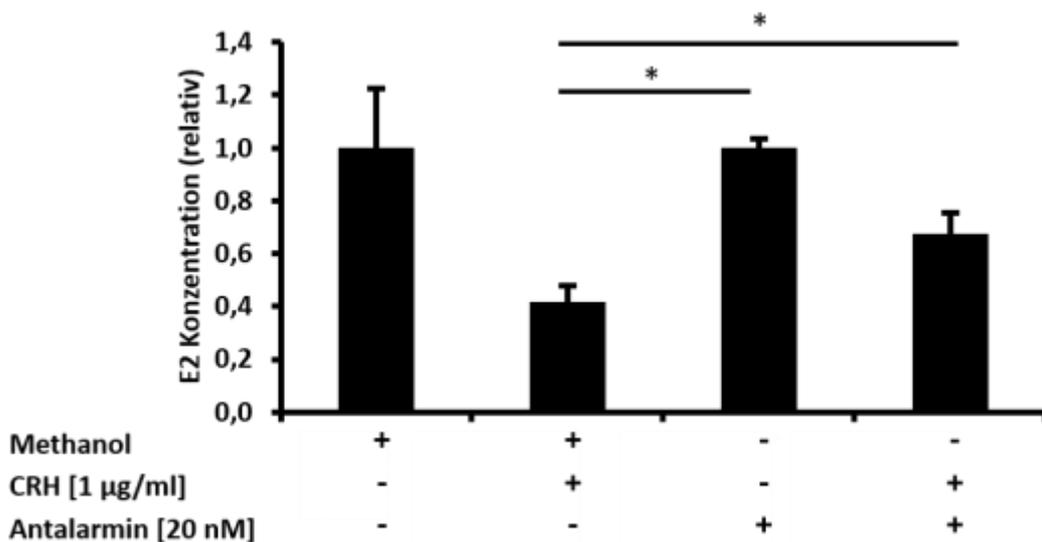


Abbildung 7: Relative Östrogenkonzentration in ng/ml im Zellkulturüberstand von kultivierten humanen primären Granulosazellen nach 48 h Inkubation mit Methanol, der Kombination aus Methanol und CRH, Antalarmin und der Kombination aus Antalarmin und CRH. Eine 48-stündige Inkubation der Granulosazellen mit CRH führte zu keiner signifikanten Veränderung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen. Die Stimulation der Zellen mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand. Auch bei der Stimulation der Granulosazellen mit einer Kombination aus CRH und Antalarmin konnte keine signifikante Veränderung der Östrogenkonzentration festgestellt werden. Im Vergleich von Antalarmin- und CRH-stimulierten Granulosazellen zu Zellen, die ausschließlich mit Antalarmin stimuliert wurden, konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Östrogenkonzentration festgestellt werden. Vergleicht man hingegen die CRH-stimulierten Zellen mit den Antalarmin-

stimulierten Zellen, so war eine signifikante ($p = 0,003$) Verringerung der Östrogenkonzentration im Zellkulturüberstand erkennbar. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, welche zu gleichen Ergebnissen führten.

3.2. Auswirkungen auf die Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand humaner primärer Granulosazellen

Die Behandlung der Granulosazellen mit $1 \mu\text{g/ml}$ CRH führte bei einer Inkubationsszeit von 48 h zu einer signifikanten ($p = 0,028$) 0,66-fachen Verringerung der Progesteronkonzentration im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen. Die Behandlung der Granulosazellen mit 20 nM Antalarmin führte bei einer Inkubationsszeit von 48 h zu keiner signifikanten ($p = 0,188$) Veränderung der Progesteronkonzentration im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen. Bei einer 48-stündigen Inkubation der Zellen mit einer Kombination aus CRH ($1 \mu\text{g/ml}$) und Antalarmin (20 nM) konnte zwar eine Verringerung der Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand festgestellt werden, jedoch war diese statistisch nicht signifikant ($p = 0,292$). Im Vergleich von Antalarmin- und CRH-stimulierten Granulosazellen zu Zellen, die ausschließlich mit Antalarmin stimuliert wurden, konnte eine signifikante ($p = 0,004$) Verringerung der Progesteronkonzentration um das 0,75-fache festgestellt werden. Im Vergleich von CRH-stimulierten Zellen mit Antalarmin-stimulierten Zellen lässt sich keine signifikante ($p = 0,480$) Veränderung der Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand erkennen (Abbildung 8).

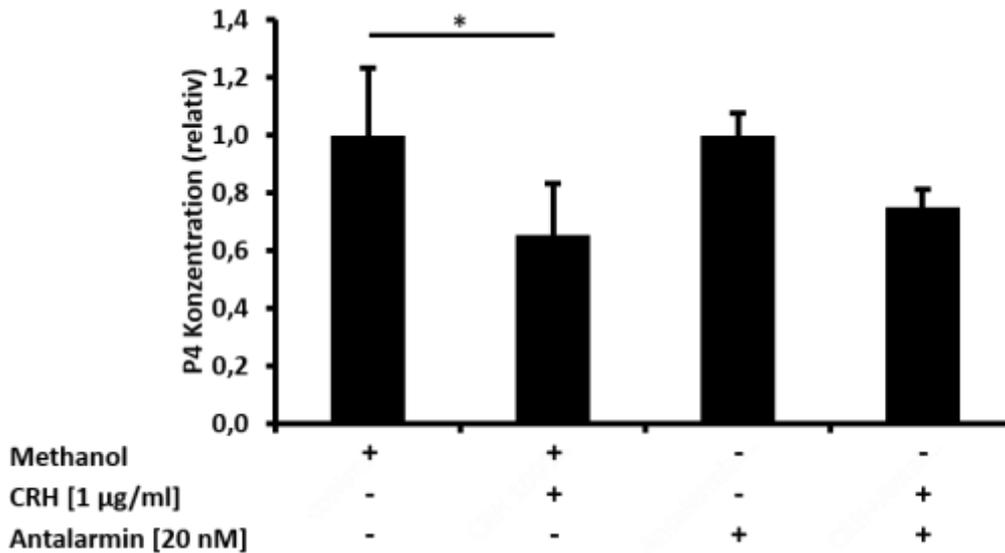


Abbildung 8: Relative Progesteronkonzentration in ng/ml im Zellkulturüberstand von kultivierten humanen primären Granulosazellen nach 48 h Inkubation mit Methanol, der Kombination aus Methanol und CRH, Antalarmin und der Kombination aus Antalarmin und CRH. Eine 48-stündige Inkubation der Granulosazellen mit CRH führte zu einer signifikanten ($p = 0,028$) Verringerung der Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen. Die Stimulation der Zellen mit dem CRH-R1-Antagonisten Antalarmin führte zu keiner Veränderung der Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand. Auch bei der Stimulation der Granulosazellen mit einer Kombination aus CRH und Antalarmin konnte keine signifikante Veränderung der Progesteronkonzentration festgestellt werden. Im Vergleich von Antalarmin- und CRH-stimulierten Granulosazellen zu Zellen, die ausschließlich mit Antalarmin stimuliert wurden, ist ebenfalls keine signifikante Veränderung zu erkennen. Auch der Vergleich von CRH-stimulierten Zellen mit den Antalarmin-stimulierten Zellen zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, die zu gleichen Ergebnissen führten.

4. Caspaseaktivität

Die Quantifizierung möglicher Apoptose erfolgte mittels fluoreszenzphotometrischer Messung der Caspase-3/7-Aktivität in den Zellen. Diese wurden wie beschrieben kultiviert und stimuliert.

4.1. Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrolle dienten mit Staurosporin (1 μM) stimulierte Zellen. Hierbei handelt es sich um ein aus dem Pilz *Streptomyces staurospore* gewonnenes Alkaloid, welches bereits als potenter Apoptose-Induktor und Caspase-Aktivator bekannt ist (Belmokhtar, 2001; Sánchez-Margalet, 1993). Als Referenz dienten unstimulierte Zellen, als Leerwert wurden Vertiefungen verwendet, die lediglich Medium, jedoch keine Zellen enthielten.

Die Behandlung der Granulosazellen mit 1 μM Staurosporin führte bei einer Inkubationszeit von 5 h zu einer signifikanten ($p = 0,019$) Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität um das 5,13-fache im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen (Abbildung 9). Staurosporin konnte somit als Positivkontrolle zur Verifizierung des Systems herangezogen werden.

4.2. Caspase-3/-7 Aktivität nach CRH Stimulation

Die Behandlung der Granulosazellen mit 10 ng/ml CRH führte bei einer Inkubationszeit von 48 h zu keiner signifikanten ($p = 0,300$) Erhöhung der Caspaseaktivität im Vergleich zu den unstimulierten Granulosazellen. Es konnte ebenfalls weder eine Stimulation mit 100 ng/ml CRH ($p = 0,153$) oder eine Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CRH ($p = 0,272$) nach einer Inkubationszeit von 48 h eine signifikante Erhöhung der Caspase-3/-7 Aktivität induzieren (Abbildung 9).

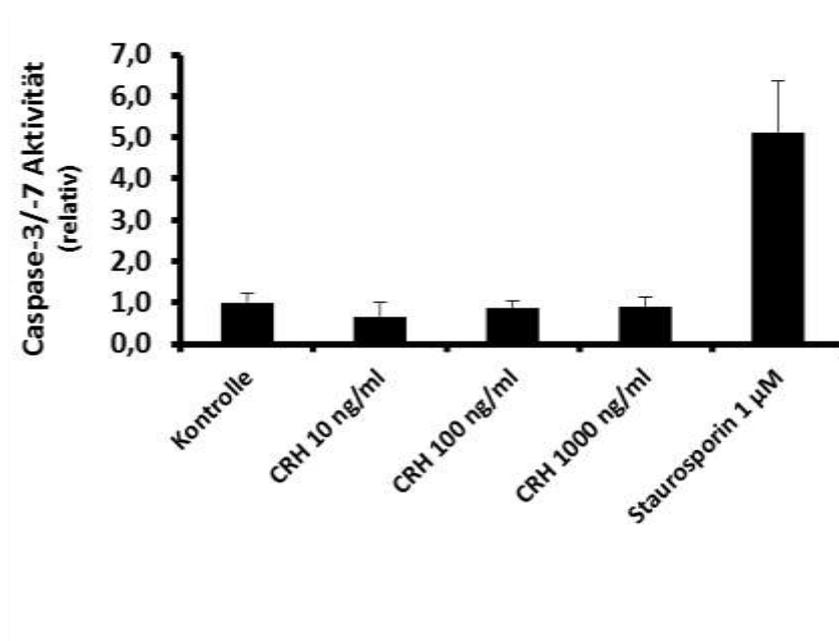


Abbildung 9: Relative Caspase-3/-7-Aktivität nach 48 h Inkubation mit verschiedenen CRH-Konzentrationen und Staurosporin (Positivkontrolle).

Weder die Inkubation der Granulosazellen mit 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml (= 1 µg/ml) konnten eine Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle induzieren. Lediglich die Inkubation mit Staurosporin als Positivkontrolle zeigte den gewünschten Effekt einer deutlichen Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, die zu gleichen Ergebnissen führten.

5. Immunhistochemie

Es wurden 22 Patientinnen retrospektiv in die Studie eingeschlossen. Ovarien von Patientinnen, bei denen eine Ovarendometriose diagnostiziert wurde ($n = 8$), wurden mit Kontrollen ($n = 14$) verglichen. Als Kontrolle dienten Normalovarien von Patientinnen, die adnexektomiert wurden.

5.1. Validierung des Färbesystems

Im Färbevorgang wurden sowohl Negativ- als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Dies diente der Evaluierung der Spezifität des Färbesystems. Zwei Negativkontrollen wurde in jedem Färbegang mitgeführt. Zum einen handelte es sich um Parafinschnitte von Ovargewebe, zum anderen handelte es sich um Parafinschnitte von Plazentagewebe des dritten Trimenons. Die Negativkontrolle am Ovargewebe, diente als Negativkontrolle für das Gewebe. Die Negativkontrolle am Plazentagewebe diente als Negativkontrolle für das Färbesystem. Als Positivkontrolle wurden Paraffinschnitte von Plazentagewebe des dritten Trimenons verwendet. Hier konnte der CRH-R1 bereits nachgewiesen werden (Hatzoglou, 1996; Karteris, 1998). Als Negativkontrolle wurden die Schnitte mit einer Kaninchen-IgG-Isotypen-Kontrolle inkubiert. Diese gewährleistet, dass die Spezies des Antikörpers keine unspezifische Anfärbung verursacht.

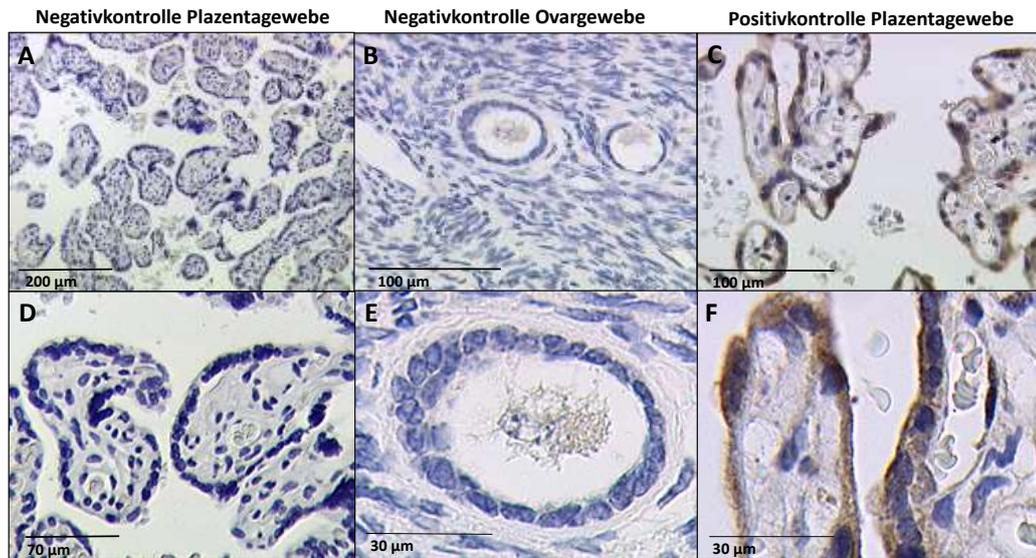


Abbildung 10: Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung des CRH-R1. Als Negativkontrolle dienten Plazentaschnitte, die mit einer Kaninchen-IgG-Isotypen-Kontrolle inkubiert wurden. Es ist kein rezeptorspezifisches Signal zu erkennen, 10-fache Vergrößerung (A), 30-fache Vergrößerung (D). Gleichzeitig wurden Schnitte von humanen Ovarien mitgeführt und mit einer Kaninchen-IgG-Isotypen-Kontrolle gefärbt. Es ist kein rezeptorspezifisches Signal zu erkennen, 25-fache Vergrößerung (B), 75-fache Vergrößerung (E). Als Positivkontrolle dienten humane Plazentaschnitte. Es ist eine rotbraune Anfärbung der Trophoblastzellen zu erkennen, 25-fache Vergrößerung (C), 75-fache Vergrößerung (F).

5.2. Hochregulation des CRH-R1 bei Ovarendometriose

In Normalovarien gelang der Nachweis des CRH-R1 in der Granulosazellschicht von Primordial-, Primär- und Tertiärfollikeln. Der einzige Sekundärfollikel im Studienkollektiv war CRH-R1 negativ. Bei der Untersuchung der verschiedenen Follikelstadien innerhalb der Kontrollovarien war der mittlere Anteil der CRH-R1 positiven Follikel im Tertiärfollikelstadium ($83 \pm 26\%$) signifikant höher als im Primär- ($17 \pm 24\%$, $p < 0,01$) oder Primordialfollikelstadium ($21 \pm 22\%$, $p < 0,01$) (Abbildung 11).

Auch im Ovarendometriosegewebe konnte der CRH-R1 in der Granulosazellschicht von Primordial-, Primär- und Tertiärfollikeln nachgewiesen werden. In den Primordialfollikeln waren 35 von insgesamt 42 Follikeln CRH-R1-positiv (83,33 %). Bei den Primärfollikeln waren 31 von 38 (81,58 %) Follikeln und bei den Tertiärfollikeln waren alle der 14 gezählten Follikeln CRH-R1-positiv. Bei der Untersuchung der verschiedenen Follikelstadien innerhalb der Ovarendometriose konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Interessanterweise war der CRH-R1 in Follikeln von Ovarendometriosepatientinnen im Vergleich zu den Kontrollovarien signifikant hochreguliert ($p < 0,001$) (Abbildung 11).

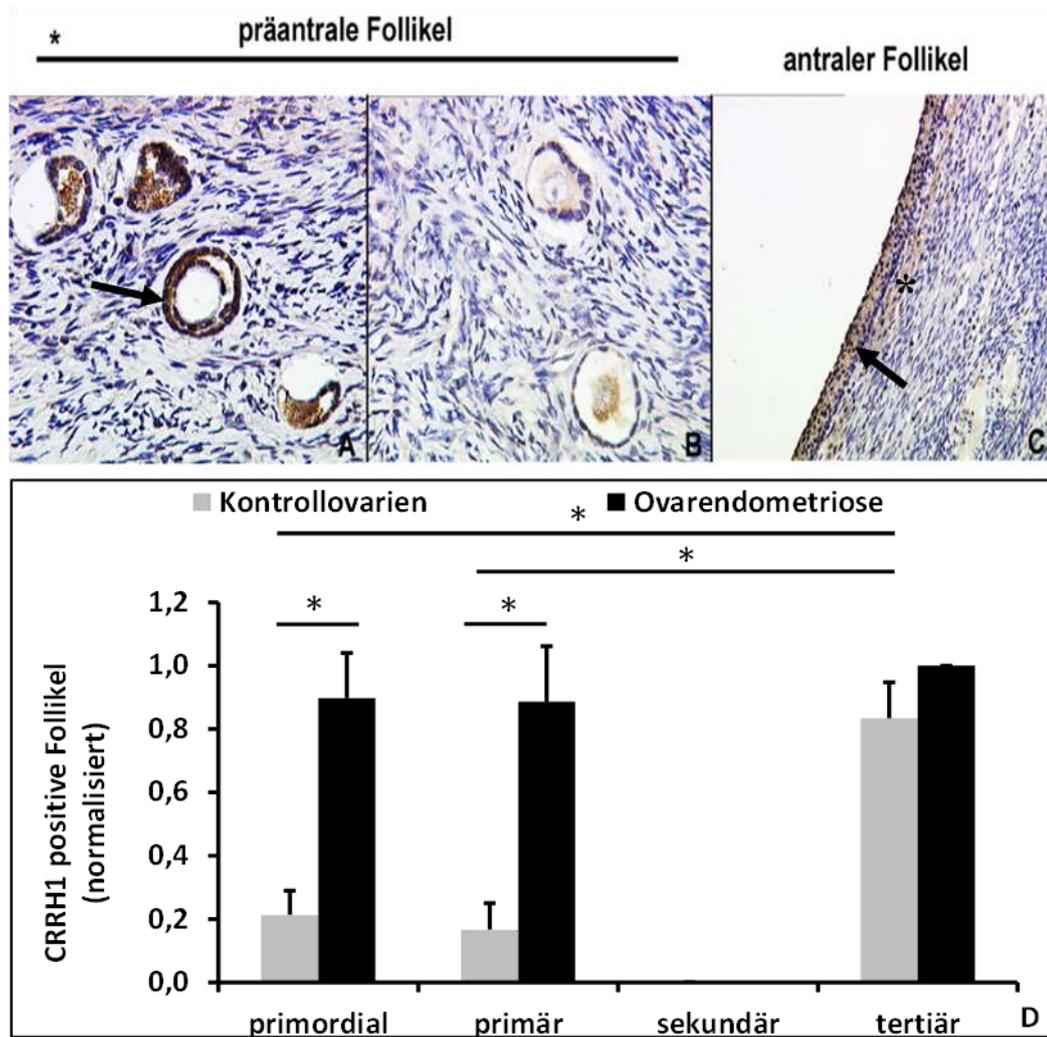


Abbildung 11: Differenzierte Expression des CRH-R1 in den verschiedenen Entwicklungsstufen eines Follikels. Abgebildet sind präantrale Follikel bei Endometriosepatientinnen, 25-fache Vergrößerung (A), präantrale Follikel von Kontrollovarien, 25-fache Vergrößerung (B) und ein antraler Follikel im Kontrollgewebe, 10-fache Vergrößerung (C). Die präantralen Follikel der Endometriosepatientinnen (A) wie auch die antralen Follikel im Kontrollgewebe (C) exprimieren den CRH-R1 in der Granulosazellschicht, erkennbar an der rotbraunen Färbung des Zytoplasmas (siehe Pfeile in (A) und (C)). Auch im Bereich der Thekazellschicht des antralen Follikels ist eine Expression des Rezeptors, zu erkennen * in (C). Die präantralen Follikel im Kontrollgewebe zeigen keine CRH-R1-Expression in der Granulosazellschicht. Die Rezeptorexpression war in den Follikeln von Ovarendometriosepatientinnen signifikant ($p < 0,001$) erhöht, der mittlere Anteil der CRH-R1-positiven Follikel im Tertärfollikelstadium war signifikant ($p < 0,001$) höher als im Primär- oder Primordialstadium (D).

V. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, ob das Stresshormon CRH Parameter der ovariellen Funktion im in vitro Modellsystem beeinflusst. Des Weiteren sollte ermittelt werden, inwiefern der zugehörige Rezeptor CRH-R1 durch das Stresshormon CRH beeinflusst wird, ob er im humanen Ovar nachzuweisen ist, wo er lokalisiert ist und ob Unterschiede bezüglich seiner Ausprägung im Vergleich von Normalovarien und Ovarien von Patientinnen, die an Ovarendometriose erkrankt sind, bestehen.

1. Nachweis, Lokalisation und Rolle des CRH-R1 in HGL5 Zellen und in humanen primären Granulosazellen

Bis dato herrscht keine Einigkeit darüber ob der CRH-R1 im humanen Granulosazellen nachzuweisen ist. In einer Studie konnte der CRH-R1 auf mRNA Ebene im humanen Ovar in den Thekazellen nachgewiesen werden. In humanen Granulosazellen gelang der Nachweis nicht (Asakura et al., 1997). Wenige Jahre später kamen andere Autoren, im Gegensatz zu der vorangegangenen Studie, zu dem Ergebnis, dass der CRH-R1 im Ovar in humanen Granulosazellen nachweisbar ist (Muramatsu et al., 2001). Hier gelang der Nachweis auf Proteinebene in Granulosazellen von dominanten Follikeln, jedoch nicht in Granulosazellen von primordialen, primären, präantralen, nicht-dominanten, atretischen Follikeln oder Oozyten.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis des CRH-R1 in der Zelllinie HGL5 sowie in humanen primären Granulosazellen auf Proteinebene wie auch auf mRNA Ebene. Immunzytochemisch zeigte sich in den Zellen der Zelllinie HGL5 wie auch in humanen primären Granulosazellen ein rezeptorspezifisches Signal im Bereich des Zytoplasmas. Auch immunfluoreszenzmikroskopisch konnte in den Zellen der Zelllinie HGL5 ein rezeptorspezifisches Signal im Bereich des Zytoplasmas nachgewiesen werden. Immunhistochemisch gelang der Nachweis des CRH-R1 in Granulosazellen von Follikeln humaner Ovarien. Des Weiteren gelang der Nachweis der Rezeptor-mRNA mit Hilfe der quantitativen TaqMan®-PCR in humanen primären Granulosazellen im Zellkultursystem.

Zum Nachweis des CRH-R1 in humanen Granulosazellen existieren uneinheitliche Ergebnisse. Dies könnte zum einen der verwendeten Methodik geschuldet sein, so arbeiteten Asakura et al. auf mRNA Ebene während Muramatsu et al. der Nachweis des Rezeptors mittels immunhistologischer Methoden auf Proteinebene gelang. Der Nachweis des Rezeptors wurde somit auf unterschiedlichen Ebenen versucht, was wiederum die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien erklären könnte. In der hier vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis des CRH-R1 auf mRNA Ebene wie auch auf Proteinebene in der humanen Granulosalutein Zelllinie HGL5 wie auch in humanen primären Granulosazellen. Im Gegensatz zu der Arbeit von Muramatsu et al., wo der Nachweis des CRH-R1 nur in dominanten Follikeln gelang, gelang der Nachweis des Rezeptors in der hier vorliegenden Arbeit in der Granulosazellschicht in allen Follikelstadien.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis des CRH-R1 auf mRNA Ebene wie auch auf Proteinebene, er konnte also auf mehreren Ebenen in der humanen Granulosalutein Zelllinie HGL5 und in humanen primären Granulosazellen nachgewiesen werden. Hierdurch, wie auch aufgrund der sorgfältigen Methodik und der stets mitgeführten Positiv- wie auch Negativkontrollen zur Kontrolle des Systems, ist von einem spezifischen Nachweis des Rezeptors in den verwendeten Modellsystemen auszugehen.

2. Stressbedingte Regulation des CRH Rezeptors 1 in humanen primären Granulosazellen

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass der CRH-R1 im zentralen Nervensystem wie auch in der Peripherie Expressionsveränderungen unterliegt. So konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass es nach einem chronischen Stressgeschehen zu einer signifikanten Erhöhung der CRH-R1 mRNA und der Proteinexpression im Hypothalamus kommt (Wan et al., 2014). Auch im Mausmodell konnte eine schnell einsetzende, ausgeprägte und langanhaltende Erhöhung der CRH-R1 mRNA im Cortex und Hippocampus der Maus nach Stresseinwirkung gezeigt werden (Greetfeld et al., 2009). In einer anderen Studie hingegen wurde gezeigt, dass bei neonaten Schweinen, die einem Stressor ausgesetzt wurden (Abwesenheit des Muttertiers), es zwar zu einer

signifikanten Erhöhung von CRH, jedoch zu einer signifikanten Verringerung der CRH-R1 mRNA Expression in der Hypophyse kam (Schwerin et al., 2005). Auch im reproduktiven System konnten im Tiermodell bereits erste Erkenntnisse zur Regulation des CRH-R1 gewonnen werden. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Stress in Form von Bewegungseinschränkung das CRH Level im Serum, Ovar und in Oozyten erhöht und mit einer erhöhten Expression des CRH-R1 in Cumulus-, Theka- und Granulosazellen einhergeht (Liang et al., 2013).

In der bisherigen Literatur finden sich somit unterschiedliche Angaben zur CRH vermittelten Regulation des CRH-R1 im Bereich des Nervensystems. Dies könnte einerseits auf methodische Unterschiede zurückzuführen sein. Zum anderen könnten speziesspezifische Unterschiede die teils widersprüchlichen Ergebnisse erklären. Die Ergebnisse der Studie von Liang et al. geben, wenn auch im Tiermodell, erste Hinweise auf eine mögliche CRH bedingte Regulation des CRH-R1 im Ovar und lassen sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit in Einklang bringen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt nun in humanen primären Granulosazellen erstmals gezeigt werden. Wurden diese Zellen im Zellkultursystem einer Stresssituation ausgesetzt (Inkubation mit CRH) kam es anschließend zu einer signifikanten Hochregulation der Protein- wie auch Genexpression des CRH-R1. Gleichzeitig führte eine Inkubation mit einer Kombination aus CRH und dem CRH-R1 Antagonisten Antalarmin zu einer Verringerung der CRH bedingten Hochregulation der CRH-R1 Proteinexpression.

Es lässt sich somit postulieren, dass es sich bei der CRH vermittelten Hochregulation des CRH-R1 um einen Effekt handelt, der direkt am Rezeptor selbst wirkt, da dieser Effekt durch den CRH-R1 Antagonisten Antalarmin aufgehoben bzw. vermieden werden kann. Des Weiteren ist zu postulieren, dass es sich bei der CRH vermittelten CRH-R1 Hochregulation um eine induzierte Verstärkung des CRH Signals, im Sinne eines positiven Feedback-Geschehens, handelt.

Studien im Rattenmodell konnten zeigen, dass eine Stressexposition oder die direkte CRH Gabe regulierende Effekte, im Sinne einer Expressionserhöhung des Rezeptors, auf die CRH-R1 mRNA-Expression im zentralen Nervensystem hat (Luo et al., 1994; Mansi et al., 1996). Des Weiteren konnte die Arbeit von Jezova

et al. zeigen, dass es im Bereich des Nervensystems nach intrazerebroventrikulärer Applikation eines unselektiven CRH-Rezeptorantagonisten zu einer Schwächung des CRH mRNA Anstiegs nach Stressexposition im Vergleich zu einer Placeboinjektion kommt. Dies kann als Beweis für einen CRH-R1 vermittelten CRH Expressionsanstieg nach Stressexposition im ZNS gewertet werden (Jezova et al., 1999). Diese Studie bekräftigt die Annahme, dass CRH mittels positiver Feedback-Schleife über seinen Rezeptor CRH-R1 seine eigene Expression stimulieren könnte. Aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit lassen sich ansatzweise identische Schlüsse für das reproduktive System, im speziellen für das Ovar, ziehen. Auch hier kam es nach Stressexposition der humanen primären Granulosazellen, imitiert durch die CRH Gabe, zu einer Erhöhung der CRH-R1 Gen- und Proteinexpression. Die hier gezeigte, durch CRH vermittelte, Erhöhung der CRH-R1 Proteinexpression konnte mit Hilfe des selektiven CRH-R1 Antagonisten Antalarmin signifikant erniedrigt werden, sodass auch hier gezeigt werden konnte, dass es sich hierbei, zumindest teilweise, um einen CRH-R1 spezifischen Effekt handelt. Jedoch bleibt weiterführend zu untersuchen, wie die Blockierung des CRH-R1 durch einen spezifischen Antagonisten sich auf die Expression seines Liganden CRH auswirkt.

3. Stressbedingte funktionelle Beeinträchtigung des humanen Ovars

In der Vergangenheit konnte der negative Effekt von CRH auf die Steroidhormonsynthese bereits beschrieben werden. So konnte gezeigt werden, dass kultivierte primäre humane Granulosazellen auf CRH Zugabe in das Zellkulturmedium mit einer reduzierten Östrogen- und Progesteronsynthese reagieren, was sich wiederum durch den verwendeten α -helikalen CRHR Antagonisten aufheben ließ. Die alleinige Zugabe des Antagonisten führte zu keiner Veränderung der Östrogen- und Progesteronbasalwerte im Zellkulturüberstand. (Ghizzoni et al., 1997; Murase et al., 2002). Auch im Rattenmodell wurde dieser Effekt für Östrogen untersucht und bestätigt (Calogero et al., 1996).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit gehen mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studien konform. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation humaner primärer Granulosazellen mit CRH zu einer Erniedrigung der Steroidhormonkonzentration von Östrogen und Progesteron im Zellkulturüberstand führte. Die Inkubation mit dem CRH-R1 Antagonisten Antalarmin allein hatte keinen Effekt. In Kombination mit CRH führte Antalarmin jedoch zu einer Aufhebung des CRH vermittelten Effekts. Die Ergebnisse waren in Teilen nur im Bezug zu den mit Antalarmin stimulierten Zellen, jedoch nicht im Bezug zu den unstimulierten Zellen signifikant. Dass es sich bei den CRH vermittelten Effekten wirklich um eine funktionelle Beeinflussung des Ovars durch CRH und nicht etwa um apoptotische Effekte handelt, konnte in der hier vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Caspase-3/-7 Aktivitätsmessung bewiesen werden. Die Inkubation der Granulosazellen mit verschiedenen CRH Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml) führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Caspase-3/-7 Aktivität.

Auch wenn die alleinige Stimulation der Zellen mit dem CRH-R1 Antagonisten Antalarmin keine signifikanten Effekte auf die Steroidhormonkonzentration erzielte, so konnte die CRH bedingte Verringerung der Steroidhormonkonzentration im Zellkulturüberstand zum Teil nur im Vergleich zu den Antalarmin stimulierten Zellen signifikant dargestellt werden, jedoch aber nicht zu den unstimulierten Zellen. Dies könnte verschiedene Gründe haben.

Zum einen könnte es daran liegen, dass die hier verwendeten Follikelpunktionen, aus denen die Granulosazellen gewonnen wurden, von verschiedenen Patientinnen mit unterschiedlicher Erkrankungs- und Behandlungsgenese stammen. Diese Patientinnen sind im Rahmen ihrer IVF-Behandlungen teilweise mit unterschiedlichen Protokollen und Substanzen behandelt worden. Zum anderen könnte dies der Anzahl der durchgeführten Experimente geschuldet sein. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass es sich bei der Reduzierung der Steroidhormonkonzentration im Zellkulturüberstand durch CRH, einhergehend mit der Aufhebung des Effekts durch den CRH-R1 Antagonisten Antalarmin, um einen CRH-R1 regulierten Effekt handelt.

Das Vorhandensein des CRH-R1 in humanen Granulosazellen konnte in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass exogen systemisch zugeführtes CRH keinen

reduzierenden Effekt auf die Plasmakonzentration von Östrogen hat (Murase et al., 2002), ist zu vermuten, dass CRH im Ovar unabhängig von der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bzw. –Gonaden-Achse ist und seine Effekte auf autokrinem oder parakrinem Wege vermittelt. Hierbei scheint bezüglich der Signalkaskade cAMP eine Rolle zu spielen. Murase et al. konnten ebenfalls zeigen, dass der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin zu erhöhten Östrogen- wie auch Progesteronkonzentrationen im Zellkulturüberstand führte. Dieser Forskolin vermittelte Effekt konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit CRH partiell wieder aufgehoben werden. Dies spricht dafür, dass CRH seine Effekte auf die Steroidhormonbiosynthese zumindest in Teilen via cAMP und Adenylatzyklase vermittelt. Die Involvierung von cAMP an dieser Stelle konnte bereits 1989 im Rattenmodell in Leydigzellen demonstriert werden (Ulisse et al., 1989).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stress zu einer Beeinträchtigung des Ovars, nämlich der Steroidhormonbiosynthese, führt. Eine Erhöhung der zirkulierenden Stresshormone kann beispielsweise zu einer Verschiebung des Ovulationszeitpunktes sowie zu einer Verkürzung der Lutealphase führen. Eine damit einhergehende reduzierte Progesteronverfügbarkeit in der Lutealphase verschlechtert somit die Chancen auf eine erfolgreiche Implantation. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Stress und damit einhergehende erhöhte Glucocorticoidspiegel Uterus und Fetus beeinträchtigen und die LH Sekretion wie auch die Östrogen- und Progesteronproduktion inhibieren (Magiakou et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dies auch das Outcome IVF-assistierter Schwangerschaften negativ beeinflusst (Klonoff-Cohen et al., 2001; Cooper et al., 2007). Dies wiederum spielt für die meist schon gestressten Kinderwunschpatientinnen eine enorme Rolle und kann sich zu einem negativen, sich selbsterhaltenden Kreislauf in dieser Patientengruppe entwickeln.

Da in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die durch Stress bzw. CRH vermittelten Effekte durch den CRH-R1 spezifischen Antagonisten Antalarmin teilweise reduzierbar waren, ist von einem CRH-R1 vermittelten Effekt des CRH auszugehen. Ob dies in der Patientengruppe der Kinderwunschpatientinnen ein möglicher Ansatz zur Behandlung einer stressassoziierten Steroidhormoninsuffizienz, welche mit einer reduzierten

Chancen auf eine erfolgreiche Implantation eiihergeht, sein könnte, bedarf weiterer klinischer Studien, um zweifelsfrei von einer Therapieoption sprechen zu können.

4. Die stressassoziierte Erkrankung Endometriose geht mit einer Hochregulation des CRH-R1 einher

Der Nachweis des CRH-R1 im humanen Ovar gelang bereits in vorangegangenen Studien. So konnten Muramatsu et al. den CRH-R1 in Granulosazellen, Interstitium, dem ovariellen Stroma und in Thekazellen von dominanten Follikeln immunhistochemisch nachweisen (Muramatsu et al., 2001). In der Studie von Vergetaki et al. konnte erstmals ein differenziertes Expressionsprofil des CRH-R1 im Vergleich von gesunden und an Endometriose erkrankten Frauen im eutopen und ektopen Endometrium ermittelt werden. Es konnten Regulationsunterschiede des CRH-R1 im Vergleich von eutopem und ektopem Endometrium innerhalb erkrankter Patientinnen gezeigt werden. Im eutopen Endometrium konnte gezeigt werden, dass die Expression von CRH-R1 bei Frauen mit Endometriose signifikant erhöht ist im Vergleich zu gesunden Frauen und im Vergleich von eutopem und ektopem Endometrium derselben Frau konnte gezeigt werden, dass die Expression von CRH und seinen Rezeptoren im ektopen Endometrium signifikant erhöht war im Vergleich zu dem eutopen Endometrium derselben Frau (Vergetaki et al., 2013). So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der CRH-R1 bei Endometriosepatientinnen hochreguliert ist.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte der CRH-R1 im humanen Ovar nachgewiesen werden. Es gelang der Nachweis des Rezeptors in Granulosazellen von Primordial-, Primär- und Tertiärfollikeln wie auch in der Thekazellschicht von Tertiärfollikeln von Kontrollovarien und erstmals überhaupt in Ovarien von an Ovarendometriose erkrankten Patientinnen. Im Kontrollgewebe war die CRH-R1 Proteinexpression in den späten Follikelstadien signifikant höher als in den frühen Stadien. Des Weiteren war die CRH-R1 Proteinexpression in Follikeln von Ovarendometriose-Gewebe signifikant höher im Vergleich zu den Normalovarien.

Es kann zum einen vermutet werden, dass der CRH-R1 eine Rolle bezüglich der Spätentwicklung humaner Follikel spielt. Vorstellbar wäre, dass der CRH-R1 eine

Art Markierung der Follikel sein könnte welche, sich dann in der weiteren Genese zu sprungreifen Follikeln entwickeln, während andere nicht-CRH-R1-markierte Follikel dieses Stadium nicht erreichen. Dies bekräftigt bereits erstellte Thesen, in denen vermutet wird, dass CRH und seine Rezeptoren eine Rolle bezüglich aseptischer Inflammationen in den spätfollikulären Phasen, wie beispielsweise der Luteolyse, spielen. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass genau so wie der CRH-R1 in den spätfollikulären Phasen hochreguliert ist, die Interleukine Interleukin-6 und Interleukin-8 in den späten und periovulatorischen follikulären Phasen signifikant erhöht in der Follikularflüssigkeit vorhanden sind (Baskind et al., 2014). Somit liegt die Hypothese nahe, dass die Hochregulation des CRH-R1 in den späten Phasen der Follikulogenese im Zusammenhang mit einem entzündlichen Geschehen steht. Bekräftigt werden können die beobachteten Zusammenhänge von CRH, seinem Rezeptor CRH-R1 und einem entzündlichen Geschehen ebenfalls durch die Studie von Agelaki et al.. Die Autoren konnten feststellen, dass CRH zwar im Rahmen der Stresskaskade durch die Aktivierung von Cortisol einen indirekten antiinflammatorischen Effekt besitzt, dass es jedoch mittels direkter Wirkung auf Immunzellen wie Makrophagen einen proinflammatorischen Effekt erzielen kann. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass im Zellsystem CRH die Produktion von TNF- α , Interleukin 1 β und Interleukin-6 deutlich erhöht. *In vivo* konnte in derselben Studie der proinflammatorische Zusammenhang von CRH und Interleukinen bekräftigt werden. Eine Blockade des CRH-R1 mittels selektivem Antagonisten Antalarmin unterdrückte einen Anstieg der aus Makrophagen stammenden Zytokinen TNF- α , Interleukin 1 β und Interleukin-6. Durch diese Ergebnisse sehen sich die Autoren in ihrer Annahme bestätigt, dass CRH und sein Rezeptor CRH-R1 eine Rolle in entzündlichen Prozessen spielen (Agelaki et al., 2002).

Zur Hochregulation des CRH-R1 in Follikeln bei Ovarendometriose lässt sich Folgendes vermuten. Es handelt sich bei der Endometriose um eine stressassoziierte Erkrankung, welche mit entzündlichen Reaktionen wie auch chronischem Unterbauchschmerz einhergeht. Die vorhandene Stresssituation führt durch die Aktivierung der Stresskaskade und damit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zu einer vermehrten hypothalamischen CRH Ausschüttung, was wiederum zu einer verminderten GnRH Ausschüttung führt und somit das reproduktive System nachhaltig beeinflusst. Dies lässt vermuten,

dass CRH und sein Rezeptor CRH-R1 eine Rolle bezüglich dieser Krankheitsgenese spielen.

Wie Vergetaki et al. bereits vermuteten ist, auch aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse, davon auszugehen, dass den Zusammenhängen möglicherweise ein entzündliches Geschehen zu Grunde liegt. Vergetaki et al. brachten dies in folgenden Zusammenhang. Der CRH-R1 ist in späteren Phasen des Menstruationszyklus, wie der Lutealphase, in endometrialen Zellen während der Dezidualisation hochreguliert. Dies führt, bedingt durch die Stimulation von Progesteron, über einen cAMP abhängigen Weg zur Induktion der Dezidualisation. Da CRH die Produktion von PGE2 hemmt und die Produktion von Interleukin-1 und Interleukin-6 in den endometrialen Stromazellen stimuliert, einhergehend mit dem Wissen, dass es bei Endometriose zu einer Akkumulation von Zytokinen und Interleukinen kommt, postulieren die Autoren hier die Wichtigkeit von CRH und seinem Rezeptor CRH-R1 für das lokale chronische Entzündungs- und Stressgeschehen. Auch gehen die Autoren von einer möglichen CRH bedingten Modulation der Dezidualisation aus, was der Grund für eine nicht adäquate Funktionalität des Endometriums und damit einhergehend mit einer erhöhten Unfruchtbarkeit bei Patientinnen, die an Endometriose erkrankt sind, sein könnte (Vergetaki et al., 2013). Bestärkt wird diese These durch weitere Studien, die Hinweise für einen möglichen zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismus liefern. Die späte Sekretionsphase des Zyklus der Frau ist u.a. durch ein erhöhtes Vorkommen von Entzündungszellen wie Makrophagen charakterisiert (Kodama et al., 1998). Sie sind der hauptsächliche Ursprungsort von Zytokinen wie TNF- α , Interleukin-1 β und Interleukin-6. Von diesen Zytokinen, weiß man, dass sie physiologisch prämenstruell in erhöhter Konzentration vorliegen und eine Rolle bezüglich der Induktion der menstruellen Blutung spielen (Srivastava et al., 1996). Kommt es im Rahmen eines entzündlichen Geschehens nun zur Chemotaxis weiterer Entzündungszellen wie Makrophagen, führt dies gleichzeitig zu einer erhöhten Konzentration von Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise CSF-1, TNF- α Interleukin-1 β und Interleukin-6. Bei TNF- α handelt es sich um einen Apoptose-induzierenden Faktor, der durch Zerstörung von Endothelzellen in der späten Sekretionsphase zur ödematösen Veränderung und Destruktion des endometrialen Gewebes mit konsekutiver Menstruationsblutung führt (Tabibzadeh et al., 1996, von Wolff et

al., 1999). Nicht nur TNF- α , sondern ebenfalls Interleukin-1 β ist während der späten Sekretionsphase physiologisch erhöht (von Wolff et al., 2000). Sie induzieren im endometrialem Stroma die Interleukin-6 Expression. Aufgrund der TNF- α assoziierten Expression von Interleukin-1 β und Interleukin-6 ist anzunehmen, dass auch deren erhöhte Expression in dieser Phase zur Induktion der Menstruationsblutung beitragen könnte. Dieser Mechanismus könnte im Rahmen eines entzündlichen Geschehens weiter ausgeprägt sein und somit auch zu einem Implantationsversagen beitragen. Ebenfalls ist bereits bekannt, dass Frauen mit ungeklärter Infertilität (Tseng et al., 1996) oder Endometriose (Rier et al., 1995; Tseng et al., 1996) insgesamt eine deutlich erhöhte Konzentration von Interleukin-6 im weiblichen Reproduktionssystem aufweisen. Dies bekräftigt ebenfalls die Annahme, dass Interleukine bezüglich des Krankheitsgeschehens der Endometriose, wie auch bezüglich eines unerfüllten Kinderwunsches, eine tragende Rolle spielen. Auch für den Entzündungsmediator CSF-1 ((Makrophagen-) Kolonie stimulierender Faktor) konnte ein Zusammenhang mit einem möglichen Implantationsversagen bereits nachgewiesen werden. Die Installation von CSF-1 im Mausmodell führte bereits in niedriger Konzentration zu Aborten in der Frühschwangerschaft (Tartakovsky et al., 1991).

Eine allumfassende Hypothese zu den möglichen Zusammenhängen zwischen Stress, und damit CRH, und der Erkrankung Endometriose liefern Tariverdian et al.. Hier wird davon ausgegangen, dass psychischer Stress die Verschlimmerung von entzündlichen Prozessen, Angiogenese, Schmerz und Infertilität mittels Kaskaden, in denen Katecholamine, CRH und weitere Substanzen eine Rolle spielen, vorantreibt. Periphere immunologische Reaktionen führen ihrerseits zur Anregung bestimmter Hirnregionen, wodurch es zu einer Anregung der sogenannten „sickness response“ kommt. Diese beinhaltet neuro-hormonelle, wie auch das Verhalten betreffende Veränderungen (Watkins und Maier, 2000). Einhergehend mit diesen Verhaltensänderungen, dem sogenannten “sickness behaviour”, konnten erhöhte zentrale CRH-Spiegel bereits demonstriert werden (Schobitz et al. 1994). Somit könnten ebenfalls entzündliche Stressreaktionen durch eine Erhöhung des zentralen CRHs zu Verhaltensänderungen führen. Da Endometriose bewiesenermaßen mit erhöhten proinflammatorischen Cytokinen einhergeht (Braun et al., 1996), könnte diese Art von entzündlichem Stress zu

einem Einsetzen der „sickness response“ führen, einhergehend mit erhöhtem zentralen CRH-Spiegel sowie Verhaltensveränderungen, was wiederum den Stress ausgehend von Symptomen wie Schmerz oder Infertilität weiter verschlimmern würde. Die Verbindung zwischen peripher entstandenem entzündlichem Stress und der zentralen Reaktion darauf erklären die Autoren durch peripher vorkommende Zytokine im Blut, die die Blut-Hirn-Schranke passieren können, vor allem wenn diese aufgrund einer Stresssituation für selbige eine erhöhte Permeabilität aufweist (Banks, 2005; Esposito et al. 2001). Da Nervenfasern in endometrialem Gewebe nachgewiesen werden konnten, könnten hier vagale Afferenzen bezüglich der auftretenden Verhaltensänderungen eine Rolle spielen. Somit könnten anhaltende Stressoren das Voranschreiten und die Ausbreitung von Endometriose begünstigen, begleitet von einem neuroendokrin-immunem Ungleichgewicht. Dies wiederum fördert zusätzliche Stressoren wie Schmerz und Infertilität und induziert somit die sogenannte „sickness-response“. Daraus wiederum resultiert eine noch höhere Stressbelastung, wodurch sich ein „Teufelskreis“ bei an Endometriose erkrankten Patientinnen selbst aufrecht erhält (Tariverdian et al. 2007). Es ist auch aufgrund der in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zu vermuten, dass die Überexpression von CRH-R1 bei Ovarendometriose mit der bei Endometriose erhöhten Stressrezeptivität und dem hiermit verbundenen hormonellen Ungleichgewicht assoziiert ist.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass ein bislang nicht entdeckter Defekt der einzelnen Follikel mit einer Hochregulation des CRH-R1 in an Ovarendometriose erkrankten Patientinnen einhergehen könnte. Die CRH induzierte Hochregulation des Rezeptors könnte hier etwa als kompensatorische Folge zum Erhalt einer durch CRH massiv beeinträchtigten Follikelfunktion und damit –genese gesehen werden. Der Erfolg dieses Kompensationsmechanismus scheint jedoch von vielen ungeklärten Faktoren abhängig zu sein und ist somit nicht in allen Fällen erfolgsbringend. Dies könnte der Grund sein, dass nicht alle Patientinnen, die an Ovarendometriose erkrankt sind, gleichermaßen von dem Problem der Infertilität betroffen sind. Die sich gegenseitig beeinflussenden Parameter wie CRH und sein Rezeptor CRH-R1 scheinen in Normalovarien wie auch bei Ovarendometriose im Rahmen entzündlicher Prozesse eine Rolle zu spielen und über autokrine oder parakrine Mechanismen ihre Wirkung zu erreichen. Sie scheinen ebenfalls bei der Entstehung oder dem Verlauf von

stressassoziierten Erkrankungen wie der Ovarienmetriose eine grundlegende Rolle zu spielen. Inwieweit sie diese tatsächlich in ihrem Ausmaß und Verlauf beeinflussen, bedarf weitergehender Studien zu diesem Thema. Ob es auch im Fall der Ovarienmetriose möglich ist, CRH bedingte Effekte durch die Blockade des CRH-R1 durch seinen Antagonisten Antalarmin positiv zu beeinflussen, bleibt zu untersuchen. Jedoch könnte sich hier eine mögliche Behandlungsoption der Ovarienmetriose entwickeln. Dies könnte das Problem der Infertilität positiv beeinflussen, einen vorhandenen Kinderwunsch ermöglichen und damit einhergehend zu einer subjektiven Verbesserung der Lebensqualität betroffener Patientinnen und ihrer Lebenspartner beitragen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl die derzeitig etablierten IVF-Protokolle die Zahl der Paare mit unerfülltem Kinderwunsch in den letzten Jahrzehnten massiv reduzieren konnten, gibt es dennoch Parameter, die anhaltend dazu führen, diesen Wunsch nicht jedem dieser Paare erfüllen zu können. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der in unserer leistungsorientierten Gesellschaft immer größer werdende Stress die reproduktive Fähigkeit eines Organismus massiv und nachhaltig negativ beeinflusst. Dies führt zu einer stressbedingten hormonellen Dysregulation, was das Versagen gängiger IVF-Protokolle zur Folge hat. Dies bedeutet für die betroffenen Kinderwunschpatientinnen eine enorme psychosoziale wie auch finanzielle Belastung und stellt die heutige Medizin vor eine enorme Herausforderung. Da die Gruppe der Sterilitätspatientinnen zu einem sehr hohen Prozentsatz von der Erkrankung Endometriose betroffen ist und es sich hierbei um eine stressassoziierte Erkrankung handelt, war diese Erkrankung in der hier vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse. CRH als eines der Effektorhormone der Stresskaskade, welches auch schon in peripheren Geweben wie dem Ovar nachgewiesen werden konnte, könnte hier eine Rolle spielen.

Ziel dieser Arbeit war somit, den Einfluss von CRH auf die Gen- und Proteinexpression seines Rezeptors CRH-R1 sowie auf die Steroidhormonbiosynthese in humanen Granulosazellen zu ermitteln. Außerdem sollte die Lokalisation des CRH-R1 im humanen Ovar analysiert werden, um weitergehend zu ermitteln, ob Unterschiede des CRH-R1 Immunprofils zwischen Normalovarien und Ovarien von Endometriosepatientinnen bestehen.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis des CRH-R1 im Zytoplasma der Zelllinie HGL5 wie auch im Zytoplasma von humanen primären Granulosazellen. Ebenfalls gelang der Nachweis des Rezeptors in Granulosazellen unterschiedlicher Follikelstadien, wobei im Normalovar die Proteinexpression des CRH-R1 in den späten Follikelstadien signifikant ($p < 0,01$) erhöht war im Vergleich zu den frühen Follikelstadien. Bei Patientinnen, die an Ovarendometriose erkrankt waren, war die Proteinexpression des Rezeptors in den Granulosazellen signifikant ($p < 0,001$) erhöht im Vergleich zum Kontrollgewebe (Normalovarien). Auch konnte gezeigt werden, dass der CRH-R1

einer stressbedingten Regulation unterliegt. Dies ist mit den Ergebnissen des Vergleichs von Normalovarien und an Ovarendometriose erkrankten Patientinnen in Einklang zu bringen. Eine Inkubation der Zellen mit CRH führte zu einer signifikanten Hochregulation der Protein- ($p = 0,004$) und Genexpression ($p = 0,031$) des Rezeptors. Mit Hilfe des CRH-R1 Antagonisten Antalarmin konnte dieser Effekt auf der Ebene der Proteinexpression aufgehoben werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Stress einhergehend mit erhöhten CRH-Spiegeln wie auch einer Hochregulation seines Rezeptors CRH-R1 zu einer negativen Beeinflussung der funktionellen Aufgaben des Ovars, nämlich der Steroidhormonbiosynthese, führt. So kam es nach Inkubation der humanen primären Granulosazellen mit CRH im Zellkulturmodell zu einer signifikanten Verringerung des Östrogen- wie auch Progesterongehaltes. Auch hier gelang es durch die Inkubation der Zellen mit dem CRH-R1 Antagonisten Antalarmin den CRH vermittelten Effekt weitgehend aufzuheben.

In dieser Arbeit konnte in großem Umfang zur Klärung der Auswirkungen von CRH vermitteltem Stress auf das zelluläre Geschehen und die ovarielle Funktion beigetragen werden, um zukünftig sowohl diagnostische als auch therapeutische Konzepte im Bereich der Endokrinologie und Reproduktionsmedizin zu verbessern und neu entwickeln zu können. Der CRH-R1 Antagonist Antalarmin spielt in der Aufhebung der Stress- bzw. CRH-vermittelten Effekte eine beachtliche Rolle. Inwiefern dieser als Therapeutikum Einsatz in diesem Bereich finden könnte, bedarf weiterführender Studien.

VII. SUMMARY

Though techniques of assisted reproduction were able to reduce the number of couples dealing with an unfulfilled wish for child during the last decades, there are still parameters which lead to the situation that a wish for child cannot be fulfilled to every couple. Stress induced endocrine dysregulation of the female organism is associated with the failure of current IVF-proceedings. One of the endogenous stress hormones is Corticotropine Releasing Hormone (CRH). CRH is a hormone which plays an important role in the context of physiological cascade of stress and enables an appropriate reaction to stress. Synthesized in the hypothalamus it mediates its effects via G protein-coupled receptor CRH-R1. The increased hypothalamic release of CRH during stress-situations leads to an inhibition of hypothalamic pulsatile GnRH-release. This leads to an impairment of pituitary Gonadotropin secretion and to a consecutive disorder of ovarian function. The aim of this project was to conduce to a better understanding to what extent stress influences clinical parameters and, through this, reproduction. Particularly it should be determined if CRH influences steroidhormone biosynthesis and, through this, parameters of ovarian function. Also it should be determined if CRH-R1 regulation is influenced by CRH, if CRH-R1 expression changes throughout follicle maturation or in case of ovarian endometriosis, a stress-related chronic inflammation.

In this project CRH-R1 was detected in granulosa cells. Incubation of human primary granulosa cells with CRH led to a decrease of estrogen and progesterone concentrations in cell culture supernatant. To a great extend the CRH mediated effects were blocked by the selective CRH-R1 antagonist Antalarmin. It also could be shown, that CRH-R1 underlies a stress related regulation. Incubation of the cells with CRH led to a significant up-regulation of protein- ($p = 0,004$) and gene expression ($p = 0,031$) of CRH-R1. Again, Antalarmin was able to block the CRH mediated effects. CRH-R1 could also be detected in situ in the granulosa cell layer of different stadiums of the follicle, whereby protein expression of CRH-R1 in the late follicular phases was significantly ($p < 0,01$) up-regulated compared to early follicular phases in normal human ovaries. In patients suffering from ovarian endometriosis, protein expression of CRH-R1 in the granulosa cell layer was significantly ($p < 0,001$) up-regulated compared to normal ovaries.

In this project it could be contributed to the clarification of the effects of the stresshormone CRH on the function of human primary granulosa cells. Since CRH-R1 Antagonist Antalarmin was able to antagonize CRH-related effects, these observations might indicate a potential strategy of intervention.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott J, Hawe J, Hunter D, Halmes M, Finn P, Garry R. Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2004;82:878-84.

Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):6068-74.

Aird,F., Clevenger,C.V., Prystowsky,M.B., and Redei,E. (1993). Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7104-7108.

Albrecht H. Die Endometriose. in: Seitz L, Amreich AI (Hrsg): *Biologie und Pathologie des Weibes*, Bd. IV. Urban & Schwarzenberg, Berlin-Innsbruck-München-Wien (1955), S. 190-288

Asakura H, Zwain IH., Yen SS., 1997. Expression of genes encoding corticotropin-releasing factor (CRF), type 1 CRF receptor, and CRF binding protein and localization of the gene products in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2720–2725.

Bale,T.L., and Vale,W.W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 44, 525-557.

Banks WA (2005) Blood–brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des* 11:973– 984

Baskind NE, Orsi NM, Sharma V. Follicular-phase ovarian follicular fluid and plasma cytokine profiling of natural cycle in vitro fertilization patients. *Fertil Steril*. 2014 Aug;102(2):410-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.032. Epub 2014 May 27.

Baumann und Gätje, Endometriose. Kapitel 17, S. 287 in M. Kaufmann et al. (Hrsg.), Die Gynäkologie, DOI 10.1007/978-3-642-20923-9_17, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.

Behrends et al., 2012. Duale Reihe Physiologie

Bektaş H, Bilsel Y, Sari YS, Ersöz F, Koç O, Deniz M, Boran B, Huq GE. Abdominal wall endometrioma; a 10-year experience and brief review of the literature. *J Surg Res* 2010;164:e77-81.

Belmokhtar CA, Hillion J and, SeÂgal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene* (2001) 20, 3354 ± 3362

Blois SM, Joachim R, Kandil J, Margni R, Tometten M, Klapp BF, et al. Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. *J Immunol* 2004;172:5893–9.

Boivin J, Bunting L, Collins JA et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506–1512.

Braun DP, Gebel H, House R, Rana N, Dmowski NP (1996) Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 65:1125–1129

Breckwoldt, M und G Martius, Gynäkologie und Geburtshilfe : 117 Tabellen. 5., aktualisierte und überarb. Aufl. ed. 2008, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XVII, 543 S.

Bruhn TO, Engeland WC, Anthony EL, Gann DS, and Jackson IM. (1987). Corticotropin-releasing factor in the adrenal medulla. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 512, 115-128.

Busacca M, Fedele L, Bianchi S, Candiani M, Agnoli B, Raffaelli R, Vignali M. Surgical treatment of recurrent endometriosis: laparotomy versus laparoscopy. *Hum Reprod* 1998;13:2271-4.

Busacca M, Somigliana E, Bianchi S, DeMarinis S, Calia C, Candiani M, Vignali M. Post-operative GnRH analogue treatment after conservative surgery for symptomatic endometriosis stage III-IV: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001;16:2399-402.

Calogero, A.E., Burrello, N., Negri-Cesi, P., Papale, L., Palumbo, M.A., Cianci, A., et al., 1996. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production in vitro. *Endocrinology* 137, 4161–4166.

Chachamovich J, Chachamovich E et al. Congruence of quality of life among infertile men and women: findings from a couple-based study. *Hum Reprod* 2009; 24: 2151–2157.

Chalmers,D.T., Lovenberg,T.W., and De Souza,E.B. (1995). Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 6340-6350.

Salomon LJ, Rozenberg P, Szekeres-Bartho J, Malagrida L, Giudicelli Y and Ville YP. 2005. Changes in progesterone-induced-blocking-factor expression rates following mifepristone administration in termination of pregnancy at 5 to 8 weeks. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*,17:5,353-356.

Cheesman KL, Cheesman SD, Chatterton RT jr, Cohen MR (1983) Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fert. Steril.* 40: 590–595

Cooper BC, Gerber JR, McGettrick AL, Johnson JV. Perceived infertility-related stress correlates with in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2007;88:714–7.

Cortright, D. N., A. Nicoletti & A. F. Seasholtz: Molecular and biochemical characterization of the mouse brain corticotropin-releasing hormone-binding protein. *Mol Cell Endocrinol*, 111, 147-57 (1995)

Cousineau TM, Domar AD. Psychological impact of infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 293–308.

Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Dias EC, Vettori S. Souza CA, Passos EP (2000) Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin releasing hormone infusion and dopamenergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Human Reprod* 17: 960–965

D’Hooghe TM, DeBrock S, Hill JA, Meuleman C (2003) Endometriosis and subfertility: Is the relationship resolved? *Sem. Reprod. Med.* 21: 243–254

Dautzenberg, F.M., and Hauger, R.L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 71-77.

De Gruyter, Pschyrembel klinisches Wörterbuch, 2013.

de Kloet, ER, (1995). Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol.* 16, 416-425. DOI: 10.1055/b-002-46974

Deguara CS, Pepas L, Davis C. Does minimally invasive surgery for endometriosis improve pelvic symptoms and quality of life? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24:241-4.

Deura I, Harada T, Taniguchi F, Iwabe M, Izawa M, Terakawa N (2005) Reduction of estrogen production by interleukin-6 in a human granulosa cell line may have implications for endometriosis-associated infertility. *Fert. Steril.* 83 Suppl.1 : 1086–1092

Donnez J, Nisolle M, Gillet N, Smets M, Bassil S, Casanas-Roux F. Large ovarian endometriomas. *Hum Reprod* 1996;11:641-6.

Druckmann R und Druckmann MA. 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 97, 389–396.

ESHRE Capri Workshop Group. Social determinants of human reproduction. *Hum Reprod* 2001; 16: 1518–1526.

Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, Pang X, Connolly R, Jacobson S, Theoharides TC (2001) Acute stress increases permeability of the blood–brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 888:117–127

Fabbri,A., Tinajero,J.C., and Dufau,M.L. (1990). Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* 127, 1541-1543.

Felberbaum R.E., Bühler K., van der Ven H. *Das Deutsche IVF-Register 1996–2006. 10 Jahre Reproduktionsmedizin in Deutschland.* © Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007

Francica G. Reliable clinical and sonographic findings in the diagnosis of abdominal wall endometriosis near cesarean section scar. *World J Radiol* 2012;4:135-40.

Garrido N, Navarro J, Garcia Velasco J. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* 2002;8:95-103.

Garry R. The effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:299-303.

Germayer A, Gludize LC (2003) How does endometriosis cause infertility? In: Tulandi T, Redwine D (eds) *Marcel Dekker, New York, , 152–165*

Ghizzoni L, Mastorakos G, Vottero A, et al. 1997. Corticotropin-releasing hormone (CRH) inhibits steroid biosynthesis and interleukin-1 receptor mediated fashion. *Endocrinology* 138: 4806–4811.

Graziani G1, Tentori L, Portarena I, Barbarino M, Tringali G, Pozzoli G, Navarra P. CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):807-13.

Greetfeld M, Schmidt MV, Ganea K, Sterlemann V, Liebl C, Müller MB. A single episode of restraint stress regulates central corticotrophin- releasing hormone receptor expression and binding in specific areas of the mouse brain. *Neuroendocrinol*. 2009 May;21(5):473-80. doi: 10.1111/j.1365 2826.2009.01865.

Grino M, Chrousos GP, and Margioris AN. (1987). The corticotropin releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 148, 1208-1214.

Gustofson RL, Kim N, Liu S, Stratton P. Endometriosis and the appendix: a case series and comprehensive review of the literature. *Fertil Steril* 2006;86:298-303.

Haas D, Chvatal R, Habelsberger A, Schimetta W, Wayand W, Shamiyeh A, Oppelt P. Preoperative planning of surgery for deeply infiltrating endometriosis using the ENZIAN classification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013a;166:99-103.

Haas D, Chvatal R, Reichert B, Renner S, Shebl Omar, Binder H, Wurm P, Oppelt P. Endometriosis – a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2012;286:667-70.

Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scan* 2013b;92:3-7.

Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, Hull MG (1996) Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *JCEM* 81:426–9.

Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;2 CD004992. DOI 10.1002/14651858.

Hatzoglou A, Margioris AN, Bakogeorgou E, Gravanis A Castanas E. Identification, characterization and localization of corticotropin-releasing hormone receptors in human placenta. *Life Sciences*, Vol. 59, No. 22, pp. 1871-1879, 1996

Klonoff-Cohen H, Chu E, Natarajan L, Sieber W. A prospective study of stress among women undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Fertility and Sterility* Vol. 76, No. October 2001

Hsu,S.Y., and Hsueh,A.J. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat. Med.* 7, 605-611.

Hudelist G, Fritzer N, Thomas A, Niehues C, Oppelt P, Haas D, Tammaa A, Salzer H. Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. *Hum Reprod* 2012;27:3412-6.

Hudelist G, Keckstein J. Die Wertigkeit der Vaginalsonographie in der präoperativen Diagnostik der Adenomyose und tief infiltrierenden Endometriose. *praxis* 2009;98:603-7.

Hudelist G, Oberwinkler KH, Singer CF, Tuttlies F, Rauter G, Ritter O, Keckstein J. Combination of transvaginal sonography and clinical examination for preoperative diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 2009b;24:1018-24.

Ittner E, Himmel W, Kochen MM. Ungewollte Kinderlosigkeit in der Hausarztpraxis: Beratungs- und Betreuungsbedarf. In: Brähler E, Felder H, Strauß B, Hrsg. Fruchtbarkeitsstörungen. *Jahrbuch der Medizinischen Psychologie* 17. Göttingen: Hogrefe; 2000: 229–244.

Jacobson,L., and Sapolsky,R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamicpituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* 12, 118-134.

Jahrbuch 2013 Deutsches IVF-Register, Sonderheft Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, 2014.

Jezova D, Ochedalski T, Glickman M, Kiss A, Aguilera G. Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience.* 1999;94(3):797-802.

Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, et al. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids* 2003;68:931–40.

Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Godoy H, Chrousos GP. The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance. *Horm Metab Res* 2007;39:474–7.

Karteris E, Grammatopoulos D, Dai Y, Olah KB, Ghobara TB, Easton A, Hillhouse EW. The Human Placenta and Fetal Membranes Express the Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 1 and the CRH-C Variant Receptor* 0021-972X/98 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Copyright © 1998 by The Endocrine Society

Kempuraj D, Papadopoulou N, Stanford EJ, Christodoulou S, Madhappan B (2004) Increased numbers of activated mast cells in endometriosis lesions positive for corticotropin-releasing hormone and urocortin. *Am J Reprod Immunol* 52.

Kentenich H, Woldt B, Krüssel S. Sozialrechtliche Regelungen zur künstlichen Befruchtung, Elektronischer Sonderdruck, Gynäkologische Endokrinologie 2013 · 11:302–306· DOI 10.1007/s10304-013-0584-0, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.

Kissler S, Hamscho N, Zangos S, Wiegratz I, Schlichter S, Menzel C, Doebert N, Gruenwald F, Vogl TJ, Gaetje R, Rody A, Siebzehnuebl E, Kunz G, Leyendecker G, Kaufmann M. Uterotubal transport disorder in adenomyosis and endometriosis- a cause for infertility. *Brit J Obstet Gynaecol* 2006;113:902-8.

Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Silbernagl, Stefan; et al.: 2010. Physiologie. Thieme Verlag

Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y and Ohama K (1998) Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD 56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 13: 1036-1043

Lang G., Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, Springer-Verlag Wien

Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Endometriose, AWMF, 2010

Levenstein S (2003) Stress and ulcerative colitis: convincing the doubting Thomases. *Am J Gastroenterol* 98:2112–2115

Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 1998;4:752-62.

Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280:529-38.

Liang B1, Wei DL, Cheng YN, Yuan HJ, Lin J, Cui XZ, Luo MJ, Tan JH
Restraint stress impairs oocyte developmental potential in mice: role of CRH-induced apoptosis of ovarian cells. *Biol Reprod.* 2013 Sep 19;89(3):64. doi: 10.1095/biolreprod.113.110619. Print 2013 Sep.

Lima AP, Moura MD an Rosa e Silva AAM. Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2006) 39: 1121-1127 ISSN 0100-879X.

Lovenberg,T.W., Chalmers,D.T., Liu,C., and De Souza,E.B. (1995). CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136, 4139-4142.

Luo X, Kiss A, Makara G, Lolait SJ, Aguilera G. Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol.* 1994 Dec;6(6):689-96.

Kanitz M, Tuchscherer M, Brüßow KP, Nürnberg G, Otten W. Stress-related gene expression in brain and adrenal gland of porcine fetuses and neonates. *Theriogenology.* 2005 Mar 1;63(4):1220-34. Schwerin

Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E, Chrousos GP. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the female reproductive system. *Ann NY Acad Sci* 1997;816:42–56

Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Chrousos G, Gravanis A. Uterine and embryonic trophoblast CRH promotes implantation and maintenance of early pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 2003;997:85–92.

Mansi JA, Rivest S, Drolet G. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology*. 1996 Nov;137(11):4619-29.

Mastorakos G, Ilias I. Maternal and fetal hypothalamic–pituitary–adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann NY Acad Sci* 2003;997:136–49.

Mastorakos G, Scopa CD, Vryonidou A, Friedman TC, Kattis D, Phenekos C, Merino MJ, Chrousos GP. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1191–1197.

Mastorakos,G., Webster,E.L., Friedman,T.C., and Chrousos,G.P. (1993). Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding sites in the rat ovary. *J. Clin. Invest* 92, 961-968.

Meyer R. Über den Stand der Frage der Adenomyositis, Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynäkol* 1919;36:745-50.

Muramatsu, Y., Sugino, N., Suzuki, T., Totsune, K., Takahashi, K., Tashiro, A., et al., 2001. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1362–1369.

Murase, M., Uemura, T., Kondoh, Y., Funabashi, T., Hirahara, F., 2002. Role of corticotropin-releasing hormone in ovarian steroidogenesis. *Endocrine* 18, 255–260.

Muzii L, Marana R, Caruana P, Macuso S. The impact of preoperative gonadotropin-releasing-hormone agonist treatment on laparoscopic excision of ovarian endometriotic cysts. *Fertil Steril* 1996;65:1235-7.

Nakamura, K, Sheps, S, Arck, PC, 2008. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25, 47–62.

Neponmaschy PA, Sheiner E, Mastorakos G, Arck PC. Stress, immune function and reproduction. *Ann NY Acad Sci* 2007;1113:350–64.

Nezhat C, Seidman DS, Nezhat F, Nezhat C. Laparoscopic surgical management of diaphragmatic endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69:1048-55.

Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen (2000). *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena, Urban & Fischer Verlag

Ozel L, Sagiroglu J, Unal A, Unal E, Gunes P, Baskent E, Aka N, Titiz MI, Tufekci EC. Abdominal wall endometriosis in the caesarean section surgical scar: a potential diagnostic pitfall. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38:526-30.

Peterson BD, Pirritano M et al. The impact of partner coping in couples experiencing infertility. *Hum Reprod* 2008; 23: 1128–1137.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al (1995) Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155:128-133.

Pittaway DE, Maxon W, Daniell J., Herbert C, Wentz AC (1983) Lutealphase defect in infertility – patients with endometriosis. *Fert. Steril.* 39: 712-713

Potter,E., Sutton,S., Donaldson,C., Chen,R., Perrin,M., Lewis,K., Sawchenko,P.E., and Vale,W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 8777-8781.

Practice Committee Am. Soc. Reprod. Med. (2004) Endometriosis and Infertility. Fert. Steril. 82, Suppl.1, S40-S45

Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM (1999) The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. Nat Med 5:1178–1182

Rainey WH, Sawetawan C, Shay JW, Michael MD, Mathis JM, Kutteh W, Byrd W, Carr BR. Transformation of Human Granulosa Cells with the E6 and E7 Regions of Human Papillomavirus, Cal-912X/94/7803-0705 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Copyright 1994 by The Endocrine Society

Redwine DB. Diaphragmatic endometriosis: diagnosis, surgical management, and long-term results of treatment. Fertil Steril 2002;77:288-96.

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

Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. Am J Pathol 1927b;3:93-109.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of the endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 1927a;14:422.

Sánchez-Margalet V1, Lucas M, Solano F, Goberna R. *Exp Cell Res.* 1993 Nov;209(1):160-3. Sensitivity of insulin-secreting RIN m5F cells to undergoing apoptosis by the protein kinase C inhibitor staurosporine.

Schobitz B, Reul JM, Holsboer F (1994) The role of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical system during inflammatory conditions. *Crit Rev Neurobiol* 8:263–291

Schuster MW, Wheeler TL 2nd, Richter HE. Endometriosis after laparoscopic supracervical hysterectomy with uterine morcellation: a case control study. *J Minim Invasive Gynecol* 2012;19:183-7.

Schweppe KW. Endometriose - Eine Erkrankung ohne Lobby. *Zentralbl Gynäkol* 2003;125: 233.

Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jun;78(6):3363-7

Slama R, Hansen OKH, Ducot B et al. Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum Reprod* 2012; 27: 1489–1498.

Slominski,A., Wortsman,J., Tuckey,R.C., and Paus,R. (2007). Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol. Cell Endocrinol.* 265-266, 143-149.

Srivastava MD, Lippes J, Srivastava BI. Cytokines of the human reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.* 1996 Sep;36(3):157-66.

Steckler,T., and Holsboer,F. (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol. Psychiatry* 46, 1480-1508.

Stites DP and Siiteri PK. 1983a. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol. Rev.* 75,118-138.

Stites DP, Bugbee S, Siiteri PK. 1983b. Differential actions of progesterone and cortisol on lymphocyte and monocyte interaction during lymphocyte activation, relevance to immunosuppression in pregnancy. *J Reprod Immunol* 5:215-228.

Stöbel-Richter Y, Sender A, Brähler E, Strauß B. Psychologische Beratung und Psychotherapie bei ungewollter Kinderlosigkeit. *Psychother Psych Med* 2013; 63: 400–414.

Swanson LW., Sawchenko PE, Rivier J, and Vale W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36, 165-186.

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

Tariverdian N1, Theoharides TC, Siedentopf F, Gutiérrez G, Jeschke U, Rabinovich GA, Blois SM, Arck PC. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol.* 2007 Jun;29(2):193-210.

Tartakovsky B, Goldstein, Broshi N (1991) Colony stimulation factor-1 blocks early pregnancy in mice. *Biol Reprod* 44: 906–912

Thompson RC, Seasholtz AF, and Herbert,E. (1987). Rat corticotropin-releasing hormone gene: sequence and tissue-specific expression. *Mol. Endocrinol.* 1, 363-370

Tseng JF, Ryan IP, Millam TD et al. (1996) Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from woman with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1118-1122

Tuttles F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinneberg HR. ENZIAN-score. Eine Klassifikation der tiefen infiltrierenden Endometriose. *Zentralbl Gynäkol* 2005;127:275-81.

Ulisse S, Fabbri A, Dufau ML 1989 Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. *J Biol Chem* 264:2156–2163

Ulrich U, Drienko E, Müller F, Keckstein J. Chirurgische Therapie der Endometriose: Möglichkeiten und Grenzen. *Med Forsch / Exzellenzforschung in der Medizin* 2012;3:56-62.

Vale,W, Spiess,J, Rivier,C, and Rivier,J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397.

Van Praag,H.M., De Kloet,R., und Van Os,J. (2004). *Stress, the Brain and Depression* (Cambridge University Press)

Vergetaki A, Jeschke U, Vrekoussis T, Taliouri E, Sabatini L, Papakonstanti EA, Makrigiannakis A. Differential expression of CRH, UCN, CRHR1 and CRHR2 in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *PLoS One*. 2013 Apr 24;8(4):e62313. doi: 10.1371/journal.pone.0062313. Print 2013.

Victory R, Diamond MP, Johns DA. Villar's nodule: a case report and systematic literature review of endometriosis externa of the umbilicus. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007 Jan-Feb;14(1):23-32.

Vitoratos N, Papatheodorou DC, Kalantaridou SN, Mastorakos G. Reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann NY Acad Sci* 2006;1092:310–8.

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

Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1407-11.

Wan Q, Gao K, Rong H, Wu M, Wang H, Wang X, Wang G, Liu Z. . Histone modifications of the *Crrh1* gene in a rat model of depression following chronic stress. *Behav Brain Res.* 2014 Sep 1;271:1-6. doi: 10.1016/j.bbr.2014.05.031.

Watkins LR, Maier SF (2000) The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol* 51:29–57

Welsch, Sobotta Lehrbuch Histologie. 2010 | 3. Auflage Urban & Fischer im Elsevier Verlag

Wiebold JL, Stanfield PH, Becker WC, Hillers JK. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 1986;78:185–92.

Yoon,D.J., Sklar,C., and David,R. (1988). Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology* 122, 759-761

IX. VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

„Expression von Corticotropin-Releasing Hormon Rezeptor 1 (CRHR1) im Verlauf der humanen Follikulogenese und bei Ovarienendometriose.“

Pavlik R, Heublein S, Hecht S, Noss U, Vrekoussis T, Thaler CJ, Jeschke U.

60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
Geburtshilfe Frauenheilkd 2014; 74 - PO_Endo02_17 DOI: 10.1055/s-0034-1387987

„Corticotropine-Releasing Hormone Receptor 1 (CRHR1) is differentially expressed during human follicle maturation and is up-regulated in ovarian endometriosis.“

Pavlik R, Vrekoussis T, Heublein S, Hecht S, Thaler CJ, Jeschke U.

30th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Endocrinology (ESHRE), 2014

„Überexpression von CRHR-1 bei Ovarienendometriose und Einfluss von Corticotropin Releasing Hormon (CRH) auf die Steroidhormonbiosynthese.“

Ennouri M, Pavlik R, Heublein S, Hecht S, Zerbe H, Thaler CJ.

Meeting des Zentrums für Translationale Reproduktionsmedizin, München, 2013

„Corticotropine-Releasing Hormone Receptor 1 (CRHR1) signalling interferes with steroid biosynthesis of ovarian granulosa cells.“

S. Heublein, R. Pavlik, S. Hecht, M. Ennouri, C.J. Thaler, U. Jeschke

(ESRI Oxford 2015) Journal of Reproductive Immunology. Volume 111, September 2015, Page 19.

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe, der die Erstellung dieser interdisziplinären Doktorarbeit ermöglichte und sich bereit erklärte diese Arbeit zu betreuen. Auch für seine Bereitschaft jederzeit für Rückfragen oder Unterstützung zur Verfügung zu stehen, möchte ich mich herzlich bedanken.

Herzlich danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke, Leiter der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München, der die Durchführung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe ermöglichte und durch die herzliche Aufnahme in sein Team und durch seine unkomplizierte Art enorm dazu beitrug, dass ich diese Arbeit in einer einmaligen Atmosphäre anfertigen konnte. Lieber Udo, vielen Dank hierfür! Ich hätte keinen besseren Platz für die Anfertigung meiner Doktorarbeit finden können.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen beiden Betreuern Herrn Dr. Roman Pavlik und Frau Dr. Sabine Heublein. Danke für die unermüdliche exzellente wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen kompetenten Ratschläge und die konstruktiven Korrekturen während meiner Zeit im Labor und auch danach.

Ebenfalls danken möchte ich dem gesamten Mitarbeiter-Team der Forschungsgruppe. Insbesondere gilt mein Dank Frau Simone Hofmann und Frau Christina Kuhn für die fachliche Hilfestellung zu jeder Zeit. Vor allem aber danke ich Euch für die herzliche Aufnahme in Euer Team und die wirklich besonders schöne Zeit, die ich in Eurem Labor haben durfte. Danken möchte ich auch meinen Mitdoktoranden, allen voran Verena, Bert, Rebecca, Heidi und Nesa. Danke für Eure Unterstützung, wenn ich sie gebraucht habe, und danke für die schöne gemeinsame Zeit!

Frau Anna Rieger, aus der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung, danke ich herzlich für ihre akribische Überprüfung der statistischen Daten.

Für das Korrekturlesen der Arbeit, wie auch für die Korrektur der Grammatik und Rechtschreibung, danke ich herzlich Frau Christa Heinzemann.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinem Stiefvater Klaus. Ohne Eure unermüdliche liebevolle Unterstützung in jeder Hinsicht wären das Studium, die Anfertigung dieser Doktorarbeit und die parallel dazu gewachsenen beruflichen Dinge nicht möglich gewesen. Danke für Euren immerwährenden Zuspruch, Eure Liebe und Euer Engagement!

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Norbert danken. Der Dir gebührende Dank würde den Rahmen hier sprengen. Danke für Deine Liebe, Deine bedingungslose Unterstützung, Deinen Zuspruch, Deine Geduld und Deinen unerschütterlichen Glauben an mich. Ohne Deine Unterstützung wäre so Vieles nicht möglich gewesen.