

**Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener**

**Untersuchungen zur hormonellen Regulation von
Insulin-like Growth Factor-I und -II in
humanen endometrialen Stromazellen in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sabine Ursula Carli

aus

Böblingen

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter:

Professor Dr. P. Licht

2.Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. G. Meyberg-Solomayer

Teile der Untersuchungsergebnisse wurden am 15. November 2007 bei der Zeitschrift *Fertility and Sterility* veröffentlicht:

Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells.

Fluhr H, Carli S, Deperschmidt M, Wallwiener D, Zygmunt M, Licht P.

Fertility and Sterility; 2007 Nov 15 [Epub ahead of print]

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 8 |
| 1.1 | Cavum uteri, histologischer Aufbau des Endometriums | 9 |
| 1.2 | Menstruationszyklus, Dezidualisierung, Implantationsfenster | 10 |
| 1.2.1 | Hormonregulation im weiblichen Reproduktionssystem | 10 |
| 1.2.2 | Der Menstruationszyklus | 11 |
| 1.2.3 | Dezidualisierung | 12 |
| 1.2.4 | Implantationsfenster | 13 |
| 1.3 | Implantation | 15 |
| 1.3.1 | Entwicklung des Embryos | 15 |
| 1.3.2 | Embryonale Implantation | 16 |
| 1.3.3 | Der embryomaternale Dialog | 17 |
| 1.4 | Insulin-like Growth Factor-I und -II | 20 |
| 1.4.1 | IGF allgemein | 20 |
| 1.4.1.1 | IGF-I und -II | 20 |
| 1.4.1.2 | IGF Typ 1 und Typ 2 Rezeptor | 21 |
| 1.4.1.3 | IGFBP-1 bis -6 | 22 |
| 1.4.1.4 | IGFBP-Proteasen | 22 |
| 1.4.2 | IGF und seine Bindeproteine im Endometrium | 22 |
| 1.4.2.1 | IGF-I und -II | 22 |
| 1.4.2.2 | IGFBPs im Endometrium | 23 |
| 1.4.2.3 | Typ 1 und 2 IGF-Rezeptoren im Endometrium | 24 |
| 1.5 | Humanes Choriongonadotropin als frühes embryonales Signal | 25 |
| 1.6 | Klinischer Bezug | 28 |
| 1.7 | Fragestellung | 30 |
| 2 | Material und Methodik | 31 |
| 2.1 | Materialien | 31 |
| 2.1.1 | Geräte | 31 |
| 2.1.2 | Laborzubehör/ Verbrauchsmaterial | 32 |
| 2.1.3 | Chemikalien | 34 |
| 2.1.4 | Molekularbiologische Reagenzien | 35 |
| 2.1.5 | Antikörper | 36 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.1.6 | ELISAs | 36 |
| 2.1.7 | Oligonukleotide | 36 |
| 2.1.7.1 | Humanes β -actin | 36 |
| 2.1.7.2 | Humanes IGF-I | 37 |
| 2.1.7.3 | Humanes IGF-II | 37 |
| 2.1.7.4 | Humanes Prolaktin | 37 |
| 2.2 | Methodik | 38 |
| 2.2.1 | Patientenauswahl und Probenmaterial | 38 |
| 2.2.2 | Zellkultur | 38 |
| 2.2.2.1 | Präparation endometrialer Stromazellen | 38 |
| 2.2.2.2 | Versorgung endometrialer Stromazellen | 39 |
| 2.2.2.3 | Versuche an Zellkulturen | 40 |
| 2.2.2.3.1 | Stimulation mit Progesteron und 17β -Östradiol | 40 |
| 2.2.2.3.2 | 24h-Entzug von Progesteron und 17β -Östradiol | 41 |
| 2.2.2.3.3 | Stimulation mit humanem Choriongonadotropin | 41 |
| 2.2.2.4 | Probengewinnung bei endometrialen Stromazellen | 42 |
| 2.2.2.4.1 | Probengewinnung für ELISA | 42 |
| 2.2.2.4.2 | Probengewinnung für RNA-Isolation | 42 |
| 2.2.3 | RNA-Isolation | 42 |
| 2.2.4 | Reverse Transkription | 43 |
| 2.2.5 | realtime Polymerase Ketten Reaktion | 44 |
| 2.2.6 | ELISA | 46 |
| 2.2.7 | Immunfluoreszenzfärbung von adhärenen Zellen | 47 |
| 2.2.8 | MTT-Assay zur Messung der Zellvitalität | 48 |
| 2.2.9 | Herstellung von steroidfreiem FCS | 49 |
| 2.2.10 | Statistische Auswertung | 49 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Vorbemerkungen | 50 |
| 3.1.1 | Reinheit der Zellkulturen | 51 |
| 3.1.2 | Überprüfung der Dezidualisierung | 51 |
| 3.2 | IGF-I und IGF-II unter Dezidualisierung | 53 |
| 3.2.1 | IGF-I Expression in Zellen der Follikel- und der Lutealphase | 53 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.2 | IGF-II Expression in Zellen der Follikel- und der Lutealphase | 57 |
| 3.2.3 | IGF-I unter Dezidualisierung | 61 |
| 3.2.3.1 | IGF-I Expression auf mRNA-Ebene | 61 |
| 3.2.3.2 | IGF-I Sekretion auf Proteinebene | 61 |
| 3.2.4 | IGF-II unter Dezidualisierung | 63 |
| 3.2.4.1 | IGF-II Expression auf mRNA-Ebene | 63 |
| 3.2.4.2 | IGF-II Sekretion auf Proteinebene | 63 |
| 3.3 | 24 h Hormonentzug am Tag 9 der Dezidualisierung | 65 |
| 3.3.1 | IGF-I Expression und Sekretion nach 24 h Hormonentzug | 65 |
| 3.3.2 | IGF-II Expression und Sekretion nach 24 h Hormonentzug | 66 |
| 3.4 | Stimulation mit rekombinantem humanem Choriongonadotropin | 67 |
| 3.4.1 | IGF-I Expression und Sekretion unter dem Einfluss von hCG | 68 |
| 3.4.1.1 | 24 h hCG am Tag 6 der Dezidualisierung | 68 |
| 3.4.2 | IGF-II Expression und Sekretion unter dem Einfluss von hCG | 70 |
| 3.4.2.1 | 24 h hCG am Tag 9 der Dezidualisierung | 70 |
| 4 | Diskussion | 72 |
| 4.1 | Die Rolle der Zyklusphase aus der die Zellen entnommen wurden | 74 |
| 4.2 | IGF-I und -II unter Dezidualisierung von humanen ESC | 75 |
| 4.3 | IGF-I und -II nach 24 h Hormonentzug in dezidualisierten ESC | 79 |
| 4.4 | IGF-I und -II Expression und Proteinsekretion in ESC unter hCG | 80 |
| 5 | Zusammenfassung und Schlussfolgerung | 82 |
| | Literaturverzeichnis | 84 |
| | Danksagung | 96 |
| | Lebenslauf | 97 |

1 Einleitung

Von der Reifung des Follikels über die Befruchtung der Eizelle, bis hin zur Bildung eines rezeptiven Endometriums Bedarf es vieler Voraussetzungen zur erfolgreichen Implantation einer befruchteten Eizelle.

Im weiblichen Reproduktionssystem gehören neben den gonatotropen Hormonen, dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) und dem luteinisierenden Hormon (LH) des Hypophysenvorderlappens und dem aus dem Hypothalamus stammenden Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), die Steroidhormone Östrogen und Progesteron zur Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse. Zusätzlich spielen zahlreiche Wachstumsfaktoren, darunter auch IGF-I und -II und ihre Bindeproteine eine wichtige Rolle durch parakrine und autokrine Wirkungen im weiblichen Reproduktionstrakt. Es gibt zahlreiche Anhalte dafür, dass IGF-I und -II und ihre Bindeproteine an Follikelwachstum, Steroidhormonbildung im Ovar, Implantation des Embryos, Proliferation und Differenzierung von Endometrium beteiligt sind (90). Aktuelle Daten zeigen, dass auch das humane Choriongonadotropin (hCG) als frühes embryonales Signal u.a. durch die Regulation von IGFBP-1 einen Einfluss auf die endometriale Differenzierung hat. Das Verhalten von IGF-I und -II während der Differenzierung von Stromazellen in Deziduazellen ist bislang kaum untersucht und zu einem möglichen Einfluss von hCG auf diese Faktoren existieren keine Daten.

1.1 Cavum uteri, histologischer Aufbau des Endometriums

Das Cavum uteri, die Gebärmutterhöhle, ist mit Endometrium ausgekleidet, welches sich in Epithel, Stratum functionale endometrii und Stratum basale endometrii gliedert. Das Oberflächenepithel ist einschichtig hochprismatisch und besteht aus Flimmerzellen und sezernierenden Zellen mit Mikrovilli. Das Stratum functionale besteht aus zellreichem, faserarmen Bindegewebe, dem Stroma endometrii (42) zudem aus tubulösen Drüsen, den Glandulae uterinae, die mit glandulären epithelialen Zellen ausgekleidet sind (2). Die Gefäße in der Functionalis verlaufen stark gewunden und werden deshalb Spiralarterien genannt, sie setzen sich über Arteriolen in ein oberflächliches Kapillarnetz fort (42). Während der Sekretionsphase wird das Stratum functionale reichlich mit Granulozyten und Lymphozyten besiedelt. Die in der Functionalis befindlichen endometrialen Stromazellen haben die Fähigkeit sich in Deziduazellen umzuwandeln, sobald eine befruchtete Eizelle implantieren will. Man findet diese Transformation aber in jedem Zyklus, bevorzugt perivaskulär (2). Das Stratum basale wird während der Menstruation nicht abgestoßen. Es enthält Basalarterien und die Endabschnitte der Glandulae uterinae. Von ihm aus kommt es in der Proliferationsphase zum Aufbau des Stratum functionale (42).

1.2 Menstruationszyklus, Dezidualisierung, Implantationsfenster

1.2.1 Hormonregulation im weiblichen Reproduktionssystem

Zur Hypothalamus-Hypophysen-Ovar Achse zählen das im Hypothalamus gebildete Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH), die beiden im Hypophysenvorderlappen gebildeten Gonadotropine: das luteinisierende Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FSH), sowie die beiden Steroidhormone Östrogen und Progesteron.

Unter Einwirkung des aus dem Hypothalamus stammenden GnRH werden im Hypophysenvorderlappen LH und FSH ausgeschüttet. Im Ovar stimuliert FSH die Follikelreifung, während LH die Ovulation auslöst. Progesteron wird vom Corpus luteum in der zweiten Zyklushälfte in großen Mengen synthetisiert und ausgeschüttet. In wesentlich größeren Mengen wird Progesteron dann während der Schwangerschaft von der Plazenta gebildet. Die Sekretion von Progesteron ist LH abhängig. In den Ovarien werden vor der Ovulation in den Granulosazellen der Follikel Östrogene produziert. Ihre Sekretion ist von FSH abhängig. Die Steroidhormone Östradiol und Progesteron regulieren zum einen über einen Regelkreis die Sekretion von GnRH, LH und FSH zum anderen kommt es unter ihnen zur Proliferation und Differenzierung des Endometriums was der Vorbereitung auf eine Implantation dient (74). Östrogene werden hauptsächlich in Ovar, Plazenta, aber auch in Nebennierenrinde, Leber und Fettgewebe gebildet. Östrogene haben Einfluss auf Wachstum und Entwicklung von Vagina, Uterus und Mamma, zudem auf den Stoffwechsel, steigern hier u.a. die Natrium- und Wasserretention und Proteinsynthese. Genital kommt es u.a. zur vermehrten Zervixschleimproduktion und zur Endometriumproliferation, ebenso erhöhen Östrogene die Tubenmotilität (13). Progesteron ist das physiologische Gelbkörperhormon. Es wird vorwiegend im Corpus luteum und in der Plazenta sowie in der Nebennierenrinde gebildet. Progesteron setzt die Tubenmotilität herab, führt zu viskösem Vaginalsekret und führt zur Differenzierung des Endometriums in der Sekretionsphase. Es besitzt einen thermogenetischen Effekt. Die Körpertemperatur erhöht sich um ca. 0,5°C in der zweiten Zyklushälfte (13,74).

1.2.2 Der Menstruationszyklus

Bei der Menstruation wird das Stratum functionale des Endometriums abgestoßen. Der erste Tag der Menstruation wird als 1. Zyklustag bezeichnet. Die Dauer eines Menstruationszyklus beträgt durchschnittlich 28 Tage mit erheblichen physiologischen Schwankungen (24-35 Tage). Der Zyklus wird in zwei Hälften eingeteilt, die Proliferations- und die Sekretionsphase des Endometriums, wobei die Proliferationsphase der Follikelphase des Ovars entspricht und die Sekretionsphase der Lutealphase. Die Phase der Follikelreifung kann stark variieren, die der Lutealphase beträgt, nach stattgefundener Ovulation konstant 14 Tage. In der ersten Zyklushälfte, vermehren sich im wachsenden Follikel die Granulosa- und Thekazellen. Die Granulosazellen produzieren Progesteron, welches die Reifung der Eizelle unterstützt. Das in den Thekazellen gebildete Östradiol bewirkt die Proliferation des Stratum functionale. Die Schleimhaut verdickt sich von 1 mm auf ca. 5 mm. Hierbei kommt es zur Proliferation von Oberflächenepithel, Drüsenepithel, Stroma und Spiralarterien. Gegen Ende der Proliferation wird das Bindegewebe ödematös (42). Vor der Ovulation kommt es zu einem maximalen Östrogenanstieg der zu zu einer massiven Freisetzung von LH führt. Dieser LH-Peak bewirkt die Ovulation. Sie findet etwa 10-12 h danach statt. Die Ovulation erfolgt in der Regel am 12.-14. Zyklustag. Der rupturierte Follikel wird zum Corpus luteum, welches nun vermehrt Progesteron produziert.

Unter dem Einfluss von Östradiol und Progesteron kommt es nun zur sekretorischen Transformation des Endometriums und zur Ausbildung eines rezeptiven Endometriums (Sekretionsphase). Das Stratum functionale verdickt sich weiter und hat gegen Ende eine Dicke von 5-8 mm. Die Drüsen erweitern ihre Lumina und bilden ein glykogenreiches Sekret, welches die Lumina ausfüllt (42). Im basalen Bereich kommt es zu einer verstärkten Schlängelung der Drüsen. Das Stratum functionale kann nun in das Stratum compactum endometrii, welches subepithelial gelegen ist und das Stratum spongiosum endometrii, basal gelegen unterteilt werden (42). Spiralarterien vergrößern sich und es kommt zur Fett- und Glykogeneinlagerung (44) in Stromazellen. Das Endometrium ist nun optimal auf die Einnistung einer befruchteten Eizelle

vorbereitet. Erfolgt keine Befruchtung, so geht das Corpus luteum nach 14 Tagen zu Grunde. Das Absinken des Progesteronspiegels hat zur Folge, dass das Stratum functionale sich regressiv verändert, da es zur Kontraktion der Spiralarterien kommt und in Folge der Ischämie zur Schädigung der Schleimhaut mit nachfolgender Leukozyteninfiltration und Freisetzung proteolytischer Enzyme (42). Es wird schließlich abgestoßen und es kommt zur Blutung.

1.2.3 Dezidualisierung

Humane endometriale Stromazellen durchlaufen in vivo nach Vorbereitung durch Östrogen die Proliferation und Differenzierung unter dem Einfluss von Progesteron (25). Die Dezidualisierung des Endometriums ist eine entscheidende Voraussetzung für die Implantation einer befruchteten Eizelle. Die Zellen, die dezidualisiert werden sind fibroblastenähnliche Vorläuferzellen im endometrialen Stroma. Diese Prädezidualzellen werden über das Vorhandensein des Progesteronrezeptors bestimmt. Die resultierende Zelle ist die dezidualisierte Stromazelle (DSC) (15). Die Zellen nehmen an Größe und vor allem an Zellorganellen, wie dem rauen endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat, die an der Proteinsynthese bzw. an der Sekretion beteiligt sind zu (35). In vitro findet die Dezidualisierung der endometrialen Stromazelle (ESC) unter dem Einfluss von Progesteron statt. Dieser Vorgang kann durch Zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) beschleunigt werden, da cAMP die ESC für Progesteron sensibilisiert (7). Zyklisches Adenosin Monophosphat gilt als Dezidualisierungsstimulus. Die Annahme, dass cAMP an der Dezidualisierung von ESC beteiligt ist basiert auf in vitro Studien (6,7,87). Viele der Stoffe, die die Dezidualisierung induzieren können, allen voran Relaxin und Prostaglandin E, scheinen Modulatoren von cAMP zu sein (15). Dezidualisierte Stromazellen bilden eine Vielzahl von Molekülen, darunter Laminin, Fibronectin, Tissue factor (TF), IL-1, IL-11 und -15 und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Zu den Stoffen die von DSC gebildet werden und charakteristisch für DSC sind, gehören Prolaktin und IGFBP-1. Die Konzentrationen hiervon sind besonders hoch in dezidualisierten Stromazellen (15). Sie werden daher weitläufig als Dezidualisierungsmarker verwendet (39). Die Dezidualisierung

beginnt in der Nähe der Blutgefäße und breitet sich dann auf das Stroma aus. Dies findet in der späten Lutealphase oder im Schwangerschaftsendometrium/Dezidua statt (15).

Es wird davon ausgegangen, dass während der Schwangerschaft Dezidualzellen parakrine, immunregulierende, ernährende und auf den Embryo bezogene regulierende Funktionen erfüllen (35). In vitro können endometriale Stromazellen dezidualisiert werden durch Progesteron, Medroxyprogesteronacetat (MPA), oder cAMP. Die Zugabe von Östradiol und Epidermal Growth Factor (EGF) beschleunigt diesen Vorgang (3,36,39). In der sekretorischen Phase kommt es zusätzlich zur Dezidualisierung von Stromazellen zu einer sekretorischen Transformation der Epithelzellen und zu einem Einwandern von Immunzellen, von denen die wichtigsten Monozyten und uterine natürliche Killerzellen (NK) sind (15). Bei den Epithelzellen kommt es zu einer Strukturänderung der Plasmamembran und des Zytoskeletts, indem es zu einer Transformation der Mikrovilli kommt (85).

Neben den zellulären Veränderungen kommt es unter der Dezidualisierung zur Bildung einer speziellen extrazellulären Matrix (ECM), welche hauptsächlich aus Laminin, Heparansulfatproteoglykane und Typ IV Kollagen aufgebaut ist (80).

1.2.4 Implantationsfenster

Die Implantation der befruchteten Eizelle ist der entscheidende Schritt in der Schwangerschaft. Wilcox et al. untersuchten anhand von hCG Konzentrationen in Urinproben von 189 Frauen ohne bekannte Infertilität den Zeitpunkt der Implantation gemessen ab dem Zeitpunkt der Ovulation. Hierbei war das geschätzte erhöhte Risiko eines frühen Schwangerschaftsverlusts deutlich mit einem späten Implantationszeitpunkt assoziiert. Bei 84 % der erfolgreichen Schwangerschaften fand die Implantation zwischen dem 8. und 10. Tag statt (91). Stewart et al. zeigten ein Ansteigen von hCG bei 14 erfolgreichen Schwangerschaften zwischen dem 8. und 12. Tag nach dem LH-Peak (82). Aufbauend auf diese Daten kann von einem „Implantationsfenster“ gesprochen werden, welches einer von verschiedenen Gründen für das Fehlschlagen von Schwangerschaften mit später Implantation sein mag. Die Empfänglichkeit des

Endometriums nimmt während der späten Sekretionsphase ab (68) und das Corpus luteum spricht 11 bis 12 Tage nach der Ovulation weniger auf hCG an (92). Man geht davon aus, dass ein begrenztes Zeitfenster für die Implantation dazu dient nicht gesunde Embryos auszusortieren, unter der Annahme dass diese sich langsamer entwickeln, dadurch weniger und später hCG produzieren, langsamer wachsen und langsamer implantieren und somit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Schwangerschaft sinkt (91).

1.3 Implantation

Die Implantation ist ein komplexer Vorgang, bei dem sowohl Embryo und Endometrium beteiligt sind. Heute geht man davon aus, dass es zu einer gegenseitigen Wechselwirkung von Embryo und Endometrium kommt, sowohl durch vom Endometrium gebildete Faktoren, als auch durch parakrin wirkende Faktoren des Embryos.

1.3.1 *Entwicklung des Embryos*

Nach der Ovulation ist die Eizelle etwa 24 h befruchtungsfähig (73). Die Befruchtung der Oozyte findet in der Pars ampullaris des Eileiters statt (1). Die befruchtete Eizelle, auch Zygote genannt, geht nach Verschmelzung des weiblichen und männlichen Vorkerns vom 2-Zell-Stadium über Furchungsteilungen in das 16-Zell-Stadium (Morula) über. Hierbei steigt durch eine Reihe von Mitosen die Zellzahl an, die Zellen werden nun Blastomere genannt. Es kommt zur Kompaktierung, bei der sich der bisher lockere Zellverband mittels Tight junctions verdichtet. Es kommt zur Abgrenzung der inneren Zellmasse. Hieraus entsteht im Verlauf der Embryoblast während sich aus den äußeren epithelialen Zellen der Trophoblast bildet, der spätere plazentare Anteil (1). Bis zum 8-Zell-Stadium ist es möglich aus jedem einzelnen Blastomer ein genetisch identisches Individuum zu schaffen, danach verlieren mit Ausbildung von Embryo- und Trophoblast die Zellen ihre Totipotenz. Dies konnte bei Zellen von Säugetieren gezeigt werden und es gibt Hinweise, dass sich das Furchungsverhalten beim Menschen nicht von dem bei Säugetierblastomeren unterscheidet (1). Ab der 3. Furchungsteilung beginnt die Aktivierung des embryonalen Genoms mit Transkription und Translation von embryonaler mRNA (73). Die befruchtete Eizelle wandert während der Furchungsteilung im Eileiter in Richtung Uterus. 72 bis 96 Stunden nach der Befruchtung erreicht der Embryo im Stadium der Morula schließlich das Cavum uteri (45). Am Tag 5 (ca. 110 bis 120 Stunden nach der Ovulation) kommt es zum Auflösen der bis dahin die Morula umgebenden Zona pellucida, zum Schlüpfen, auch Hatching genannt. Es kommt nun zur Ausbildung der Blastozyste indem sich eine Blastozystenöhle durch konfluierende

Interzellularräume der Inneren Zellmasse bildet. Der Embryoblast formt sich auf einer Seite der Blastozyste. Die Trophoblasten bilden die äußere epitheliale Wand (72). Als Blastozyste kommt es nun zur Anheftung an das Endometrium. Unter normalen Umständen findet die Einnistung am 6. bis 7. Tag nach Befruchtung statt (73).

1.3.2 Embryonale Implantation

Der Ablauf der Implantation kann in 3 Schritte unterteilt werden: Apposition, Adhäsion und Invasion (73). Nach dem „Schlüpfen“ der Blastozyste aus der Zona pellucida am 5. bis 6. Tag nach der Befruchtung kommt es zur Apposition. Hierbei kommt es zum Kontakt der Mikrovilli des Synzytiotrophoblasten und Pinopodien der endometrialen Epithelzellen (73) gefolgt von der stabilen Adhäsion. Die Invasion der Blastozyste erfolgt durch Eindringen der Trophoblastzellen zwischen die endometrialen Epithelzellen. Im Verlauf implantiert sich die Blastozyste in die Zona compacta des Endometriums (72). Das Anheften der Blastozyste ist nur möglich, wenn sich das Endometrium in einem rezeptiven Stadium befindet. Am 8. Entwicklungstag ist die Blastozyste teilweise in das endometriale Stroma eingebettet. Der Trophoblast differenziert sich in eine äußere, mit dem Endometrium in Kontakt stehende Schicht, den Synzytiotrophoblasten (Synzytium) und in eine innere Schicht, den Zytotrophoblasten (72). Zudem bildet sich aus den Zellen des Embryoblasten die zweiblättrige Keimscheibe und durch zusammenfließen der dabei entstehenden kleinen Spalträume die Amnionhöhle (72). Im Synzytium bilden sich am 9. Entwicklungstag Vakuolen, welche zu Lakunen zusammenfließen (72). Am 11. bis 12. Entwicklungstag ist die Blastozyste vollständig in endometriales Stroma eingebettet und die Implantationsstelle wieder mit Epithel bedeckt. Um den nun stetig wachsenden Bedarf des Embryos an Nährstoffen sicherzustellen ist ein Anschluss an die maternale Blutzirkulation unumgänglich. In diesem Stadium kommt es zur Invasion der maternalen Gefäße durch das Synzytium (45) und schließlich zum Durchfluss der Lakunen mit mütterlichem Blut und somit am 12. Entwicklungstag zur Entstehung des uteroplazentaren Kreislaufs (72).

1.3.3 Der embryomaternale Dialog

Bei der Implantation der Blastozyste im Endometrium sind eine Vielzahl von Faktoren beteiligt. Untenstehend werden eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, wie Lektinen und Integrinen, sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren besprochen, von denen ausgegangen wird, dass sie einen Einfluss auf die Implantation haben.

Bei der initialen Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Endometrium scheinen Lektine eine entscheidende Rolle zu spielen (14). Trophoblastzellen beginnen mit der Expression von L-Selektin nach dem Schlüpfen der Blastozyste aus der Zona pellucida. L-Selektin wird von Leukozyten genutzt um sich am Endothel von Blutgefäßen zu binden (73). Zudem konnte gezeigt werden, dass es im Endometrium zu einer Hochregulation von L-Selektin bindenden Liganden kommt (73), weshalb angenommen wird, dass Blastozysten L-Selektin zur Bindung an das Endometrium nutzen. Diese lockere Bindung der Blastozyste an das Endometrium wird durch Integrine verstärkt.

Integrine sind heterodimere membrangebundene Glykoproteine, die aus einer α - und β -Untereinheit bestehen. Sie besitzen die Fähigkeit an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) zu binden, darunter Fibronectin, Kollagen und Laminin (85) und sind für die Adhäsion von entscheidender Bedeutung. Integrine werden sowohl vom Endometrium als auch von Blastozysten gebildet (73). Ein Teil der Integrine zeigt eine zyklusabhängige Expression. Das $\alpha_v\beta_3$ Integrin ist das wichtigste am Implantationsvorgang beteiligte Integrin (45). Eine Co-Expression mit dem $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_4\beta_1$ Integrin kommt nur während des Implantationsfensters vor (45). Es gibt Anzeichen dafür, dass das Fehlen oder ein Mangel an verschiedenen Integrinen mit erhöhter Infertilität assoziiert ist (45). So kam es bei Inaktivieren von $\alpha_v\beta_3$ Integrin in Mäusen zu einer signifikant reduzierten Implantationsrate (80).

Nach der Adhäsion der Blastozyste an das Endometrium folgt als nächstes die Invasion des Trophoblasten in das endometriale Stroma, die durch den Abbau der extrazellulären Matrix durch verschiedene Proteinasen, darunter die Matrixmetalloproteinasen (MMP) erleichtert wird. Gesteuert wird ihre Aktivität durch ihre Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP), die

vom Trophoblasten und vom Endometrium selbst gebildet werden (32). MMP-2 und -9 bauen den Hauptbestandteil der Basalmembran, das Kollagen IV, ab. Hierdurch kann es zur Invasion des Trophoblasten durch die Dezidua in die maternalen Gefäße kommen. Sie gelten daher als wichtige, vom Trophoblasten gebildete Enzyme für die Invasion (80). Fluhr et al. konnten zeigen, dass das frühe embryonale Signal hCG die Sekretion von MMP-2 und -9 in Zytotrophoblasten stimuliert und auf der anderen Seite TIMP-1, -2, und -3 in endometrialen Stromazellen signifikant reduziert wird. Durch hCG vermittelte vermehrte Sekretion von MMP durch den Trophoblasten und reduzierte endometriale TIMP Expression könnte der Embryo seine Implantation zusätzlich regulieren (19). Zudem konnte gezeigt werden, dass MMPs und ihre Inhibitoren die zyklischen Veränderungen des Gewebes in Ovar und Uterus während des Menstruationszyklus regulieren (11).

Die Familie der Epidermal Growth Factors (EGF) scheinen für die Rezeptivität des Endometriums eine Rolle zu spielen. EGF, TGF- α (Transforming Growth Factor), HB-EGF (Heparin-binding Epidermal Growth Factor) und der EGF-Rezeptor werden im menschlichen Endometrium zyklusspezifisch exprimiert (73). Es zeigte sich, dass TGF- α , EGF und HB-EGF die Apposition und das Auswachsen der Blastozyste in vitro fördern (73).

Ein weiteres Zytokin ist der Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), welcher im Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation verstärkt exprimiert wird (45). Dass LIF für die embryonale Implantation bedeutend ist, konnte mittels der Inaktivierung des LIF-Gens in weiblichen Mäusen gezeigt werden. Männliche Mäuse waren fertil, weibliche hingegen nicht, die Implantation der Blastozysten schlug fehl. Es konnte jedoch eine normale Implantationsrate beim Einbringen von LIF-Gen inaktivierten Embryonen in Wildtyp Mäuse erzielt werden, weshalb man von einem endometrialen Defekt ausging (81).

Auch dem Interleukin-1-System wird Bedeutung bei der Implantation zugeschrieben. Es besteht aus IL-1 α und IL-1 β , dem Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) und den beiden membrangebundenen Rezeptoren IL-1R Typ 1 und Typ 2. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 sowohl von Trophoblastzellen als auch dezidualisierten Stromazellen produziert wird und

der IL-1 Rezeptor in Epithelzellen und Trophoblasten vorkommt (4). Hinweise für einen Einfluss von IL-1 auf die Implantation gab die Bildung von IL-1 α und IL-1 β durch Embryonen bei der in vitro Fertilisation (IVF). Hohe Konzentrationen von IL-1 im Kulturmedium korrelierten mit einer höheren Erfolgsrate der Implantation nach Transfer (76). Zudem konnte im Mausmodell durch Gabe des IL-1 Rezeptor Antagonisten die Implantation verhindert werden (78).

Zu den beteiligten Wachstumsfaktoren gehört u.a. die Familie der Insulin-like Growth Factors (IGF). IGF-II mRNA konnte reichlich in den verankernden Villi des Trophoblasten gefunden werden, wobei sich ein Konzentrationsgradient zur Invasionsfront hin zeigte. Es wird aufgrunddessen von einem Einfluss von IGF-II auf die Trophoblastinvasion in das Endometrium ausgegangen (29). Während dieser invasiven Phase der Implantation produziert auf der anderen Seite das maternale Stroma große Mengen an IGFBP-1, welches als Inhibitor von IGF-II agiert, weshalb hier von einer Interaktion des IGFBP-1 mit dem IGF-II des eindringenden Trophoblasten ausgegangen wird (29). Man konnte zeigen, dass IGF-II die Zytotrophoblastenmotilität erhöht (33). Zudem wurden inhibitorische Effekte von IGFBP-1 auf die Bindung von IGF und ihre Wirkung in Chorionkarzinomzellkulturen beschrieben (67), weshalb vermutet wird, dass IGFBP-1 ähnliche Effekte auch auf normale in das Endometrium vordringende Zytotrophoblasten in vivo hat (25).

Damit die Schwangerschaft aufrecht erhalten werden kann muss der Embryo im Laufe der Implantation Anschluss an die mütterliche Blutversorgung erhalten. Hierbei spielen angiogentische Wachstumsfaktoren eine Rolle. An der Angiogenese sind u.a. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Platelet-Activating Factor (PAF) beteiligt. VEGF, als wichtigster beteiligter Faktor induziert die Angiogenese und erhöht die Permeabilität von Blutgefäßen und wird zusammen mit seinem Rezeptor im Endometrium und Trophoblasten exprimiert (43). Der Embryo kann somit die Angiogenese durch binden an endometriale Rezeptoren induzieren (43).

1.4 Insulin-like Growth Factor-I und -II

1.4.1 IGF allgemein

Die Familie der Insulin-like Growth Factors setzt sich zusammen aus den IGF-Peptiden (IGF-I und -II), sechs Bindeproteinen (IGFBP-1 bis -6), zwei IGF-Rezeptoren und IGFBP-Proteasen (40).

1.4.1.1 IGF-I und -II

IGF-I ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes einkettiges Polypeptid mit drei intramolekularen Disulfidbrücken. Es besitzt ein Molekulargewicht von 7649 Da. (65,66,69). IGF-II ist ein aus 67 Aminosäuren bestehendes einkettiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 7471 Da. IGF-I und -II bestehen zu 70 % aus "homologen Sequenzen" und besitzen große Strukturgleichheit zu Insulin (69). IGF-I wird überwiegend in der Leber gebildet, seine Bildung ist dort Wachstumshormon (GH) abhängig (75). IGF-I wird auch in anderen Geweben gebildet, wo seine Bildung von GH oder anderen Modulatoren, beispielsweise im Ovar, reguliert wird oder auch GH unabhängig stattfindet, wie im Uterus der Ratte (57,58). IGF-II wird ebenfalls in einer Reihe von Geweben gebildet. Im Gegensatz zu IGF-I ist die Bildung von IGF-II nicht streng GH abhängig (95). Die Polypeptide IGF-I und -II sind in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten an spezifische Bindeproteine gebunden (94). Hierbei ist der größte Teil an das Bindeprotein IGFBP-3 gebunden. Die Effekte von IGF-I und -II werden hauptsächlich durch den Typ 1 IGF-Rezeptor vermittelt.

IGF-I und IGF-II haben mitogene, metabolische, differenzierende und antiapoptotische Funktionen (69) und wirken sowohl endokrin als auch para- und autokrin. In vitro haben die IGFs eine Reihe insulinähnlicher Wirkungen, sowohl mitogene als auch metabolische (23). Zusätzlich zu ihrer Rolle als Mitogene, induzieren IGF-I und -II die Zelldifferenzierung und begünstigen somit die Funktionen u.a. in Myoblasten und Granulosazellen (23). Die Hormonsekretion einiger Zellen wird von IGFs reguliert, so stimulieren sie die Hormonsynthese und Sekretion u.a. in Granulosazellen und Thekazellen (23). Sowohl IGF-I als auch IGF-II werden in der Embryonalentwicklung in den

meisten Geweben exprimiert, vornehmlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs (40). Es gibt klare Anzeichen dafür, dass IGF-I und -II die Zellproliferation und Differenzierung von Präimplantationsembryos in der Maus stimulieren (77,79). Einige Tumorzelllinien synthetisieren IGFs, IGFBPs und besitzen IGF Typ 1 oder 2 Rezeptoren (54). IGFs könnten somit autokrin auch das Tumorzellwachstum beeinflussen (8).

Es zeigte sich, dass IGF-I einen Einfluss auf den Zellzyklus hat und somit zu DNA Synthese und Zellproliferation beiträgt (40). IGF-I trägt in einer Vielzahl von Zellen zur Proliferation bei u.a. in Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten, Muskelzellen, Keratinozyten, neuronalen Zellen, Oozyten, Granulosazellen u.v.m. (40). In bestimmten Zellen verhindert IGF-I den programmierten Zelltod (40). Die Funktion von IGF-II in vivo ist, im Gegensatz zu der von IGF-I bisher weniger verstanden. IGF-II scheint eine Rolle beim fetalen Wachstum und der Entwicklung zu spielen (23) zudem kommt es in hohen Konzentrationen im zentralen Nervensystem vor, weshalb IGF-II auch an der ZNS Entwicklung beteiligt sein könnte (23).

1.4.1.2 IGF Typ 1 und Typ 2 Rezeptor

Es gibt zwei bekannte Rezeptoren, die spezifisch IGFs erkennen(40), den Typ 1 IGF-Rezeptor und den Typ 2 IGF-Rezeptor.

Der Typ 1 IGF-Rezeptor hat große Ähnlichkeit mit dem Insulin-Rezeptor. Zudem ist er der einzige IGF-Rezeptor, der sicher IGF vermittelte Signalfunktionen besitzt. Die Signal Transduktion findet über Aktivierung einer Tyrosinkinase statt (40). Der Typ 2 IGF-Rezeptor ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (56). Es ist nach wie vor nicht vollständig geklärt welche Rolle der Typ 2 IGF-Rezeptor in Bezug auf IGF-II vermittelte Zellantworten spielt. Es zeigte sich, dass der Rezeptor möglicherweise dazu dient die Menge an IGF-II im Extrazellularraum zu verringern, zudem, dass der Verlust des Typ 2 IGF-Rezeptors in Mäusen mit fetalem Tod in utero assoziiert ist (18).Es zeigte sich, dass der Typ 2 Rezeptor ebenso die Migration von Endothelzellen vermittelt und die Neovaskularisation in der Kornea von Ratten induziert (89). Der Typ 1 Rezeptor bindet bevorzugt IGF-I. IGF-II besitzt eine hohe bis mittlere Bindungsaffinität. Insulin bindet nur in hohen Konzentrationen

an den IGF-I Rezeptor nicht jedoch an den IGF-II Rezeptor. Hier besitzt IGF-II eine hohe Affinität, die von IGF-I ist sehr gering. IGF-I und -II binden ebenfalls an den Insulin-Rezeptor, jedoch mit sehr niedriger bzw. niedriger Affinität (59). Die beiden IGF-Rezeptoren wurden im Menschen bisher in einer Vielzahl von Geweben identifiziert, darunter auch in der Plazenta, in Ovarialfollikeln und im Endometrium (90).

1.4.1.3 IGFBP-1 bis -6

Die sechs Bindeproteine binden IGF und verringern somit die Verfügbarkeit von IGF für seine Rezeptoren. Die Phosphorylierung von IGFBPs erhöht deren Affinität zu IGF, wohingegen die Glykosylierung und Proteolysierung von posttranslationalem IGFBP zu einer verminderten Affinität zu IGF führt und dadurch die Verfügbarkeit erhöht wird (40).

1.4.1.4 IGFBP-Proteasen

Es wurde eine Reihe von IGFBP-Proteasen identifiziert. Diese Enzyme lassen sich den Kallikrein-, Cathepsin-, Matrix Metalloproteinase- und Disintegrin Metalloproteinase- Familien zuordnen (9,63). IGFBP-1 wird hierbei am wenigsten durch die Proteasen beeinflusst (25).

1.4.2 IGF und seine Bindeproteine im Endometrium

1.4.2.1 IGF-I und -II

Während des Menstruationszyklus unterliegt das humane Endometrium dem Einfluss von Östrogen und Progesteron. Hierbei durchläuft es Proliferation und Differenzierung. Man geht davon aus, dass dort gebildete Wachstumsfaktoren einige der Effekte von Östrogen und Progesteron auf die endometriale Struktur und Funktion vermitteln können (96). So berichteten Giudice et al., dass das endometriale Wachstum in der Proliferationsphase durch Östradiol beschleunigt wird, indem das Östradiol die Bildung von IGF-I anregt, welches wiederum die Zellproliferation stimuliert (24).

Die mRNAs von IGF-I und -II und von IGFBP-1 bis -6 sind während des Menstruationszyklus in humanem Endometrium exprimiert (70,96).

Die mRNA von IGF-I und -II konnte in endometrialen Stromazellen nicht aber in Epithelzellen festgestellt werden (96). Giudice et al. zeigten, dass die mRNA von IGF-I und -II sowie die des Typ 1 und 2 IGF-Rezeptors unterschiedlich stark während des Menstruationszyklus und in der Frühschwangerschaft im humanen Endometrium exprimiert werden (24). IGF-I war hierbei in großer Menge in der östrogendominierten Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase vorhanden. Die mRNA von IGF-II war im Gegensatz dazu in der mittleren bis späten Sekretionsphase des Endometriums erhöht sowie in der Dezidua der frühen Schwangerschaft (24).

Eine Studie von Zhou et al. zeigte ebenfalls eine Dominanz von IGF-I in der Proliferationsphase und eine starke Expression von IGF-II in der Sekretionsphase (96). Aufgrund seiner Expression in der Proliferationsphase geht man davon aus, dass IGF-I einer von mehreren Mediatoren ist, der die „mitotischen“ Fähigkeiten von Östradiol im Hinblick auf schnelles Endometriumwachstum vermittelt (25). IGF-II wird als Mediator der Wirkungen von Progesteron gesehen aufgrund seiner Expression in der Sekretionsphase (21). IGF-I wird im Endometrium von verschiedenen Spezies, durch Östradiol stimuliert. Die IGF-I mRNA Expression im Uterus der Ratte steigt durch zugeführtes Östradiol um das zwanzigfache an (57). Demzufolge wird IGF-I eine vorwiegend proliferative Funktion zugesprochen, während IGF-II eher ein Differenzierungsfaktor zu sein scheint (96).

1.4.2.2 IGFBPs im Endometrium

Die Expression von IGFBPs in humanem Endometrium konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden (3,23,27,41,96). Die IGFBPs sind überwiegend in den endometrialen Stromazellen exprimiert (96). IGFBP-2, -4, -5 und -6 hatten hierbei ein diffuses stromales Expressionsmuster, während die Expression von IGFBP-1 und -3 sich auf einzelne endometriale Zellverbände beschränkte (70,96). Giudice et al. zeigten, dass IGFBP-2 und -3 mRNA signifikant in der späten Sekretionsphase erhöht ist (27). Die Expression von IGFBP-4 und IGFBP-5 mRNA bleibt während des Zyklus unverändert (70) Zhou et al. zeigten, dass IGFBP-5 vermehrt in der Proliferationsphase

vorzufinden ist, die anderen IGFBPs relativ gesehen in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus ansteigen (96).

IGFBP-1 ist das am meisten exprimierte IGFBP und ist ein wichtiges Produkt des sekretorischen Endometriums (25). Nach der Ovulation stimuliert Progesteron die endometrialen Stromazellen zur Sekretion von IGFBP-1 (90). IGFBP-1 mRNA findet sich in prädezidualisierten endometrialen Stromazellen der späten Sekretionsphase und in dezidualisierten Endometriumzellen nach eingetretener Schwangerschaft (41). Es ist eines der besten Dezidualisierungsmarker (39). Der Zeitpunkt der Expression von IGFBP-1 im humanen Endometrium spricht dafür, dass dieses Bindeprotein mit der Dezidualisierung der Stromazellen assoziiert ist (90). Studien mit endometrialen Stromazellkulturen zeigten, dass die IGFBP-1 Sekretion durch Progesteron stimuliert werden kann (3), dies spricht wiederum für eine progesteronabhängige IGFBP-1 Synthese (41).

Da die Konzentration von IGFBP-1 in uterinem Sekret zu dem Zeitpunkt stark ansteigt, an dem die endometriale Rezeptivität abnimmt wird angenommen, dass IGFBP-1 am „Schließen“ des Implantationsfensters beteiligt ist (50).

IGFBP-3 mRNA befindet sich überwiegend in endometrialen Kapillaren. Seine Konzentration steigt aufgrund der starken Vaskularisierung der endometrialen Drüsen während der Sekretionsphase an (96).

1.4.2.3 Typ 1 und 2 IGF-Rezeptoren im Endometrium

Die IGF-Rezeptoren von endometrialen Stromazellen werden durch Progesteron herunterreguliert, dadurch werden die wachstumsfördernden Eigenschaften von IGF-I eingeschränkt (86) was dazu führt, dass das Wachstum der endometrialen Stromazellen in der Sekretionsphase verhindert wird (90).

1.5 Humanes Choriongonadotropin als frühes embryonales Signal

Vom Embryo ausgehende Signale scheinen entscheidend für die Entstehung eines zur Implantation fähigen Endometriums zu sein und wichtiger Ausgangspunkt für den embryo-maternalen Dialog. Man geht davon aus, dass hCG, als eines der ersten durch den Embryo gebildeten Hormone während der Implantation zusätzlich zu seiner endokrinen Funktion zum Erhalt des mütterlichen Corpus luteum, zu Beginn der Schwangerschaft, auch parakrine Funktionen erfüllt (20).

Humanes Choriongonadotropin gehört zur Gruppe der Glykoprotein hormone (17) und besitzt ein Molekulargewicht von 39 kDa. Es besteht aus einer Alpha- und Beta-Untereinheit und besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu FSH, LH und Thyroideastimulierendem Hormon (TSH).

Das hCG wird durch den Synzytiotrophoblasten gebildet. Die Sekretion von hCG beginnt spätestens am Tag 7, im Blastozystenstadium (53). Die Studie von Lopata und Hay zeigte eine signifikant erhöhte Sekretion von hCG in „geschlüpften“ Blastozysten am Tag 14 zu intrazonalen Blastozysten (53). Im Gegensatz dazu kamen Woodward et al. in ihrer Studie zu dem Schluss, dass die Sekretion von hCG durch humane Embryonen im Blastozystenstadium zeitabhängig und unabhängig vom Beginn des Schlüpfens stattfindet (93).

Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von hCG können in drei aufeinanderfolgende Phasen unterschieden werden: Zunächst wirkt hCG juxtakrin auf das umgebende Gewebe. Das Vorhandensein des hCG/LH Rezeptors im Endometrium wurde lange Zeit in Frage gestellt (83). Heute gibt es klare Anhaltspunkte für die Expression eines funktionstüchtigen hCG/LH-Rezeptors im Endometrium (51,64). Es zeigte sich, dass hCG auf verschiedene Parameter der Differenzierung und Funktion des Endometriums Einfluss hat. Zudem gibt es Anhalte für eine Beeinflussung der Trophoblastinvasion (50). Han et al. zeigten, dass sowohl hCG als auch LH in endometrialen Stromazellen die Dezidualisierung induzieren können (28). Mittels intrauteriner Mikrodialyse konnte gezeigt werden, dass hCG Einfluss auf die Bildung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), LIF, Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), MMP-9 und IGFBP-1 hat (47,50). VEGF gilt als

wichtiges Zytokin für die Angiogenese. Durch hCG kam es zu einer signifikanten Stimulation von VEGF, weshalb man annimmt, dass hCG eine Rolle in der endometrialen Vaskularisierung und der Neuausbildung von Gefäßen während der Plazentation spielt (50). Die gemessenen Konzentrationen von LIF wurden signifikant erhöht, während die von M-CSF durch hCG reduziert wurden. Beide Zytokine spielen eine essentielle Rolle in der Implantation bei Mäusen (17). MMP-9 ist an der Invasion des Trophoblasten in das Endometrium maßgeblich beteiligt. Es kam zu keiner Regulation seines Inhibitors TIMP-1, jedoch einer geringen aber signifikanten Steigerung der MMP-9 Sekretion unter lokaler hCG-Gabe. Zudem führte die lokale Gabe von hCG zu einer Reduktion von IGFBP-1. Unter der Annahme, dass IGFBP-1 am Beenden der Rezeptivität des Endometriums beteiligt ist, wird vermutet, dass ein gut entwickelter Embryo durch seine hohe hCG Produktion auf sein eigenes Implantationsfenster Einfluss nehmen kann (50). Fluhr et al. konnten zeigen, dass hCG MMP-2 und -9 in Zytotrophoblasten stimuliert und dass TIMP-1, -2 und -3 in dezidualisierten endometrialen Stromazellen gesenkt wird (19). Es spricht demnach einiges dafür, dass parakrin wirkende endometriale Produkte, die entscheidend für die Implantation zu sein scheinen, durch embryonales hCG reguliert werden können (17).

Endokrin wirksam wird hCG nach Anschluss des Embryos an das maternale Blutsystem und dem Anstieg von hCG in maternalem Serum. Die Konzentration von hCG steigt im Verlauf der Schwangerschaft rasch an bis zur 10. Schwangerschaftswoche, danach fällt die Produktion von hCG ab und erreicht schließlich ein Plateau, das bis zum Ende der Schwangerschaft bestehen bleibt. In dieser Phase hält hCG die Funktion des Corpus luteum aufrecht. Bis am Ende des ersten Trimesters die Plazenta soviel Progesteron produziert, dass es für die Erhaltung der Schwangerschaft ausreicht (50). Humanes Choriongonadotropin hat auch auf Schilddrüse, ZNS, Immunsystem, sowie auf Hoden, Ovarien und Nebennieren des Fetus endokrine Wirkung (50). Es wird angenommen, dass in der dritten Phase hCG autokrin auf den Trophoblasten selbst wirkt u.a. hierbei auf die Trophoblast Differenzierung, und die eigene Biosynthese. Zudem könnte es auch an der Plazentation beteiligt sein (50).

Diese Wirkung von hCG wird über den hCG/LH-Rezeptor vermittelt, welcher vor der 9. SSW in einer verkürzten, 50 kDa Isoform vom villösen Trophoblasten exprimiert wird und erst danach kommt es zur Expression des Rezeptors durch den differenzierten Trophoblasten in voller Länge und hCG kann auf den Trophoblasten selbst wirken und seine eigene Biosynthese beeinflussen (50).

1.6 Klinischer Bezug

Es wird geschätzt, dass in Deutschland circa jede siebte Partnerschaft ungewollt kinderlos ist. Für viele dieser Partnerschaften besteht die einzige Möglichkeit ein Kind zu bekommen in der Anwendung moderner Reproduktionsverfahren. Sowohl beim Mann als auch bei der Frau gibt es viele mögliche Ursachen für ungewollte Kinderlosigkeit, bei der Frau u.a. hormonelle Störungen, die zu einer gestörten Eizellreifung führen, Fehlbildungen, Endometriose, Antikörperbildung oder genetische Ursachen.

Zu den Methoden der assistierten Fortpflanzung zählen Insemination, die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und die In-vitro-Fertilisation (IVF). Laut Deutschem IVF Register 2002 kam es bei ICSI und IVF Behandlung in 27,9 % bzw 28,4 % der Fälle zu einer Schwangerschaft, die Rate der erfolgreich ausgetragenen Schwangerschaften lag sowohl bei ICSI als auch IVF unter 15 %. Zu den Medikamenten, die in der Reproduktionsmedizin Verwendung finden zählen Clomifen, welches eine vermehrte Ausschüttung von FSH und LH bewirkt, Gonadotropine in Form von humanem menopausalem Gonadotropin (HMG), welches FSH und LH enthält, und rekombinantem FSH ohne LH-Beimengung, GnRH-Analoga und GnRH-Antagonisten, die zu einer Hemmung der LH-Freisetzung führen und somit den vorzeitigen Eisprung verhindern, Progesteron zur Vorbereitung des Endometriums und hCG zur Lutealphasenunterstützung und als Ovulationsauslöser.

Man geht heute davon aus, dass die Funktion des Endometriums und seine Rezeptivität ganz entscheidende limitierende Faktoren beim Zustandekommen einer Schwangerschaft sind (2). Eine erniedrigte Rezeptivität des Endometriums konnte bei einer Vielzahl von Frauen mit Infertilität gefunden werden (46). Obwohl bereits eine große Zahl von zyklisch exprimierten Proteinen und anderen Molekülen im Endometrium bekannt sind und das Verständnis von Abläufen im Endometrium zugenommen hat, so ist die Anwendung dieses Wissens im klinischen Alltag und die mögliche Umsetzung in Therapien bisher sehr begrenzt (85). Bislang gibt es kaum Möglichkeiten, die Implantation gezielt zu beeinflussen. Um in stimulierten Zyklen eine Störung der Lutealphase und damit eine eingeschränkte Rezeptivität des Endometriums

durch eine verminderte Funktion des Corpus luteum zu beeinflussen, wird, um einer möglichen unzureichenden Progesteron- und Östrogensekretion entgegenzuwirken nach Embryonentransfer zur Lutealsubstitution hCG oder direkt Progesteron gegeben (62).

Therapieansätze in Form von systemischen Behandlungen mit Heparin und Aspirin zur Verbesserung der Perfusion des Endometriums und Kortikosteroiden um das Abstoßen des Embryos zu unterdrücken führten zu keiner verbesserten Implantationsrate (85). Der Einsatz von Gentherapie oder zervikaler Applikation von Seminalplasma werden noch erforscht (85).

Im Hinblick auf eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten ist ein weitergehendes Verständnis der Vorgänge und Regulierungsmechanismen im Endometrium unabdingbar.

1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Zellkultur von humanen endometrialen Stromazellen das Verhalten von IGF-I und -II während der Dezidualisierung in vitro sowie der Einfluss von hCG auf diese beiden Moleküle untersucht.

Konkret wurden folgende Fragen untersucht:

- Welche Rolle spielt die Zyklusphase der Gewebeprobe aus der die Zellen entnommen wurden im Hinblick auf die IGF-I und -II Expression und Sekretion während der Dezidualisierung in vitro?
- Wie verhalten sich IGF-I und -II unter Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen?
- Wie verhalten sich IGF-I und -II unter 24 h Hormonentzug nach Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen?
- Welchen Einfluss haben unterschiedliche Konzentrationen von hCG auf dezidualisierte endometriale Stromazellen bezüglich IGF-I und -II?

Wir konnten mit Hilfe einer endometrialen Stromazellkultur sowie der Bestimmung der mRNA Expression mittels realtime reverser Transkriptase PCR sowie Messungen der Proteinsekretion von IGF-I und -II durch ELISA hierüber Aufschluss erhalten.

2 Material und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|---|------------------------|----------------------|
| Sterile Werkbank Hera safe | Heraeus/ Kendro | Osterode |
| Zellkultur-Inkubator | Binder | Tuttlingen |
| Kühl-Gefrierkombination | Robert Bosch GmbH | Stuttgart |
| Gefrierschrank Hera freeze (-80°C) | Heraeus/ Kendro | Osterode |
| Laborzentrifugen | | |
| Multifuge 3 S-R | Heraeus/ Kendro | Osterode |
| Biofuge fresco | Heraeus/ Kendro | Osterode |
| Tischzentrifuge | Qualitron Inc. | Korea |
| beheizbares Wasserbad | GFL® | Burgwedel |
| Mikroskop Fluovert FU | Leitz/ Leica | Wetzlar |
| Vortexer-Genie™ | Bender & Hobein AG | Zürich; Schweiz |
| Vortexer MS1 Minishaker | IKA® | Staufen |
| BioPhotometer No. 6131-04508 | Eppendorf AG | Hamburg |
| Peltier Thermal Cycler DNA Engine DYAD™ MJ Research | Biozym Scientific GmbH | Hessisch Oldendorf |
| ABI Prism 7000 Sequence Detection System | Applied Biosystems | Foster City; CA; USA |
| Waage | Sartorius AG | Göttingen |
| ELISA Messgerät Sunrise | Tecan | Crailsheim |
| Pipetus®-akku | Hirschmann Laborgeräte | Eberstadt |

MATERIAL UND METHODIK

| | | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|
| Neubauer Zählkammer | Hecht-Assistent | Sondheim |
| Pipetten „Eppendorf Research“ | Eppendorf AG | Hamburg |
| Pipetman | Gilson | Middleton, WI; USA |
| Dispenserhilfe Multipette® plus | Eppendorf | Hamburg |
| Waschgerät für 96-well-Platten | Tecan | Crailsheim |
| Titramax 1000 No. 544-12200-00-3 | Heidolph Instruments | Schwabach |
| Magnetrührstäbchen | NeoLab | Heidelberg |

2.1.2 Laborzubehör/ Verbrauchsmaterial

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|---|-------------------------------------|-------------------------|
| 6-, 24- und 96-well-Platten TC-Platte cellstar®,steril | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Steriles Skalpell, Cutfix® | B.Braun Aesculap AG & Co. KG | Tuttlingen |
| Sterile Petrischale cellstar® TC, 94/16 mm | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| steriler Filter 40 µm Falcon Nr. 352340 | Biosciences Discovery Labware | Bedford; MA; USA |
| steriler Filter 180 µm Millipore Nr. NY8H02500 | Millipore | Billerica, MA; USA |
| Zellkulturflaschen 75 cm ² Cellstar®, Cat.No.658195 | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Glas-Pasteurpipetten 230 mm | WU-Mainz | Mainz |
| 5; 10 und 25 ml sterile Kunststoffpipetten | Falcon® Becton Dickinson Labware | Franklin Lakes, NJ; USA |

MATERIAL UND METHODIK

| | | |
|---|------------------------|--------------------|
| 15 und 50 ml Röhrchen cellstar®, PP-Test tubes Cat.No. 188271 Cat.No. 227261 | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Pipettenspitzen | | |
| Art.Nr: 720011 | Biozym Scientific GmbH | Hessisch Oldendorf |
| No.REF 70.760.002 | Sarstedt AG & Co. | Nümbrecht |
| Ultratip | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Dispenser-Spritzen biopure 12,5 ml | Eppendorf | Hamburg |
| 0,5; 1,5 und 2,0 ml Eppendorfgefäße | Eppendorf | Hamburg |
| 8-Tube-Strip, 0,2 ml Biozym Nr. 712130 | Biozym Scientific GmbH | Hessisch Oldendorf |
| 96-well-PCR-Platte Greiner Nr. 652290 | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Objektträger | R. Langenbrinck | Emmendingen |
| Abdeckfolie Greiner Nr. 676070 | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Sterilfilter 0,45 µm Millipore Nr. SLHA033SS | Millipore | Billerica, MA; USA |
| Sterilfilter 0,22 µm Millipore Nr. SLGS033SS | Millipore | Billerica, MA; USA |
| 20 ml Spritze | B. Braun Melsungen AG | Melsungen |
| Microtubes | Biozym Scientific GmbH | Hessisch Oldendorf |
| Parafilm „M“ | American National Can™ | Chicago; USA |
| Uvette® Cat.No. 952 01 005-1 | Eppendorf | Hamburg |

2.1.3 Chemikalien

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|--|----------------------------------|-----------------------|
| FCS (Biochrom Nr. S0115) | Biochrom KG | Berlin |
| Aktivkohle (Roth Nr.X865.2) | Roth | Karlsruhe |
| Dextran T 70 (Roth Nr. 9228.1) | Roth | Karlsruhe |
| Methanol zur Analyse | Merck | Darmstadt |
| Ethanol absolut zur Analyse | Merck | Darmstadt |
| Isopropanol, p.a. | Merck | Darmstadt |
| Zellkulturmedium DMEM/F-12 ohne Phenol- Rot (Gibco Nr. 11039021) | Gibco™ | Paisley; UK |
| Gentamicin Sulfate (BioWhittaker™ Nr. 17-519Z) | Cambrex | Walkersville, MD; USA |
| Kollagenase 200 U/mg (Biochrom Nr. CIV-22) | Biochrom KG | Berlin |
| Kaisers Glyzeringelatine | Merck | Darmstadt |
| PBS steril, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (Gibco Nr. 18912-014) | Gibco™ Invitrogen Corporation | Paisley; UK |
| Dulbecco-PBS ⁺ (mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺) | Gibco™ | Paisley; UK |
| Trypanblau 0,4 % (Gibco Nr. 15250-061) | Gibco™ | Paisley; UK |
| Trypsin-EDTA (Nr. 25300-054) | Gibco™ | Paisley; UK |
| TRIZOL® (Invitrogen Nr. 15596-018) | Invitrogen | Karlsruhe |

MATERIAL UND METHODIK

| | | |
|---|----------------|--------------------|
| DdH ₂ O (Ampuwa®) | Fresenius Kabi | Bad Homburg v.d.H. |
| SDS ultra pure (Nr. 2326.1) | Roth | Karlsruhe |
| Chloroform, reinst DAB 9, BP | AppliChem GmbH | Darmstadt |
| MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolylblau) (Sigma Nr. M2128) | Sigma | Deissenhofen |

2.1.4 Molekularbiologische Reagenzien

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|---|--------------------|---------------------|
| Progesteron P 8783 | Sigma | Deissenhofen |
| 17β- Östradiol E 2758 | Sigma | Deissenhofen |
| Rekombinantes hCG (C6322) | Sigma | Deissenhofen |
| Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive Kit Nr. 4322171 | Applied Biosystems | Foster City,CA; USA |
| Applied Biosystems RNase Inhibitor Nr. N8080119 | Applied Biosystems | Foster City,CA; USA |
| Applied Biosystems SYBR® Green PCR Master Mix Kit Nr. 4309155 | Applied Biosystems | Foster City,CA; USA |
| PCR-Primer | Invitrogen | Karlsruhe |
| Programm: PrimerExpress® Software v2.0 | Applied Biosystems | Foster City,CA; USA |

2.1.5 Antikörper

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|--|-----------------------------------|---------------------|
| Anti-Vimentin-Antikörper sc-6260 FITC | Santa Cruz Biotechnology, Inc. | Santa Cruz, CA; USA |
| Anti-Zytokeratin- Antikörper sc-8018 PE | Santa Cruz Biotechnology, Inc. | Santa Cruz, CA; USA |

2.1.6 ELISAs

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|--|--|---------------------|
| ACTIVE® Non-Extraction IGF-II ELISA DSL-10- 2600 | DSL® Diagnostic Systems Laboratories, Inc. | Webster, Texas; USA |
| ACTIVE® Non-Extraction IGF-I ELISA DSL-10- 2800 | DSL® Diagnostic Systems Laboratories, Inc. | Webster, Texas; USA |

2.1.7 Oligonukleotide

Die Primer wurden mittels PrimerExpress® Software v2.0 erstellt und von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Bei der Primererstellung wurde eine Intron-überlappende Lage der Primer gewählt, um zu verhindern, dass es zu einer Amplifikation von genomischer DNA kommt anstatt der gewünschten komplementären DNA (cDNA).

Die Primer und die zu erwartenden Amplicons sind unten angegeben.

2.1.7.1 Humanes β -actin

Forward: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3' (18 Basenpaare (bp), Tm 59°C,
GC % 61)

→ auf Exon 4 (876-1057)

Reverse: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3' (20 bp, Tm 59°C, GC % 60)

→ auf Exon 5 (1058-1793)

Amplicon: 70 bp, Tm 82°C, GC % 56

2.1.7.2 *Humanes IGF-I*

Forward: 5'-AGT CAG CTC GCT CTG TCC GT-3' (20 bp, Tm 59°C, GC % 60)

→ auf Exon 4 (387-568)

Reverse: 5'-TGC GTT CTT CAA ATG TAC TTC CTT-3' (24 bp, Tm 58°C,
GC % 38)

→ auf Exon 4/5 (5: 569-7236)

Amplicon: 77 bp, Tm 83°C, GC % 57

2.1.7.3 *Humanes IGF-II*

Forward: 5'-CCG GCT TCC AGA CAC CAA T-3' (19 bp, Tm 59°C, GC % 58)

→ auf Exon 1/2 (1: 1-546)

Reverse: 5'-GGC CAA GAA GGT GAG AAG CA-3' (20 bp, Tm 59°C, GC % 55)

→ auf Exon 2 (547-709)

Amplicon: 68 bp, Tm 83°C, GC % 57

2.1.7.4 *Humanes Prolaktin*

Forward: 5'-CAC CCC CGA AGA CAA GGA G-3' (19 bp, Tm 59°C, GC % 63)

→ auf Exon 3 (727-834)

Reverse: 5'-CCA GGA TCG CAA TAT GCT GAC-3' (21 bp, Tm 59°C, GC % 63)

→ auf Exon 4 (835- 1014)

Amplicon: 82 bp, Tm 80°C, GC % 49

2.2 Methodik

2.2.1 Patientenauswahl und Probenmaterial

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie waren regelmäßige Menstruationszyklen. Als Ausschlusskriterien galten Malignität, Endometriose, zystische Veränderungen, Polypen oder Hyperplasien, sowie das Tragen von Intrauterinpressaren und eine hormonelle Therapie in den letzten drei Monaten. Keine der Patientinnen war zum Entnahmezeitpunkt älter als 50 Jahre. Die Gewebeproben stammen aus Uteruspräparaten von Hysterektomien der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Die Indikation zur Hysterektomie wurde beim überwiegenden Teil der Patientinnen aufgrund von Uterus myomatosus, Descensus uteri oder Hypermenorrhoe gestellt. Die Patientinnen wurden anhand eines Informationsblatts über die Studie in Kenntnis gesetzt und gaben ihr Einverständnis zur Probenentnahme. Das Projekt wurde durch die Ethik-Kommission genehmigt (AZ 258/2003 V). Die Uteri wurden direkt aus dem OP dem Pathologen übergeben, der das Endometriumgewebe entnahm, welches unmittelbar in Transportmedium überführt wurde. Die Einteilung der Gewebeproben in Proben aus Follikel- oder Lutealphase fand mittels 17 β -Östradiol-, LH-Wert- und Progesteronwert-Bestimmung statt. Die Bestimmung wurde im Zentrallabor der Tübinger Universitäts-Frauenklinik durchgeführt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Präparation endometrialer Stromazellen

Das Gewebe wurde nach Entnahme durch den Pathologen in gekühltes (4°C) DMEM/F-12 (mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin) überführt und entweder sofort weiterverarbeitet oder maximal ca. 12 h bei 4°C gelagert. Es wurde in einer Petrischale mit einem sterilen Skalpell von Blutkoageln und Myometriumanteilen getrennt, mit 10 ml PBS gewaschen und in ca. 1 mm³ große Stücke zerteilt. Anschließend wurden die Gewebestücke mit 5 ml 0,5 % Kollagenase (in DMEM/F-12 ohne Zusätze) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei alle 15 min auf- und abpipettiert wurde um das Gewebe zu zerkleinern. Man beendete die Inkubation, wenn das Gewebe homogen verdaut erschien, in

der Regel nach 1 h. Danach wurden 5 ml DMEM/F-12 (mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin) zugegeben, der Gewebeverlauf durch einen 180 µm Filter in ein 50 ml-Röhrchen filtriert und der Durchfluss anschließend durch einen 40 µm Filter, wobei jeweils mit 10 ml PBS nachgespült wurde.

Im Durchfluss befanden sich nun die endometrialen Stromazellen. Dieser wurde 10 min bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 2 ml DMEM/F-12 (mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin) gelöst. 10 µl der Zellsuspension wurden mit Trypanblau angefärbt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop auf Vitalität überprüft und mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Aussaat der Zellen erfolgte pro Flasche (75 cm²) mit ca. 2x10⁶ Zellen in 10 ml DMEM/F-12 (mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin). Um Verunreinigungen durch Epithelzellen, Leukozyten und Erythrozyten zu reduzieren wurde der erste Mediumwechsel nach ca. 1 h durchgeführt, da nach dieser Zeitspanne die Stromazellen bereits adhärent zur Oberfläche waren, die Epithelzellen jedoch noch nicht und sich zusammen mit den restlichen Zellen in Lösung befanden.

2.2.2.2 Versorgung endometrialer Stromazellen

Die Stromazellen wurden in den Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C solange inkubiert bis die Zellen unter dem Mikroskop konfluent erschienen. Dies war nach 5 bis 8 Tagen der Fall.

Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel alle zwei Tage. Hierfür wurde DMEM/F-12 mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin angesetzt und im Wasserbad auf 37°C vorerwärmt, verbrauchtes Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und pro 75 cm²-Flasche 10 ml frisches Medium zugegeben.

Wenn die Zellen konfluent in den Kulturflaschen erschienen wurden sie abtrypsiniert und je 100.000 Zellen/ well in 24 well Platten eingesetzt.

Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch alle im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Hierzu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS pro 75 cm²-Zellkulturflasche gewaschen (d.h. es wurde zugegeben, kurz geschwenkt und abgesaugt), 2 ml pro Zellkulturflasche Trypsin-EDTA zum

Lösen der Zellen vom Boden wurde zugegeben und die Kultur für 10 min in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden vom Boden der Flasche abgespült, und in 8 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die suspendierten Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 2-5 ml (je nach Größe des Pellets) in Medium gelöst.

Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben ausgezählt. Die Suspension wurde durch Zugabe von weiterem Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 2×10^5 Stromazellen verdünnt und anschließend in einer 24-well-Platte mit 1×10^5 Stromazellen und 500 μ l Zellkulturmedium pro well eingesetzt.

Die Zellen wurden nun wie oben beschrieben ebenfalls zur Konfluenz gebracht. Bis zur Konfluenz erfolgte nochmals ein Mediumwechsel, mit je 500 μ l pro well. Im Anschluss wurde mit dem eigentlichen Experiment begonnen.

2.2.2.3 Versuche an Zellkulturen

Die endometrialen Stromazellen waren für alle folgenden Versuche in 24-well Platten zur Konfluenz gebracht worden. Der erste Tag der Hormonzugabe wurde als Tag 0 festgelegt. Die Zellen befanden sich mit Ausnahme der Dauer des Mediumwechsels und der Probengewinnung ununterbrochen bei 37°C im Brutschrank.

2.2.2.3.1 Stimulation mit Progesteron und 17 β -Östradiol

Zunächst erfolgte zu allen Zellen die Zugabe von 500 μ l pro well Kontrollmedium (Medium ohne Hormonzugabe, d.h. DMEM/F-12 (mit 5 % FCS und 1 % Gentamicin) plus 0,1 % Ethanol) für 3 Tage. Das zur Dezidualisierung verwendete Progesteron und 17 β -Östradiol war in Ethanol gelöst. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Ethanol auszuschließen erfolgte dessen Zugabe auch zum Kontrollmedium. Es wurden je 4 wells pro Abnahmetag unter Dezidualisierung und je 4 wells als Kontrolle ohne Hormonzugabe angelegt. Die Zellen zur Dezidualisierung wurden mit DMEM/F-12 (mit 5 % FCS und 1 % Gentamicin), 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol, behandelt. An den Tagen 0, 3, 6 und 9 erfolgte jeweils die Abnahme von 2x250 μ l Zellkulturüberstand pro well und die Gewinnung der

mRNA wie unter 2.2.2.4 beschrieben. Bei den verbliebenen wells wurde an den Tagen 0, 3 und 6 ein Mediumwechsel mit Hormon- bzw., ohne Hormonzugabe vorgenommen. Hierfür wurde das verbrauchte Medium mit der Pasteurpipette abgesaugt und es wurden 500 µl frisches Medium pro well zugegeben.

2.2.2.3.2 24h-Entzug von Progesteron und 17β-Östradiol

Die Zellen wurden zunächst 3 Tage mit Kontrollmedium (DMEM/F-12 mit 5 % FCS und 1 % Gentamicin) behandelt. Anschließend wurden die Zellen 9 Tage lang mit Zellkulturmedium (DMEM/F-12 mit 5 % FCS und 1 % Gentamicin) unter Zugabe von 1 µM Progesteron und 30 nM 17β-Östradiol dezidualisiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage wie unter 2.2.2.3.1 beschrieben. Am Tag 9 bekamen 4 wells für weitere 24 Stunden Zellkulturmedium mit 1 µM Progesteron und 30 nM 17β-Östradiol und 4 wells Kontrollmedium. 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Gewinnung der Proben zur RNA-Isolation wie unter 2.2.2.4 beschrieben.

2.2.2.3.3 Stimulation mit humanem Choriongonadotropin

Die rekombinante hCG-Stocklösung hatte eine Konzentration von 1 IU/µl in DMEM/F-12. Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit Lösungen in den Konzentrationen 100, 10, 1 und 0,1 mIU/µl hergestellt. Um eine Konzentration von 100 mIU/µl zu erhalten wurden 35 µl Stocklösung in 315 µl DMEM/F-12 gelöst. Für die darauffolgenden Verdünnungen von 10, 1 und 0,1 mIU/µl wurden jeweils 35 µl der entstandenen Verdünnung wiederum in 315 µl DMEM/F-12 gelöst.

Die Inkubationsmedien in den Konzentrationen 0, 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 IU/ml wurden anschließend durch die Zugabe von je 0,3 ml der zuvor hergestellten Verdünnungen, DMEM/F-12 und Stocklösung zu 2,7 ml Zellkulturmedium mit 1 µM Progesteron und 30 nM 17β-Östradiol hergestellt. Die Zellen wurden je nach Versuchsanordnung am Tag 6 oder Tag 9 der Dezidualisierung mit rekombinantem hCG für 24 h inkubiert.

Je 4 wells einer 24-well Platte wurden mit derselben Konzentration an r-hCG behandelt. Die endometrialen Stromazellen wurden dann bei 37°C für 24 h im

Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben wie unter 2.2.2.4 beschrieben gewonnen.

2.2.2.4 Probengewinnung bei endometrialen Stromazellen

2.2.2.4.1 Probengewinnung für ELISA

Pro well wurden 2 Eppendorfgefäße mit je 250 µl des Zellkulturüberstandes abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.4.2 Probengewinnung für RNA-Isolation

Zellkulturmedium (DMEM/F-12 (mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin), Trypsin-EDTA und PBS (steril, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Mediumreste (nach Abnahme der Überstände) wurden abgesaugt, die Zellen wurden mit 500 µl PBS pro well gewaschen anschließend wurde pro well 100 µl Trypsin-EDTA zugegeben und die Kultur für 10 min in den Brutschrank gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl Zellkulturmedium pro well, um die Zellen damit vollständig abzulösen. Gründlich vom Boden abgespülte und suspendierte Zellen wurden in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 4°C mit 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µl TRIZOL[®] gelöst. Die Proben wurden bei -80°C gelagert und es wurde frühestens 24 h später mit der RNA-Isolation begonnen, da bei vorherigen Proben zur RNA-Isolation im Labor beobachtet worden war, dass es nach einer mindestens 24-stündigen Lagerung bei -80°C zu einer besseren Ausbeute an RNA kam.

2.2.3 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden alle verwendeten Reagenzien auf 4°C vorgekühlt. Wenn nicht anders angegeben erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

Das in 500 µl TRIZOL[®] eingefrorene (-80°C) Zellmaterial wurde aufgetaut, es wurden 100 µl Chloroform zugegeben. Das Gemisch wurde 15 s gevortext und 5 min inkubiert. Anschließend zentrifugierte man bei 12.000 U/min und 4°C für 15 min. Die obere wässrige Phase (ca. 300 µl) wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, es erfolgte die Zugabe von 250 µl Isopropanol und

eine Inkubation von 10 min und anschließender Zentrifugation bei 12.000 U/min, 4°C für 10 min. Der Überstand wurde dekantiert und 500 µl 75 % Ethanol zugegeben. Es folgte die Zentrifugation bei 8.000 U/min für 6 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und man ließ das Pellet für ca. 10 min trocknen, jedoch nicht vollständig. Das Pellet wurde in 42 µl ddH₂O (4°C) gelöst. Dann wurden die Proben im Wasserbad bei 55-60°C für 15 min inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. 2 µl zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden entnommen und mit 48 µl ddH₂O auf die Messverdünnung 1:25 eingestellt. Die gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die RNA-Konzentration in den einzelnen Proben wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.4 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkription die für die PCR benötigte komplementäre DNA (cDNA) gebildet.

Zunächst wurde das Probevolumen in dem sich jeweils 500 ng RNA befanden errechnet, die Differenz zu 10 µl wurde gebildet und diese im späteren Verlauf mit ddH₂O ausgeglichen.

Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Schritte auf Eis. Die RNA-Proben wurden langsam aufgetaut. Alle Reagenzien des Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive Kit außer der reversen Transkriptase wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Der RNase-Inhibitor und die reverse Transkriptase wurden bei -20°C belassen und nur kurz auf Eis gehalten.

Jeweils 20 µl des Reaktions-Mixes, bestehend aus RT-Puffer, Random Hexamers, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, RNase Inhibitor, MultiScribe RT und ddH₂O in untenstehender Zusammensetzung wurden in 0,2 ml Gefäße vorgelegt. Es wurde dann zunächst ddH₂O in den berechneten Mengen zu den einzelnen Proben zugegeben und anschließend die 500 ng RNA. Die RT-Reaktion (bei einem Gesamtprobevolumen von 30 µl) erfolgte im Thermocycler mit dem Programm RT ABI bei zunächst 25°C für 10 min und dann bei 37°C für 120 min. Anschließend wurde das Gemisch auf 4°C abgekühlt. Nach der RT-

MATERIAL UND METHODIK

Reaktion wurden zu jeder Probe 60 μl ddH₂O zugegeben. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert. 3 μl der cDNA wurden pro PCR-Ansatz eingesetzt. Es wurden für die PCR nur Proben verwendet, die aus einer gemeinsamen RT-Reaktion stammten, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

| Reagenzien | pro Reaktion |
|--|------------------------|
| 10x RT Buffer | 3 μl |
| 25x dNTPs | 1,2 μl |
| 10x Random Hexamers | 3 μl |
| RNase Inhibitor (20 U/ μl) | 0,6 μl |
| MultiScribe RT (50 U/ μl) | 1,5 μl |
| ddH ₂ O | 10,7 μl |
| RNA 500 ng | x μl |
| ddH ₂ O | (10 – x) μl |
| Gesamtvolumen | 30 μl |

2.2.5 realtime Polymerase Ketten Reaktion

Die realtime Polymerase Ketten Reaktion (PCR) dient ebenso wie die herkömmliche PCR der Amplifikation von cDNA Abschnitten. Der Ablauf dieser Amplifikation findet in einem Thermocycler statt und setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: Denaturierung, Annealing und der Elongation. Zusätzlich ist es bei der realtime PCR möglich durch Fluoreszenz-Messungen während der PCR eine semiquantitative Aussage über das amplifizierte Produkt zu treffen. Bei der hier verwendeten semiquantitativen PCR Methode wurde zu jeder cDNA die Amplifikation des Housekeeping-Gens β -Actin untersucht. Housekeeping-Gene wie β -Actin sind nicht regulierte Gene und werden von jeder Zelle exprimiert. Aufgrund der konstanten Expressionsrate von β -Actin wurde dieses als endogene Referenz eingesetzt, um die Expressionsraten von IGF-I und IGF-II zu ermitteln. IGF-I und IGF-II wurden gleich effizient amplifiziert wie β -Actin.

Für die Auswertung wurde der C_T -Wert, der sogenannte Threshold-Cycle benötigt. Der C_T -Wert beschreibt den Zyklus der Amplifikation, bei der ein Anstieg des Fluoreszenzsignals über das Grundrauschen bzw. die Nachweisgrenze hinweg festgestellt wird. Die Amplifikation verläuft hier exponentiell.

Hierbei wurden die relativen Expressionsraten von IGF-I und IGF-II bezogen auf die Expression von β -Actin mittels $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, der vergleichenden C_T -Methode zur relativen Quantifizierung verglichen (52).

Für die realtime PCR wurden die cDNA Proben und Primer bei Raumtemperatur aufgetaut und dann auf Eis gestellt.

Ein Reaktionsansatz für jedes Primerpaar wurde hergestellt, bestehend aus 5 μ l SYBR[®] Green PCR Master Mix, 0,5 μ l Primer forward (6 μ M), 0,5 μ l Primer reverse (6 μ M) und 1 μ l ddH₂O pro Reaktion. Der SYBR[®] Green PCR Master Mix bestand aus SYBR[®] Green 1 Dye, AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Reference I zur Signalnormalisierung und Puffer. Der Reaktionsansatz wurde nach Pipettierschema in die 96-well-PCR-Platte vorgelegt und es wurden je 3 μ l cDNA hinzugefügt. Es wurde zu jedem Triplikate einer Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zu jedem Primer-Reaktionsansatz wurde eine Negativkontrolle mit 3 μ l ddH₂O statt cDNA mitgeführt um Kontaminationen oder Fehler beim Herstellen des Reaktionsansatzes auszuschließen. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 10 μ l. Es wurden Primer für humanes β -Actin, IGF-I, IGF-II und Prolaktin verwendet. (Siehe 2.1.7.)

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler Typ ABI Prism 7000, hierfür wurde nachfolgendes Programm gewählt: Zunächst fand eine Erwärmung bei 50°C für 2 min statt dann folgten 95°C für 10 min um eine Zerlegung der Doppelstränge in Einzelstränge sicherzustellen. Jeder einzelne Zyklus bestand aus 95°C für 15 Sekunden zur Denaturierung der DNA und 60°C für 1 min zur Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing) sowie der Elongation, mittels DNA-Polymerase und Nukleotiden. Es fanden insgesamt 40 Zyklen statt. Pro Zyklus nahm die Menge des entstandenen spezifischen PCR-Fragments und damit proportional

die Menge des an die DNA gebundenen SYBR[®] Green I zu. Zum Abschluss wurde eine Schmelzpunktanalyse anhand einer Dissoziationskurve zur Identifizierung des entstandenen Produkts und zum Ausschluss der Amplifikation von unspezifischen Produkten durchgeführt. Hierfür wurde die Temperatur kontinuierlich von 60°C auf 90°C angehoben, währenddessen es zur Denaturierung des amplifizierten Produkts kam. Anhand der so ermittelten Schmelztemperaturen T_M konnte die Spezifität der abgelaufenen Amplifikation festgestellt werden.

2.2.6 ELISA

Die Messung von IGF-I- und IGF-II- Konzentrationen in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Hierzu wurden im Handel erhältliche ACTIVE[®] Non-Extraction IGF-I und ACTIVE[®] Non-Extraction IGF-II ELISA-Kits verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anweisung des Herstellers. Es handelte sich hierbei um einen ELISA vom Sandwich-Typ. Der Boden der wells war mit IGF-I bzw. IGF-II Antikörpern bestückt an die sich in einem ersten Arbeitsschritt die entsprechenden Antigene anhafteten. Nach Inkubation und Waschen erfolgte die Zugabe eines Detektions- IGF-I bzw. IGF-II Antikörpers an den eine Meerrettichperoxidase (HRP) angeheftet war, der in einer zweiten Inkubationsphase ebenfalls an die Antigene band. Nun lag ein Antikörper-Antigen-Antikörperkomplex vor. Die wells wurden erneut gewaschen und es erfolgte die Zugabe des chromogenen Substrats Tetramethylbenzidin (TMB). Dieses wurde durch die Peroxidase in einem erneuten Inkubationsschritt umgesetzt und es kam zu einer Blaufärbung. Nach 10 min wurde die Reaktion mittels Stop-Lösung unterbrochen, es erfolgte eine Gelbfärbung und das bis dahin umgesetzte Substrat, welches proportional zur Menge an Antigen war wurde mittels dem ELISA Messgerät Sunrise und dem Programm Magellan V2.01 gemessen.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbung von adhärennten Zellen

Nach der Präparation des Endometriums können potenziell Verunreinigungen der Stromazellkulturen durch andere Zellen, hauptsächlich Leukozyten und Epithelzellen bestehen. Um die Reinheit der Zellkulturen zu überprüfen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Zur Darstellung von Stromazellen wurde ein Anti-Vimentin-Antikörper verwendet. Vimentin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und gehört zu den Intermediärfilamenten. Zudem gilt Vimentin als allgemeiner Marker von Zellen mesenchymalen Ursprungs. Dieses Intermediärfilament ist in Stromazellen, nicht jedoch in Leukozyten und Epithelzellen zu finden und konnte so für die spezifische Erkennung genutzt werden. Hierfür wurde wie folgt vorgegangen:

Der Anti-Vimentin-Antikörper in einer Konzentration von 200 µg/ml wurde zunächst mit PBS⁺ auf 1:100 verdünnt. Je ein autoklaviertes Deckgläschen wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette in ein well einer 6-well-Platte gelegt. 5×10^4 Zellen wurden in 500 µl Zellkulturmedium (DMEM/F-12 mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin) gelöst und auf je ein Deckgläschen pipettiert. Zum Anwachsen der Zellen wurde die Platte für 2-3 h in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Danach wurden pro well 1,5 ml Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen über Nacht kultiviert. Kaisers Glyzeringelatine wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die wells mit je 3 ml PBS⁺ gewaschen. PBS⁺ wurde abgesaugt und die Zellen wurden durch Zugabe von 500 µl Methanol je Deckgläschen fixiert. Hierfür ließ man sie 5 min bei Raumtemperatur stehen. Es folgte die Zugabe von 3 ml PBS⁺ pro well, eine 5 minütige Inkubation und anschließendes Absaugen. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Die Deckgläschen wurden mit je 150 µl des mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) markierten Anti-Vimentin-Antikörpers benetzt und für 45 min bei 37°C im Brutschrank lichtgeschützt inkubiert. Die wells wurden erneut jeweils zweimal mit 3 ml PBS⁺ pro well mit 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gewaschen und das PBS⁺ abgesaugt.

8 μ l Kaisers Glyzeringelatine wurden auf einen Objektträger gegeben, die Deckgläschen aus den wells genommen, und mit der bewachsenen Seite auf den Objektträger gedrückt. Vor dem Mikroskopieren wurden die Präparate mindestens 12 h bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Der überwiegende Teil der Zellen zeigte unter dem Fluoreszenzmikroskop eine grüne Färbung durch FITC, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die Kultur fast nur aus Stromazellen bestand.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde ebenfalls zur Darstellung von Epithelzellen mit fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Anti-Zytokeratin-Antikörper durchgeführt. Hierbei ließen sich praktisch keine Zellen anfärben.

2.2.8 MTT-Assay zur Messung der Zellvitalität

Um eine Aussage über eine mögliche Zellschädigung durch die Versuchsbedingungen treffen zu können, erfolgte nach Durchführung eines Zellkulturexperimentes die Messung der Zellvitalität mittels

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay. Pro Versuchsbedingung wurden 6 wells für den MTT-Assay benötigt. In jedem well befanden sich 2×10^4 Zellen in 100 μ l Medium. Als blank-Wert dienten jeweils 6 mitgeführte wells pro Zellkultur-Experiment, die nur mit den Inkubationsmedien (ohne Zellen) mitgeführt wurden. Die MTT-Lösung lag in einer Konzentration von 2,5 mg/ml MTT in DMEM/F-12 ohne Phenol-Rot vor. Sie wurde lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Die SDS-Lösung bestand aus 10 % SDS ultra pure in ddH₂O.

Nach Abschluss des Zellkultur-Experimentes wurde das Zellkulturmedium belassen und 25 μ l MTT-Lösung pro well zugeben. Es folgte eine Inkubation für 4-6 h im Brutschrank bei 37°C. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT wurde hierbei von vitalen Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien zu blauem wasserunlöslichen Formazanfarbstoff umgesetzt. Die Entstehung der Formazanblau-Kristalle wurde unter dem Mikroskop überprüft, gegebenenfalls die Inkubationszeit verlängert. Die oben genannten Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 μ l SDS-Lösung pro well und eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C um

die Zellen zu lysieren und die Formazanblau-Kristalle in Lösung zu bringen. Die Messung der optischen Dichte mittels ELISA-Messgerät wurde bei 550 nm Messwellenlänge durchgeführt. Die gemessene optische Dichte (OD) ist hierbei direkt proportional zur Anzahl metabolisch aktiver, vitaler Zellen. Der optimale Messbereich lag bei OD 0,75-1,25.

2.2.9 Herstellung von steroidfreiem FCS

Das dem Nährmedium zugesetzte fetale Kälberserum (FCS) wurde zuvor mittels Aktivkohle und Dextran T 70 von Steroidhormonen befreit um eine Beeinflussung der Zellen durch diese zu verhindern. Hierfür wurden je 100 ml FCS, 5 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran T 70, zum Binden von Steroidhormonen in einem Becherglas vermischt, abgedeckt und 1 h bei Raumtemperatur mit dem Magnetrührer gerührt. Die Lösung wurde auf 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 8.000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Kanüle in eine 20 ml-Spritze aufgenommen und nacheinander dreimal durch Sterilfilter gegeben (zuerst durch einen 0,45 µm-Filter, dann zweimal durch 0,22 µm-Filter), hierbei wurden Spritze und Kanüle sowie die Filter immer wieder erneuert. Die Lagerung des FCS erfolgte zu je 10 ml bei -20°C.

2.2.10 Statistische Auswertung

Jeder Versuch wurde mit Triplikaten oder Quadruplikaten der Zellkulturen in Doppelwertbestimmung pro Tag durchgeführt. Die Zellkulturen stammten von drei bis fünf Patientinnen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way ANOVA) und nachfolgendem Multiple Comparison Test nach Dunnett und Bonferroni. Verwendet wurde hierfür GraphPad PRISM Version 4 Software.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt und als signifikant gewertet bei $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen

Für die Kontrollproben wurde über den Zeitraum des Versuchs weiter Kulturmedium gegeben ohne Hormonzusatz, um ausschließen zu können, dass die Beobachtungen im zeitlichen Verlauf auch ohne Dezidualisierung der Zellen stattfinden und somit möglicherweise unabhängig davon auftreten. Unterscheidet sich die Behandlung der Kontrollgruppe von der hier angegebenen, so wird dies bei einzelnen Experimenten angegeben. Es wurden nur Zellkulturen für die Versuche genommen, die eine signifikante Erhöhung der Prolaktin mRNA und deren Proteinsekretion, als Zeichen einer erfolgreichen Dezidualisierung zeigten.

Die mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer realtime RT-PCR bestimmt. Der Tag der ersten Hormonzugabe wurde als Tag 0 definiert. Soweit bei den einzelnen Experimenten nicht anders angegeben, wurde die mRNA-Expression und die Proteinsekretion zur Vergleichbarkeit am Tag 0 auf 100 % gesetzt. In den Schaubildern sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Im folgenden Ergebnisteil gilt:

| | |
|------|-------------------------------|
| EP | unter Hormongabe |
| Ko | Kontrollgruppe |
| * | $p < 0,05$ zu Tag 0 |
| ** | $p < 0,01$ zu Tag 0 |
| # | $p < 0,01$ zu Tag 3 |
| ## | $p < 0,01$ zu Tag 3 und Tag 6 |
| n.s. | nicht signifikant |

Mit Ausnahme der Schaubilder 3 b, 4 b, 6 b und 7 b. Hier beziehen sich die p-Werte nicht auf Tag 0 sondern auf das Ergebnis der Kontrollgruppe am selben Tag.

3.1.1 Reinheit der Zellkulturen

Die Reinheit der Zellkulturen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bestimmt (siehe 2.2.7). Der überwiegende Teil der Zellen zeigte unter dem Mikroskop durch das an den Anti-Vimentin-Antikörper gebundene FITC eine grüne Färbung. Es konnte angenommen werden, dass die Kultur fast nur aus Stromazellen bestand. Mittels Anti-Zytokeratin-Antikörper ließen sich praktisch keine Zellen darstellen, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass sich weder Epithelzellen noch Leukozyten in der Zellkultur befanden.

Die im Labor durch einen Kollegen durchgeführten Messungen mittels Durchflusszytometrie am Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Gerät zeigten, dass die Zellkulturen zu >95 % aus Stromazellen bestanden.

3.1.2 Überprüfung der Dezidualisierung

Die erfolgte Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen unter Progesteron und 17β -Östradiol drückt sich in einer erhöhten Sekretion des Dezidualisierungsmarkers Prolaktin aus. Dieser wurde auf mRNA und Proteinebene untersucht. Hierbei zeigte sich sowohl bei der mRNA-Expression als auch der Proteinsekretion ein signifikanter Anstieg von Prolaktin an den Tagen 6 und 9 im Vergleich zu Tag 0 unter Dezidualisierung mit $p < 0,01$. Die Kontrollgruppe zeigte im beobachteten Zeitraum keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression.

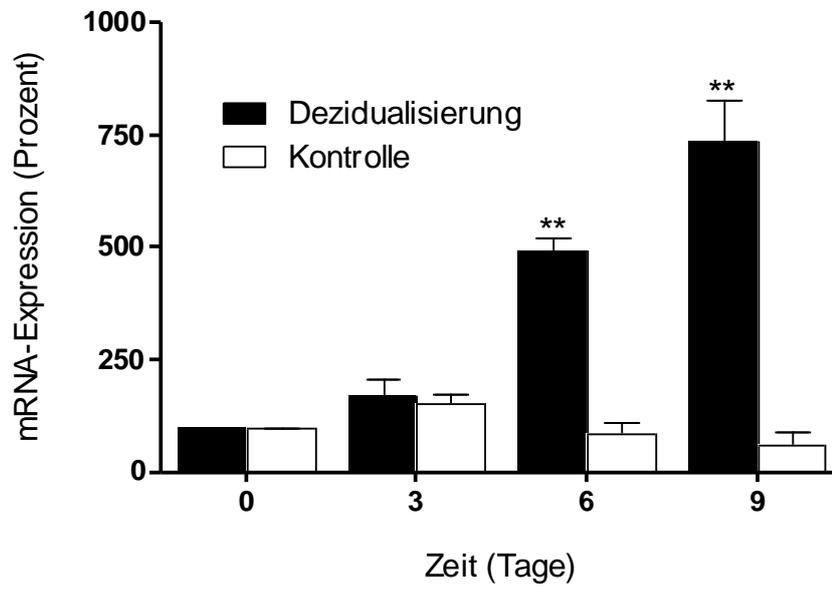


Abb. 1: mRNA-Expression von PRL, n=1

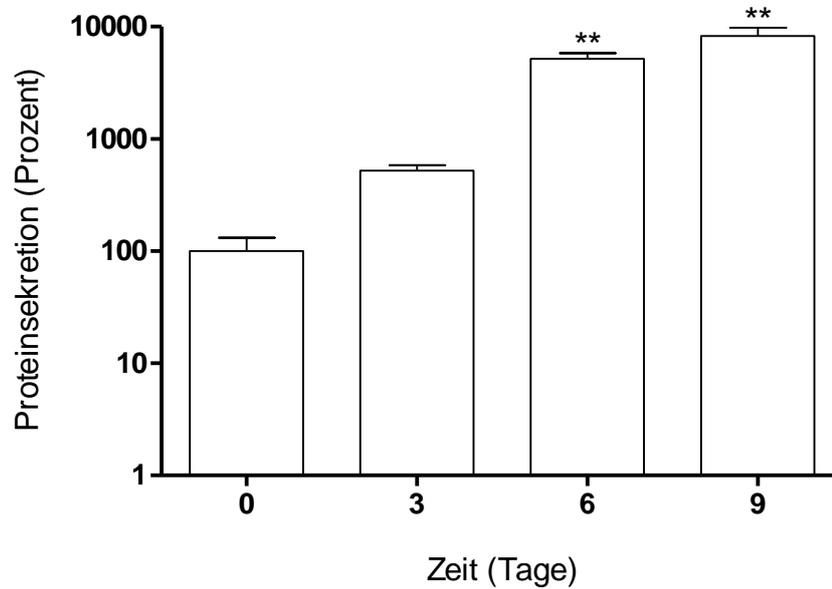


Abb. 2: log-Skala; Proteinsekretion von PRL, n=1

3.2 IGF-I und IGF-II unter Dezidualisierung

Hierbei sollte zunächst untersucht werden, inwiefern die Zyklusphase der Gewebeprobe, aus der die Zellen stammen, einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse hat. Man unterschied hierbei zwischen Zellen der Follikel- und der Lutealphase.

Die kultivierten endometrialen Stromazellen, wurden 9 Tage lang mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol behandelt. Anschließend wurde die IGF-I und -II Expression auf mRNA-Ebene als auch die Proteinsekretion an den Tagen 0, 3, 6 und 9 bestimmt.

3.2.1 IGF-I Expression in Zellen der Follikel- und der Lutealphase

Es zeigte sich sowohl bei den Zellen der Follikelphase (n=3) als auch der Lutealphase (n=4) ein rascher und ausgeprägter Anstieg der IGF-I Expression. Hierbei kam es bei Zellen der Follikelphase am Tag 3 zu einem etwa 44 fachen Anstieg und bei Zellen der Lutealphase am Tag 3 zu einem ungefähr 72 fachen Anstieg verglichen zum jeweiligen Tag 0. Beide Ergebnisse waren mit $p < 0,01$ zum Tag 0 signifikant. Im Verlauf kam es zur Abnahme der Expression. Tag 9 war bei beiden Zellreihen mit $p < 0,01$ zu Tag 3 wieder signifikant reduziert.

IGF-I mRNA-Expression Follikelphase:

| Zeit (Tage) | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|----------------------|---------------------------|
| Tag 0 | 100 \pm 9,3 | - |
| Tag 3 | 4429 \pm 996,0 | $p < 0,01$ |
| Tag 6 | 3024 \pm 739,6 | $p < 0,05$ |
| Tag 9 | 568,7 \pm 263,4 | n.s.; $p < 0,01$ zu Tag 3 |

IGF-I mRNA-Expression Lutealphase:

| Zeit (Tage) | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|----------------------|---------------------------|
| Tag 0 | 100 \pm 7,7 | - |
| Tag 3 | 7202 \pm 2123 | $p < 0,01$ |
| Tag 6 | 3407 \pm 985,7 | n.s. |
| Tag 9 | 329,9 \pm 114,0 | n.s.; $p < 0,01$ zu Tag 3 |

ERGEBNISSE

Die IGF-I Expression der jeweiligen Kontrollgruppen blieb, sowohl für die Zellkulturen der Lutealphase als auch für die Zellkulturen der Follikelphase über den Zeitraum von 9 Tagen ohne signifikante Veränderung. Im Vergleich von Kontrollgruppe und Zellen unter Dezidualisierung zeigte sich bei Zellen der Follikelphase an den Tagen 3 und 6 ein mit $p < 0,01$ signifikanter Anstieg von IGF-I im Vergleich zur Kontrollgruppe an den Tagen 3 und 6 (siehe Abb. 3 b). Bei den Zellen der Lutealphase zeigte sich ein am Tag 3 zur Kontrollgruppe am Tag 3 signifikanter Anstieg ebenfalls mit $p < 0,01$ (siehe Abb. 4 b).

Im Vergleich ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen der Follikel- und Zellen der Lutealphase darstellen.

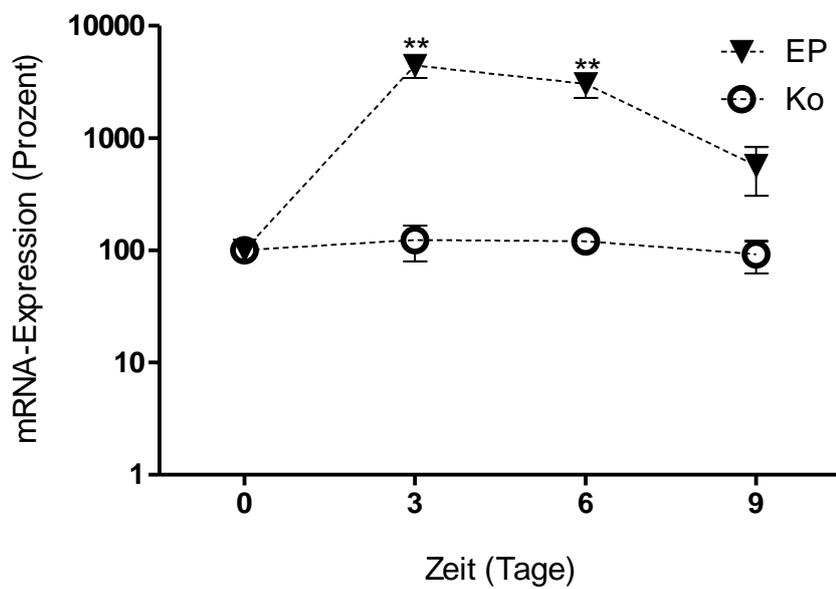
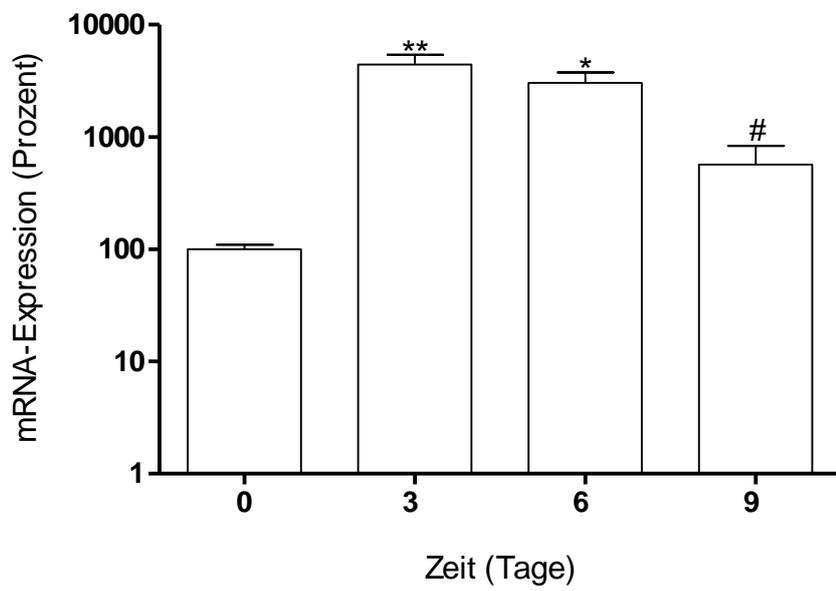


Abb. 3 a, b: log-Skala; IGF-I mRNA-Expression unter Dez., Follikelphase

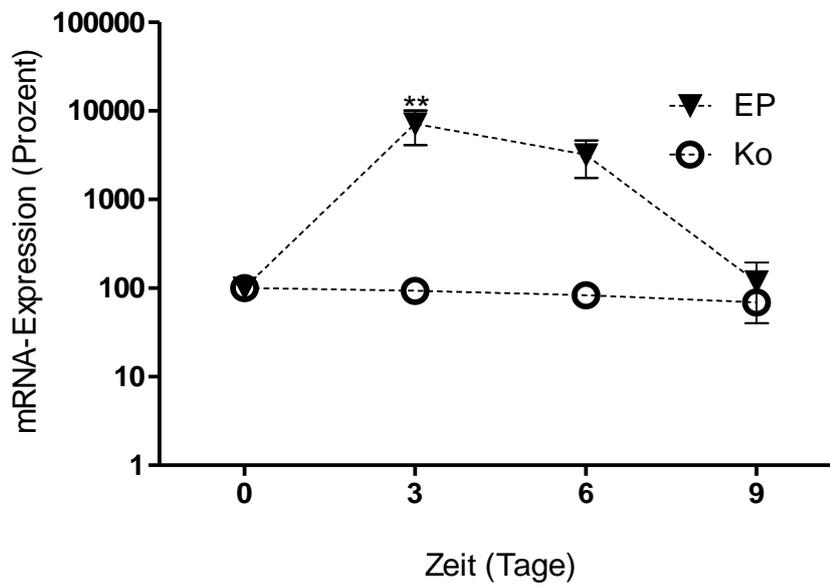
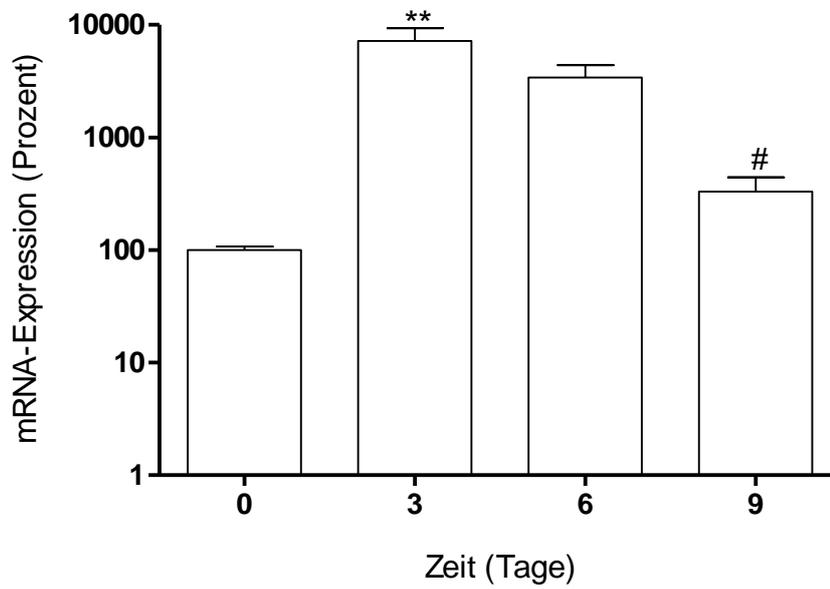


Abb. 4 a, b: log-Skala; IGF-I mRNA-Expression unter Dez., Lutealphase

3.2.2 IGF-II Expression in Zellen der Follikel- und der Lutealphase

Die Expression von IGF-II auf mRNA-Ebene war sowohl bei den Zellkulturen der Follikelphase (n=3) als auch der Lutealphase (n=4) an den Tagen 3, 6 und 9 der Dezidualisierung im Vergleich zu Tag 0 signifikant reduziert (siehe Abb. 6 a und 7 a).

IGF-II mRNA-Expression Follikelphase:

| Zeit (Tage) | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|----------------------|-----------------|
| Tag 0 | 100 \pm 12,3 | - |
| Tag 3 | 33,0 \pm 5,3 | p<0,01 |
| Tag 6 | 25,9 \pm 3,2 | p<0,01 |
| Tag 9 | 31,2 \pm 6,9 | p<0,01 |

IGF-II mRNA-Expression Lutealphase:

| Zeit (Tage) | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|----------------------|-----------------|
| Tag 0 | 100 \pm 5,5 | - |
| Tag 3 | 32,6 \pm 3,1 | p<0,01 |
| Tag 6 | 21,8 \pm 3,2 | p<0,01 |
| Tag 9 | 33,1 \pm 5,3 | p<0,01 |

Es zeigte sich, bei der Kontrollgruppe der Follikelphase (n=3) ebenfalls eine signifikante Abnahme der Expression von IGF-II auf mRNA-Ebene an den Tagen 6 und 9. Hierbei war die mRNA Expression am Tag 9 nahezu gleich reduziert wie die der Zellen unter Dezidualisierung.

Unter Dezidualisierung kam es jedoch zu einer stärkeren Abnahme. Die IGF-II mRNA-Expression war an den Tagen 3 und 6 ebenfalls zur Kontrollgruppe mit p<0,05 signifikant reduziert (siehe Abb. 6 b).

Die Kontrollgruppe der Lutealphase (n=2) zeigte eine im Schaubild nahezu parallel zu den Zellen unter Dezidualisierung verlaufende Abnahme der IGF-II Expression. Diese war an den Tagen 6 und 9 signifikant.

ERGEBNISSE

Die Zellen unter Dezidualisierung zeigten eine stärkere Abnahme und waren an allen Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe an diesen Tagen signifikant reduziert (siehe Abb. 7 b).

Im Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen der Follikel- und Zellen der Lutealphase.

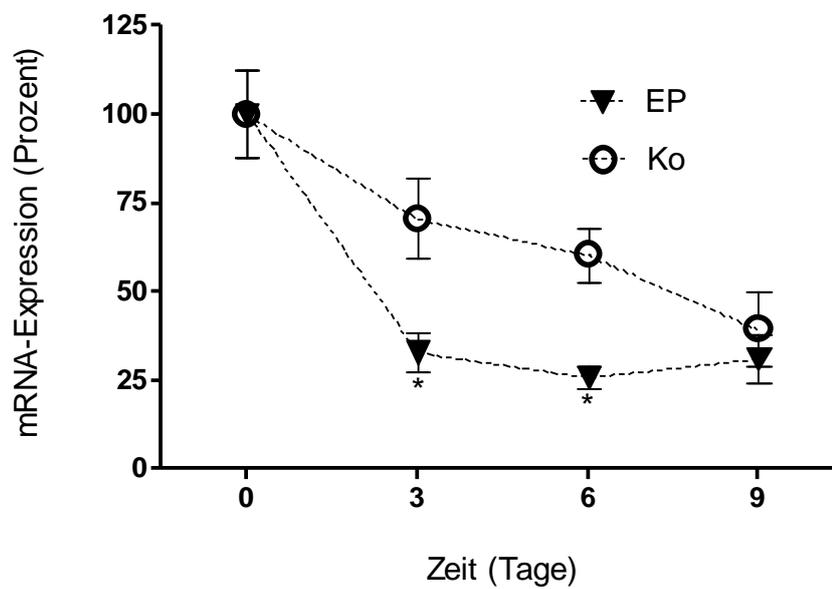
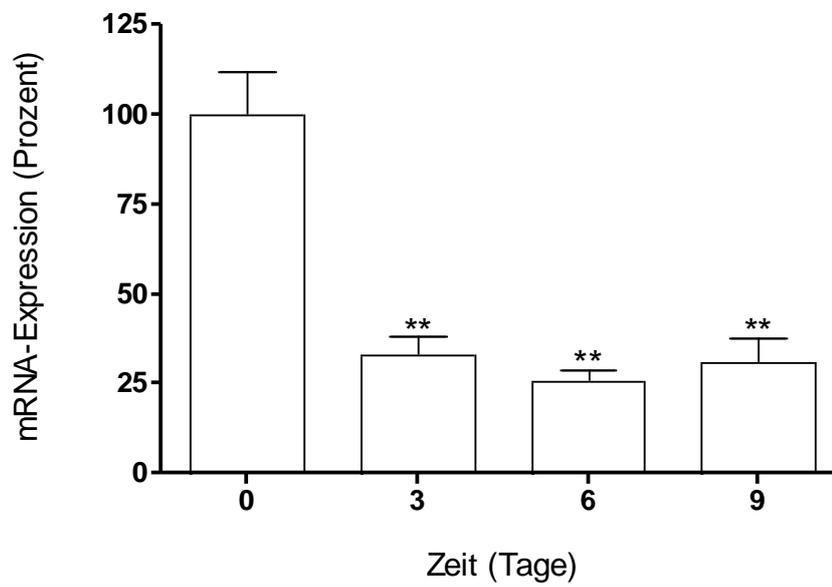


Abb. 6 a, b: IGF-II mRNA-Expression unter Dez., Follikelphase

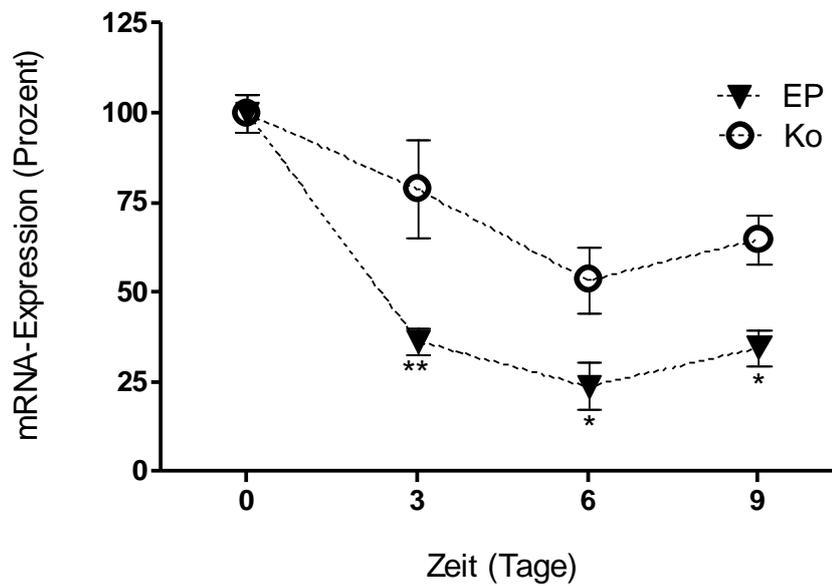
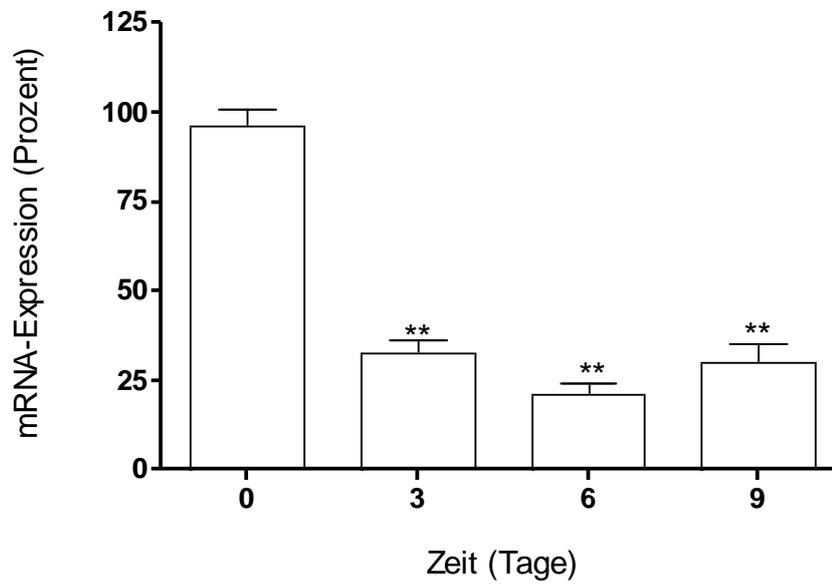


Abb. 7 a, b: IGF-II mRNA-Expression unter Dez., Lutealphase

3.2.3 IGF-I unter Dezidualisierung

3.2.3.1 IGF-I Expression auf mRNA-Ebene

Aufgrund der im vorigen Abschnitt gemachten Beobachtung, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen der Follikel- und der Lutealphase festzustellen war ergab sich für n=7 nachfolgendes Schaubild (siehe Abb. 8).

IGF-I mRNA-Expression gesamt:

| Zeit (Tage) | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|----------------------|-----------------------|
| Tag 0 | 100 \pm 5,8 | - |
| Tag 3 | 5997 \pm 1285 | p<0,01 |
| Tag 6 | 3241 \pm 631,2 | p<0,05 |
| Tag 9 | 409,5 \pm 114,7 | n.s.; p<0,01 zu Tag 3 |

3.2.3.2 IGF-I Sekretion auf Proteinebene

Zur Bestimmung von IGF-I auf Proteinebene (n=5) wurden nur Zellkulturen der Lutealphase verwendet.

Unter der Dezidualisierung zeigte sich auch auf Proteinebene eine signifikante Steigerung der IGF-I Sekretion. Sie stieg dabei an den Tagen 3 und 6 im Vergleich zu Tag 0. Zum Tag 9 hin kam es zu einer Reduktion der Proteinsekretion. Diese war dabei signifikant mit p<0,01 zu den Tagen 3 und 6 reduziert (siehe Abb. 9).

IGF-I Proteinsekretion:

| Zeit (Tage) | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|----------------------|-----------------------------|
| Tag 0 | 100,0 \pm 1,2 | - |
| Tag 3 | 219,9 \pm 25,6 | p<0,05 |
| Tag 6 | 257,2 \pm 53,7 | p<0,01 |
| Tag 9 | 62,9 \pm 8,3 | n.s.; p<0,01 zu Tag 3 und 6 |

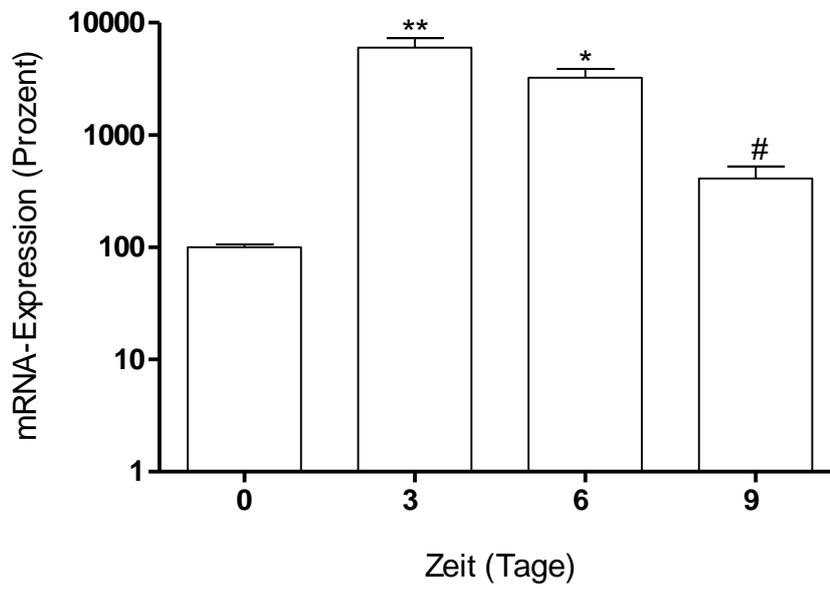


Abb. 8: IGF-I mRNA-Expression unter Dez., gesamt

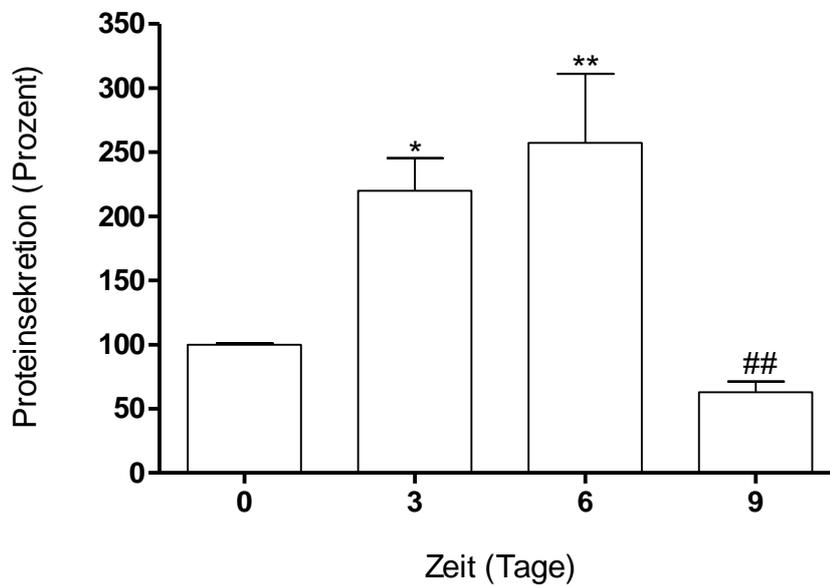


Abb. 9: IGF-I Proteinsekretion unter Dez.

3.2.4 IGF-II unter Dezidualisierung

3.2.4.1 IGF-II Expression auf mRNA-Ebene

Aufgrund der im vorigen Abschnitt gemachten Beobachtung, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen der Follikel- und der Lutealphase festzustellen war ergab sich für n=7 nachfolgendes Schaubild (siehe Abb. 10).

IGF-II mRNA-Expression gesamt:

| Zeit (Tage) | Mittelwert ± SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|------------------|-----------------|
| Tag 0 | 100 ± 5,7 | - |
| Tag 3 | 32,8 ± 2,8 | p<0,01 |
| Tag 6 | 23,5 ± 2,3 | p<0,01 |
| Tag 9 | 32,5 ± 4,1 | p<0,01 |

3.2.4.2 IGF-II Sekretion auf Proteinebene

Zur Bestimmung von IGF-II auf Proteinebene (n=3) wurden ebenfalls nur Zellkulturen der Lutealphase verwendet.

Unter der Dezidualisierung beobachtete man im zeitlichen Verlauf eine stetige Abnahme der Proteinsekretion bei allen drei Zellkulturen. Diese war an den Tagen 3, 6 und 9 der Dezidualisierung im Vergleich zu Tag 0 mit p<0,01 signifikant reduziert. (siehe Abb. 11)

IGF-II Proteinsekretion:

| Zeit (Tage) | Mittelwert ± SEM | p-Wert zu Tag 0 |
|-------------|------------------|-----------------|
| Tag 0 | 100 ± 2,2 | - |
| Tag 3 | 75,8 ± 4,9 | p<0,01 |
| Tag 6 | 46,2 ± 4,5 | p<0,01 |
| Tag 9 | 22,5 ± 1,3 | p<0,01 |

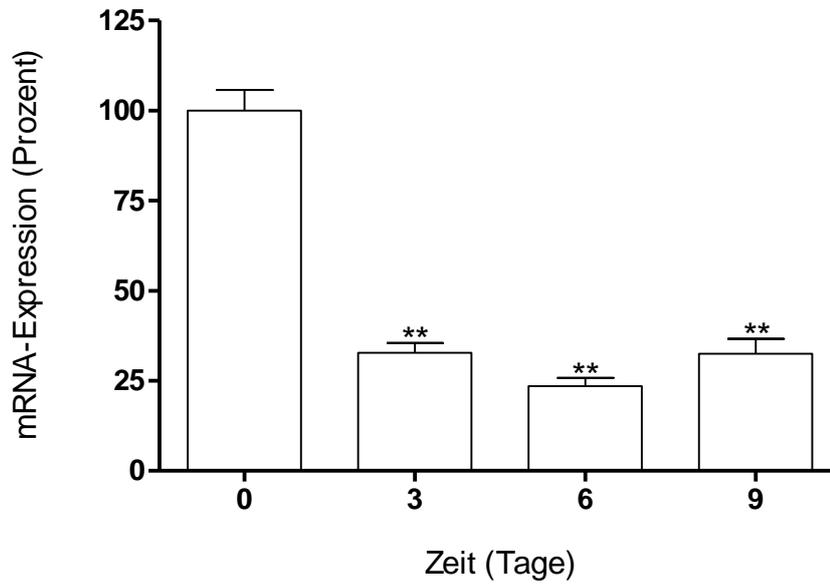


Abb. 10: IGF-II mRNA-Expression unter Dez., gesamt

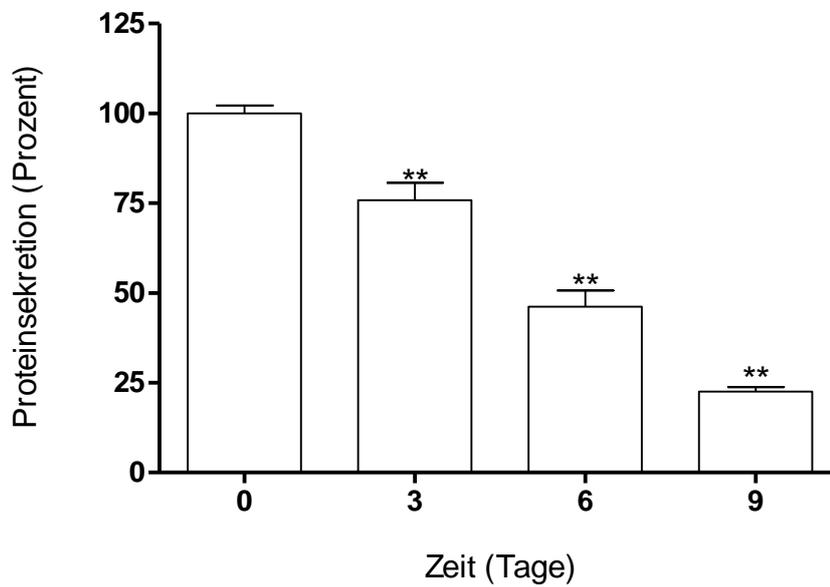


Abb. 11: IGF-II Proteinsekretion unter Dez.

3.3 24 h Hormonentzug am Tag 9 der Dezidualisierung

Hierbei sollte untersucht werden, inwiefern die Ausschüttung von IGF-I und -II des Endometriums während der Dezidualisierung abhängig ist von stetigem Östrogen- und Progesteroneinfluss um ausschließen zu können, dass es zu Beginn der Hormongabe zu einer Induktion des Endometriums kommt wonach im weiteren Verlauf die Bildung der Faktoren unabhängig von einem stetigen Hormoneinfluss stattfindet. Zudem wurde mit diesem Versuch die Situation des Hormonentzugs bei der Menstruation am Zyklusende simuliert.

Hierfür dezidualisierte man die Zellen 9 Tage lang mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol. Am Tag 9 bekam ein Teil der Zellen Zellmedium ohne Hormone während der andere Teil der Zellen für weitere 24 Stunden 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol bekam. Die mRNA-Expression der Zellen die weiterhin Hormone bekamen wurde im Schaubild auf 100 % gesetzt.

3.3.1 IGF-I Expression und Sekretion nach 24 h Hormonentzug

Bei den Messungen der IGF-I mRNA unter 24 h Hormonentzug (n=4) mittels semiquantitativer realtime RT-PCR ergaben sich aufgrund einer sehr schwachen Expression zu hohe C_T -Werte, weshalb keine semiquantitative Beurteilung dieser Messungen aussagekräftig wäre und somit hier keine Berücksichtigung findet.

3.3.2 IGF-II Expression und Sekretion nach 24 h Hormonentzug

Nach 24 stündigem Hormonentzug beobachtete man am Tag 10 einen Anstieg der Expression von IGF-II auf mRNA-Ebene unter Hormonentzug (n=4). Dieser Anstieg ist im Vergleich zur Gruppe unter Hormongabe mit $p < 0,05$ signifikant.

IGF-II mRNA-Expression nach 24 h Hormonentzug:

| Gruppe | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Hormongabe |
|--------------|----------------------|----------------------|
| Hormongabe | 100,0 \pm 6,5 | - |
| Hormonentzug | 179,9 \pm 25,5 | $p < 0,05$ |

Bei der Messung der IGF-II Ausschüttung mittels ELISA auf Proteinebene (n=3) lagen die Ergebnisse der Messungen zu nahe im Bereich der Messgrenze, weshalb eine aussagefähige Verwertung nicht möglich war.

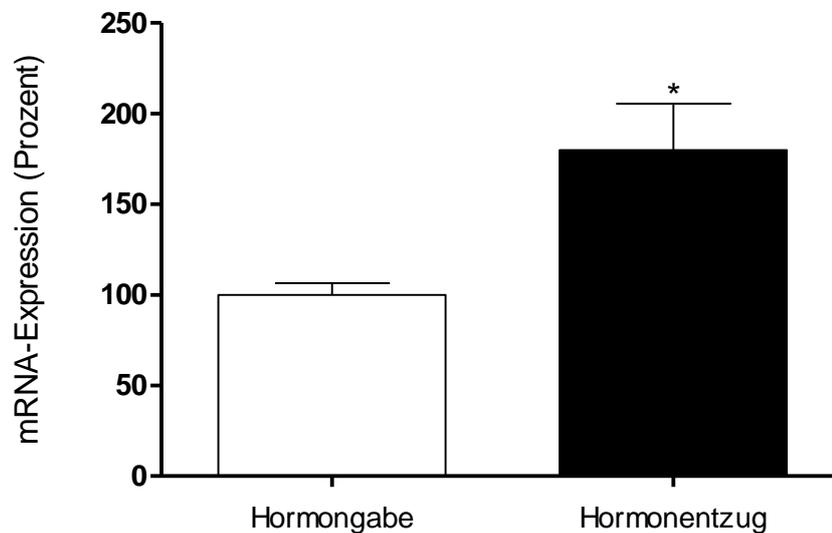


Abb. 10: IGF-II mRNA-Expression nach 24 h Hormonentzug

3.4 Stimulation mit rekombinatem humanem Choriongonadotropin

Es wurde untersucht, ob die Ausschüttung von IGF-I und -II des Endometriums beeinflusst wird durch die Gabe von unterschiedlich hohen Konzentrationen von rekombinatem hCG. Dies wurde an den Tagen 6 und 9 der Dezidualisierung untersucht.

Hierfür dezidualisierte man die Zellen 6 bzw. 9 Tage lang mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol. Am Tag 6 bzw. 9 bekamen die Zellen der Kontrollgruppe für weitere 24 Stunden 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol während die anderen Zellen zusätzlich mit hCG-Konzentrationen von 10 bis 100.000 mU/ml behandelt wurden. Die mRNA-Expression der Kontrollgruppe ohne hCG-Gabe wurde auf 100 % gesetzt.

Mittels MTT-Test wurde die Vitalität der Zellen unter hCG-Gabe kontrolliert (siehe 2.2.8).

3.4.1 IGF-I Expression und Sekretion unter dem Einfluss von hCG

3.4.1.1 24 h hCG am Tag 6 der Dezidualisierung

Da aufgrund der Vorergebnisse zur Untersuchung auf IGF-I Expression unter Dezidualisierung der größte Anstieg der IGF-I Expression am Tag 6 im Vergleich zu Tag 0 zu verzeichnen war, wurde für den Versuch mit hCG auf IGF-I Expression der Tag 6 der Dezidualisierung gewählt.

Die Expression und Sekretion von IGF-I nach 6 Tagen Dezidualisierung (n=3) reduzierte sich dosisabhängig unter hCG-Gabe. Während die verminderte Expression auf mRNA Ebene nicht signifikant erniedrigt war, zeigte sich jedoch auf Proteinebene eine zur Kontrollgruppe signifikante Erniedrigung von IGF-I. Diese war unter den Konzentrationen 1 und 10 IU/ml mit $p < 0,05$ und unter der Konzentration 100 IU/ml mit $p < 0,01$ signifikant.

IGF-I mRNA-Expression nach 24 h hCG am Tag 6:

| hCG-Konzentration | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Kontrolle |
|---------------------|----------------------|---------------------|
| 0 IU/ml (Kontrolle) | 100,0 \pm 8,0 | - |
| 0,01 IU/ml | 86,9 \pm 22,3 | n.s. |
| 0,1 IU/ml | 83,8 \pm 14,7 | n.s. |
| 1 IU/ml | 90,6 \pm 15,9 | n.s. |
| 10 IU/ml | 71,0 \pm 14,3 | n.s. |
| 100 IU/ml | 61,7 \pm 13,5 | n.s. |

IGF-I Proteinsekretion nach 24 h hCG am Tag 6:

| hCG-Konzentration | Mittelwert \pm SEM | p-Wert zu Kontrolle |
|---------------------|----------------------|---------------------|
| 0 IU/ml (Kontrolle) | 100,0 \pm 5,0 | - |
| 0,01 IU/ml | 82,5 \pm 7,4 | n.s. |
| 0,1 IU/ml | 82,5 \pm 6,8 | n.s. |
| 1 IU/ml | 76,7 \pm 5,7 | $p < 0,05$ |
| 10 IU/ml | 78,5 \pm 4,8 | $p < 0,05$ |
| 100 IU/ml | 71,1 \pm 6,2 | $p < 0,01$ |

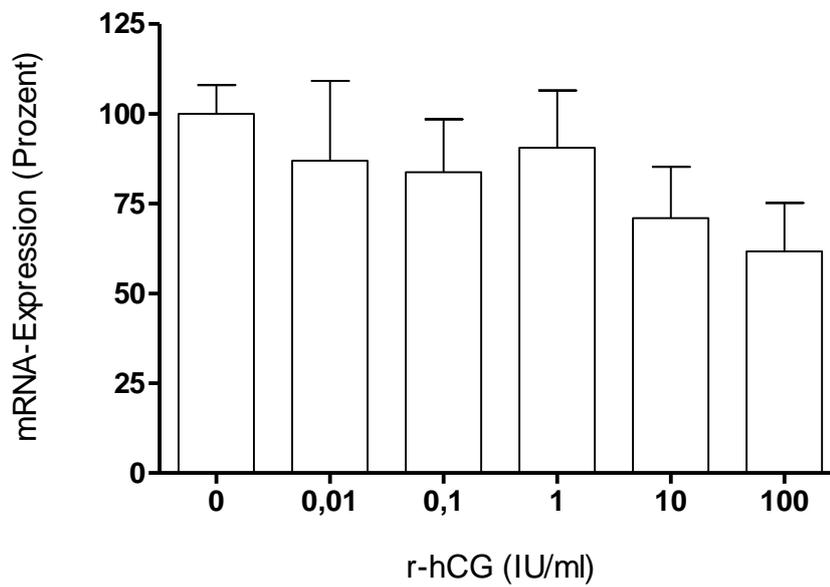


Abb. 11: IGF-I mRNA-Expression nach 24 h hCG Tag 6

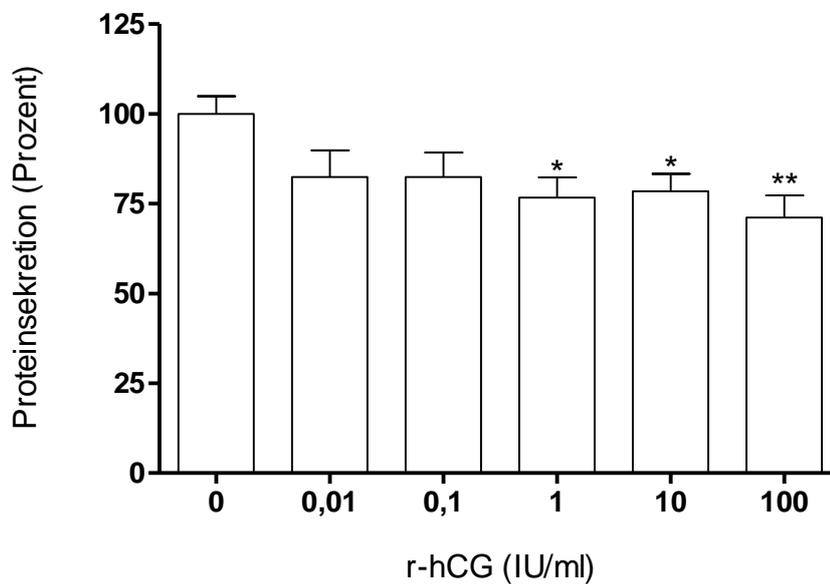


Abb. 12: IGF-I Proteinsekretion nach 24 h hCG Tag 6

3.4.2 IGF-II Expression und Sekretion unter dem Einfluss von hCG

3.4.2.1 24 h hCG am Tag 9 der Dezidualisierung

Man beobachtete sowohl auf mRNA-Ebene (n=5) als auch auf Proteinebene (n=2) keine signifikante Hoch- oder Runterregulation der IGF-II Expression bei unterschiedlich hohen Konzentrationen an hCG.

IGF-II mRNA-Expression nach 24 h hCG am Tag 9:

| hCG-Konzentration | Mittelwert ± SEM | p-Wert zu Kontrolle |
|---------------------|------------------|---------------------|
| 0 IU/ml (Kontrolle) | 100,0 ± 5,1 | - |
| 0,01 IU/ml | 77,9 ± 5,9 | n.s. |
| 0,1 IU/ml | 88,5 ± 6,4 | n.s. |
| 1 IU/ml | 92,8 ± 11,3 | n.s. |
| 10 IU/ml | 89,3 ± 8,1 | n.s. |
| 100 IU/ml | 108,6 ± 11,1 | n.s. |

IGF-II Proteinsekretion nach 24 h hCG am Tag 9:

| hCG-Konzentration | Mittelwert ± SEM | p-Wert zu Kontrolle |
|---------------------|------------------|---------------------|
| 0 IU/ml (Kontrolle) | 100,0 ± 3,8 | - |
| 0,01 IU/ml | 112,1 ± 16,6 | n.s. |
| 0,1 IU/ml | 102,3 ± 14,5 | n.s. |
| 1 IU/ml | 100,3 ± 7,8 | n.s. |
| 10 IU/ml | 90,9 ± 7,5 | n.s. |
| 100 IU/ml | 91,1 ± 7,2 | n.s. |

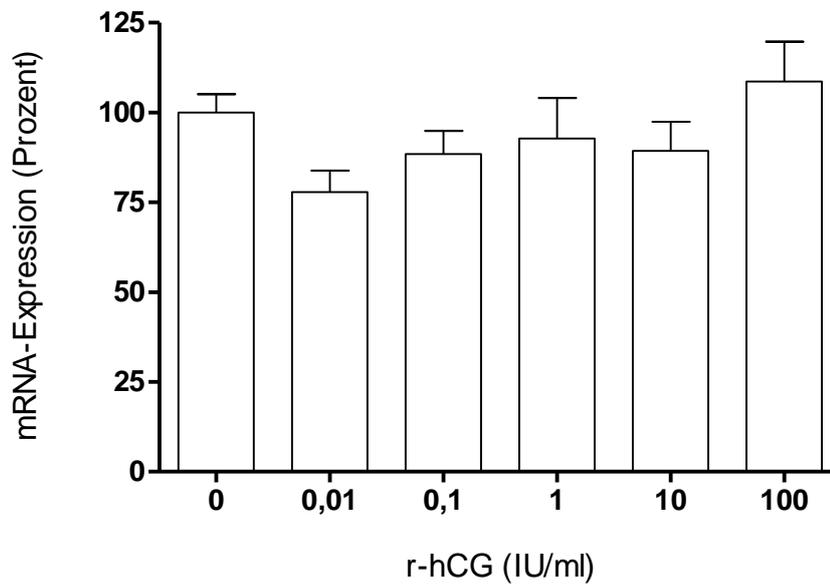


Abb. 15: IGF-II mRNA-Expression nach 24 h hCG Tag 9

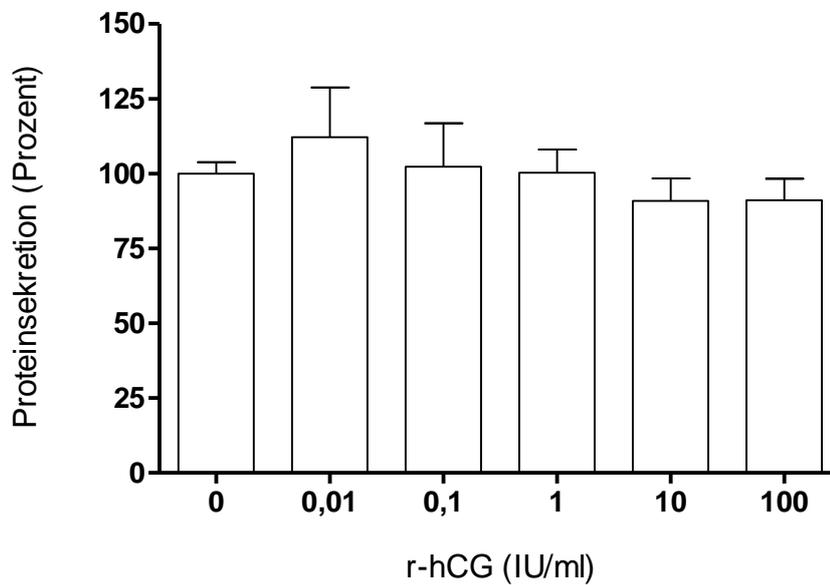


Abb. 16: IGF-II Proteinsekretion nach 24 h hCG Tag 9

4 Diskussion

Für die erfolgreiche Implantation eines Embryos ist die Rezeptivität des Endometriums von entscheidender Bedeutung. Während die Implantation selbst ein Prozess ist, der das Zusammenspiel von Blastozyste und Endometrium erfordert, so ist die Vorbereitung des Endometriums während des Menstruationszyklus unter dem Einfluss von Steroidhormonen eine maternale Aufgabe. Die östrogendominierte Proliferationsphase ist hierbei durch zahlreiche Mitosen der epithelialen und stromalen Endometriumzellen gekennzeichnet, während in der progesterondominierten Sekretionsphase die Differenzierung des Endometriums durch vermehrte glanduläre Sekretion und Dezidualisierung des endometrialen Stromas, als auch durch Mitosen von Stromazellen und Proliferation von Spiralarterien stattfindet (61).

Die Vorgänge im Endometrium sind weiterhin nicht vollständig geklärt, neben Östrogen und Progesteron scheinen auch eine Vielzahl anderer Faktoren an der Rezeptivität des Endometriums beteiligt zu sein. Für das Zustandekommen einer Schwangerschaft ist die erfolgreiche Implantation des Embryos mit entscheidend. Die weitere Aufklärung ist sowohl von physiologischem Interesse als auch im Hinblick auf mögliche Therapiemaßnahmen beispielsweise in der Reproduktionsmedizin interessant. So könnten mit einem besseren Verständnis der Vorgänge in Zukunft Möglichkeiten gefunden werden die Implantation gezielt zu beeinflussen. Dies könnte zu höheren erfolgreich ausgetragenen Schwangerschaften führen, gerade auch im Hinblick auf Frauen mit wiederholtem Versagen der Implantation (repeated implantation failure, RIF) unter Kinderwunsch-Behandlung. Es wird angenommen, dass hierbei unter anderem verschiedene krankhafte Veränderungen des Uterus, wie ein gering aufgebautes Endometrium oder veränderte Expression von Faktoren zu einer verminderten Rezeptivität des Endometriums führen (55).

Auch im Hinblick auf schwangerschaftsassozierte Erkrankungen sind weitergehende Kenntnisse über die molekularen Mechanismen während der Implantation von Bedeutung. So scheinen Erkrankungen wie Präeklampsie oder Frühgeburtlichkeit ihren Ursprung zu Beginn der Schwangerschaft zu haben, etwa in anormaler Implantation oder Plazentaentwicklung. Ein besseres

Verständnis der Vorgänge bei anormaler Implantation und Plazentation könnte die Behandlungsmöglichkeiten von Erkrankungen verbessern, die damit einhergehen, wie beispielsweise Infertilität, wiederholte Fehlgeburten oder Präeklampsie (60).

Die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren IGF-I und -II spielen in beiden Zyklusphasen für die Proliferation und Differenzierung des Endometriums eine entscheidende Rolle.

Vermittelt über die beiden Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 entfalten sie beide parakrine und autokrine Wirkungen auf Epithel- und Stromazellen (96). Frühere Studien beschreiben eine Dominanz von IGF-I in der östrogendominierten Proliferationsphase und eine starke Expression von IGF-II in der progesterondominierten Sekretionsphase (5,24,96). Im Uterus der Ratte führte Östrogen zu einer vermehrten IGF-I Expression (58). Zudem wird vermutet, dass die Effekte von Östrogen auf die endometriale Proliferation IGF-I vermittelt ist (57). Giudice et al zeigten zudem die Expression von IGF-II mRNA in Dezidua der Frühschwangerschaft (24).

Demzufolge wird IGF-I eine vorwiegend proliferative Funktion zugesprochen, während IGF-II eher ein Differenzierungsfaktor zu sein scheint (96).

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von IGF-I und -II während der Dezidualisierung in humanen endometrialen Stromazellen in vitro und einen möglichen Einfluss von hCG auf diese Faktoren zu untersuchen.

4.1 Die Rolle der Zyklusphase aus der die Zellen entnommen wurden

Zunächst wurde die mRNA Expression von Proben aus Luteal- und Follikelphase miteinander verglichen.

Die IGF-I mRNA-Expression der Proben unter 17β -Östradiol- und Progesterongabe und der Kontrollproben verhielten sich in Kulturen der Follikel- und Lutealphase nahezu gleich. So zeigte sich ein starker signifikanter Anstieg zu Beginn am Tag 3 und im weiteren Verlauf eine langsamere stetige Abnahme der IGF-I mRNA-Expression bis Tag 9 unter Dezidualisierung. Bei den Kontrollproben kam es zu keiner Veränderung.

Bei der Beobachtung von IGF-II kam es sowohl bei den Zellen aus der Follikelphase als auch aus der Lutealphase zu einer signifikanten Abnahme der IGF-II Expression an den Tagen 3, 6 und 9. Es zeigte sich bei den Kontrollgruppen der Follikel- und Lutealphase ebenfalls eine signifikante Abnahme der Expression von IGF-II auf mRNA-Ebene an den Tagen 6 und 9.

Unter Dezidualisierung kam es jedoch zu einer stärkeren Abnahme, hierbei war die IGF-II mRNA-Expression an den Tagen 3 und 6 bzw. an allen Tagen ebenfalls zur Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Aufgrund des gleichen Verhaltens der Zellkulturen unter Dezidualisierung *in vitro* scheint nach Kultivierung der endometrialen Stromazellen über mehrere Tage in steroidfreiem Medium, die Zyklusphase aus der die Zellen entnommen wurden keinen entscheidenden Einfluss zu haben. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Irwin et al.. Hierbei wurden Zellen aus proliferativem und sekretorischem Endometrium zunächst ohne Hormonzugabe zur Konfluenz gebracht. Unter Progesteron- und Östrogengabe kam es anschließend durchweg zu einem Anstieg des Dezidualisierungsmarkers Prolaktin und einer Proliferation der Zellen unabhängig der Zyklusphase aus der die Zellen stammten (36).

Mit diesen Ergebnissen wurde im weiteren Verlauf nicht explizit zwischen Zellen der Luteal- oder Follikelphase unterschieden und angenommen, dass die Zyklusphase auch auf die weiteren Versuchsergebnisse keinen Einfluss haben wird.

4.2 IGF-I und -II unter Dezidualisierung von humanen ESC

Zur Untersuchung des Verhaltens von IGF-I und IGF-II wurden die humanen endometrialen Stromazellen 9 Tage lang mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol behandelt. IGF-I und -II wurden auf mRNA- und Proteinebene an den Tagen 0, 3, 6 und 9 bestimmt.

Es existieren bisher wenig Daten zum Verhalten von IGF-I und IGF-II während der Dezidualisierung. In der hier vorliegenden Studie zeigte sich im Dezidualisierungsverlauf eine rasche und ausgeprägte Steigerung der IGF-I mRNA und der Proteine an den Tagen 3 und 6. Im Vergleich zu Tag 3 sank die Expression und Sekretion von IGF-I zum Tag 9 hin jedoch wieder signifikant ab. Demgegenüber kam es unter Dezidualisierung zu einer andauernden signifikanten Reduktion der IGF-II mRNA-Expression und Proteinsekretion an allen Tagen. In den nicht dezidualisierten Zellen der Kontrollgruppen zeigte sich während der 9 Tage keine signifikante Veränderung von IGF-I. Für IGF-II kam es auch bei den Zellen der Kontrollgruppe zu einer Abnahme. Die Abnahme unter Dezidualisierung war jedoch viel ausgeprägter und signifikant zu den Messungen der Kontrollgruppen erniedrigt.

Die Ergebnisse der mRNA-Expression der hier vorliegenden Studie passen zu früheren Ergebnissen von Gao et al.. Diese untersuchten die IGF-I und -II Expression von humanen endometrialen Stromazellen nach Inkubation mit Medroxyprogesteronacetat (MPA), Östradiol oder MPA + Östradiol sowie unter Langzeitzellkultur mit Progestin und dem Antiprogestin RU486 (22). Hierbei kam es zu einem 2-10 fachen Anstieg von IGF-I unter MPA an den Tagen 1-4 nach Inkubation. Die Expression von IGF-II hingegen war nach 4 Tagen Inkubation mit MPA auf 60 % gefallen.

Unter Langzeitzellkultur fiel die hohe IGF-I Konzentration in dezidualisierten Zellen um >90 % ab. Bei IGF-II hingegen kam es nach Reduktion zu Beginn zu einem Anstieg in der Differenzierungsphase (22). Sowohl Giudice et al. als auch Rutanen et al. fanden eine niedrige bzw. supprimierte Expression von IGF-I in der frühen Schwangerschaftsdezidua. IGF-II hingegen konnte hierin reichlich nachgewiesen werden und nur gering in der proliferierenden oder sekretorischen Phase, im Gegensatz zu IGF-I (24,71). Unter mindestens 6-

DISKUSSION

monatiger Gabe von 20 µg pro 24 h Levonorgestrel in vivo beobachteten Rutanen et al. ebenfalls eine Erniedrigung von IGF-I und eine Stimulation der IGF-II Expression, vergleichbar mit den Langzeitzellkulturergebnissen von Gao et al. (22,71). Die hier vorgestellten Ergebnisse entsprechen jedoch in Aufbau und Zeitverlauf den Versuchen unter MPA.

Unter der Dezidualisierung mit 1 µM Progesteron und 30 nM 17β-Östradiol zeigte sich bei der hier vorliegenden Arbeit zum Tag 9 hin ebenfalls eine Abnahme der IGF-I mRNA und der IGF-I Proteine. Der mit zunehmender Dezidualisierung der Stromazellen einhergehende Abfall der IGF-I Expression passt zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine geringe Expression von IGF-I in der mittleren bis späten Sekretionsphase beschreiben (24,96).

In Studien mit Ratten kam es unter Dezidualisierung zu einer stetigen Abnahme der IGF-I mRNA im Uterus, hierbei war die IGF-I-Expression besonders im letzten Teil der Dezidualisierung vermindert (10). Ein Anstieg der IGF-I mRNA Expression zu Beginn der Dezidualisierung, wie hier beobachtet, ist dort nicht beschrieben.

Das für diese Arbeit angewandte Dezidualisierungsmodell mit 1 µM Progesteron und 30 nM 17β-Östradiol über den Zeitraum von 9 Tagen scheint ein adäquates in vitro Modell für die in vivo vorherrschende Situation zu sein. So zeigten Licht et al. mittels intrauteriner Mikrodialyse einen Anstieg von IGFBP-1 mit Beginn des 10. Tages nach dem LH-Peak (48). Fluhr et al. konnten mit dem gleichen Dezidualisierungsmodell, das auch bei der hier vorliegenden Arbeit angewendet wurde einen Anstieg von IGFBP-1 mRNA und Proteinen mit Beginn Tag 9 verzeichnen (20). Somit kann angenommen werden, dass die in vitro Situation vergleichbar ist zur Situation in vivo.

Unter dieser Annahme fällt der Anstieg der Bildung von IGF-I in den Beginn des sogenannten Implantationsfensters, d.h. in den Zeitraum 6 bis 10 Tage nach dem LH-Peak (91). Demnach könnte IGF-I unter Umständen eine Rolle in den letzten Vorbereitungen des Endometriums auf den Embryo spielen.

Die Abnahme von IGF-I unter dem anhaltenden Einfluss von Progesteron könnte während der frühen Schwangerschaft von Bedeutung sein. Es konnte

bereits gezeigt werden, dass IGF-Rezeptoren in humanen endometrialen Stromazellen durch Progesteron herunterreguliert werden (86), zudem ist bekannt, dass IGFBP-1 IGF-I bindet und somit dessen Verfügbarkeit zusätzlich erniedrigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IGF-I ein zweiphasiges Expressionsmuster zu haben scheint. Während der Proliferationsphase wirkt IGF-I als Mediator von Östrogen und fördert eine ausreichende Proliferation des Endometriums (24,26,34,35). Ein kurzzeitiger Anstieg von IGF-I in der frühen sekretorischen Phase könnte notwendig sein, um zur Rezeptivität des Endometriums beizutragen. Es wäre möglich, dass im weiteren Verlauf IGF-I nicht mehr benötigt wird und deshalb durch maternales Progesteron herunterreguliert wird. Hierbei könnte embryonales hCG nach Konzeption zusätzlich beitragen (siehe 4.4).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Expression und Sekretion von IGF-II an den Tagen 3, 6 und 9 der Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen *in vitro* im Vergleich zu Tag 0 signifikant reduziert war. Dies stimmt mit Ergebnissen von Gao et al. überein, die unter MPA eine Verminderung der IGF-II mRNA beobachteten (22).

Für die anhaltende Supprimierung von IGF-II scheint ein kontinuierliches Vorhandensein von Progesteron benötigt zu werden (siehe 4.3).

Im ersten Drittel der Schwangerschaft beenden die Stromazellen der Dezidua ihre IGF-II Expression. Dafür kommt es jedoch zu einer starken Expression von IGF-II durch den Trophoblasten (29). Das in der Frühschwangerschaft vom Trophoblasten gebildete IGF-II könnte demnach an der fetomaternalen Grenzfläche wichtiger sein, als vom Endometrium gebildetes IGF-II (29,38).

Bestärkt wird diese Vermutung durch die beobachteten Auswirkungen von vom Trophoblasten gebildetem IGF-II auf die Rezeptivität des Endometriums und der Invasion des Trophoblasten (29,37).

Herr et al. konnten beispielsweise zeigen, dass IGF-II zur Angiogenese führt und die vaskuläre Anpassung des Uterus an die Schwangerschaft bewirkt (30).

DISKUSSION

Irwin et al. nehmen an, dass lokal gebildetes IGF-II die sekretorische Aktivität von dezidualisierten Stromazellen stimuliert, während von der Blastozyste stammendes IGF-II lokal begrenzte hohe Konzentrationen von IGF-II auf Implantationsseite bildet. Dadurch kommt es zu supprimierter IGFBP-1 Sekretion und folglich zu erhöhter Verfügbarkeit von IGFs, welche die Differenzierung und Funktion des Trophoblasten fördern (34). Die Bedeutung von IGF-II für das embryonale Wachstum konnte in Versuchen mit Mäusen mit inaktiviertem IGF-II Gen gezeigt werden. Hierbei kam es durch die Mutation in der embryonalen Phase zur Wachstumsretardierung (12).

Es lässt sich festhalten, dass IGF-II eine Rolle in der Differenzierung des sekretorischen Endometriums zu spielen scheint (25). Die Situation ändert sich jedoch wenn es zu einer Implantation kommt und das Stadium der Frühschwangerschaft erreicht wird. Hier könnten hohe Konzentrationen an Progesteron die Bildung von endometrialem IGF-II unterbinden und somit das vom Trophoblasten gebildete IGF-II im embryomaternalen Dialog in den Vordergrund treten.

4.3 IGF-I und -II nach 24 h Hormonentzug in dezidualisierten ESC

Unter Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen in vitro zeigte sich ein starker Anstieg von IGF-I am Tag 3 und im weiteren Verlauf eine Abnahme von IGF-I bis Tag 9 unter Dezidualisierung, sowie für IGF-II an allen Tagen eine signifikant reduzierte Expression und Sekretion im Vergleich zu Tag 0.

Um eine mögliche Abhängigkeit der IGF-I und IGF-II Ausschüttung des Endometriums während der Dezidualisierung von stetigem Östradiol- und Progesteroneinfluss zu untersuchen, wurde der Einfluss von 24 stündigem Progesteron- und 17 β -Östradiolentzug auf humane endometriale Stromazellen nach 9 Tagen Dezidualisierung betrachtet. Zudem wurde mit diesem Versuch der Hormonentzug bei der Menstruation am Zyklusende simuliert.

Es konnten lediglich Daten für IGF-II gewonnen werden. Hierbei kam es zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von IGF-II nach 24 Stunden Progesteron- und 17 β -Östradiolentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe, die weiterhin Steroidhormone erhalten hatte. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Supprimierung von IGF-II unter Dezidualisierung demnach steroidabhängig verläuft und reversibel ist.

Gao et al. konnten unter Behandlung von dezidualisierten endometrialen Stromazellen mit dem Antiprogestin Mifepristone (RU486) ebenfalls einen Anstieg von IGF-II im Endometrium beobachten (22).

4.4 IGF-I und -II Expression und Proteinsekretion in ESC unter hCG

Eines der ersten bekannten hormonellen Signale des Embryos ist das hCG. Seine Sekretion beginnt spätestens am Tag 7 der Befruchtung im Blastozystenstadium (53). Als sogenanntes Schwangerschaftshormon unterhält es endokrin das progesteronbildende Corpus luteum, welches hiermit die Schwangerschaft erhält. Zusätzlich reguliert es die Produktion verschiedener an Differenzierung und Proliferation des Endometriums sowie der Implantation des Embryos beteiligten Substanzen (50).

Humanes Choriongonadotropin wird in der Reproduktionsmedizin als Ovulationsauslöser und neben Progesteron in der Lutealphasenunterstützung eingesetzt. Es scheint sich abzuzeichnen, dass die Behandlung mit hCG die Implantationsraten menschlicher Embryonen erhöht. Neuere Studien zeigen, dass die Implantationsraten bei Eizellspende dann signifikant ansteigen, wenn vor dem Embryotransfer hCG gegeben wird. Die Gabe von hCG scheint durch direkte Effekte am Endometrium die Implantationsrate zu verbessern (88).

Daten der Arbeitsgruppe Licht et al. bestätigen, dass hCG einen direkten, die Implantation fördernden Effekt auf das Endometrium zu haben scheint (50). So konnte gezeigt werden, dass hCG lokale Parameter verändert, die die Angiogenese (VEGF), die Ausreifung des Endometriums (IGFBP-1), die Implantation selbst (LIF, M-CSF) und die Plastizität des Endometriums (MMPs) beeinflussen (47). Andere Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls regulierende Effekte von hCG auf Zytokine, angiogenetische Wachstumsfaktoren, Cyclooxygenaseexpression, sowie auf Faktoren die bei der Apoptose eine Rolle spielen und auf Faktoren, die auf die Dezidualisierung des Endometriums einwirken (16,17,84).

In der hier vorliegenden Studie wurde der Einfluss von hCG auf die Expression von IGF-I und -II in endometrialen Stromazellen in vitro untersucht. Bisher existieren keine Daten zu einem möglichen Einfluss von hCG auf diese beiden Faktoren.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung von IGF-II unter hCG-Gabe in dezidualisierten endometrialen Stromazellen. Dies deutet darauf hin, dass die

Regulierung von endometrialem IGF-II unabhängig von dem frühen embryonalen Signal hCG zu verlaufen scheint.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass hCG auf die Bildung von IGF-I in dezidualisierten endometrialen Stromazellen inhibierend wirken könnte. Bei den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich im Mittel auf Proteinebene eine Inhibierung von IGF-I durch Gabe von ansteigenden Konzentrationen an hCG. Erwartet wurde ebenfalls eine Inhibierung auf mRNA-Ebene, die sich bei den Untersuchungen der mRNA andeutete, sich jedoch im Mittel noch nicht bestätigen ließ. Eine eingehendere Betrachtung von IGF-I unter hCG-Gabe wird noch nötig sein.

Eine mögliche Inhibierung von IGF-I durch hCG würde zu Ergebnissen passen, die einen Einfluss von embryonalem hCG auf die endometriale Differenzierung und die Rezeptivität des Endometriums beschreiben (16,20,49,50,88).

Unter der Annahme einer inhibierenden Wirkung könnte man die Vermutung anstellen, dass der implantierende Embryo auf diese Weise die Möglichkeit hat IGF-I weiter zu unterdrücken, welches in der frühen Phase der Schwangerschaft unter Umständen nicht mehr benötigt wird oder sogar störend wirken könnte.

Jüngste Ergebnisse beschreiben einen hemmenden Einfluss von „Trophoblasten konditioniertem“ Medium auf IGF-I in dezidualisierten endometrialen Stromazellen in vitro (31). IGFBP-1 mag ebenfalls zur Abnahme von IGF-I beitragen, da es IGF-I direkt inhibiert (21,67). Hierbei sollte erwähnt werden, dass IGFBP-1 vermehrt während der Dezidualisierung ausgeschüttet wird und auch in der frühen Dezidua stark exprimiert wird (25,26).

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von IGF-I und -II während der Dezidualisierung in humanen endometrialen Stromazellen in vitro und einen möglichen Einfluss von hCG auf diese Faktoren zu untersuchen. Hierfür wurden Primärzellkulturen von endometrialen Stromazellen verwendet. Die Proben stammten aus Hysterektomien, die prämenopausale Frauen aufgrund gutartiger Erkrankungen durchführen ließen. Die Zellkulturen wurden mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol, sowie rekombinantem hCG inkubiert. Die Messungen von IGF-I und -II mRNA und Proteinen wurden mittels semiquantitativer realtime Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion und ELISA durchgeführt.

Es zeigte sich ein gegenläufiges Verhalten der beiden Wachstumsfaktoren IGF-I und -II während der Dezidualisierung. Während bei IGF-I eine ausgeprägte aber zeitlich begrenzte Steigerung und anschließende Abnahme der Expression und Sekretion unter Dezidualisierung zu beobachten war, wurde IGF-II im gesamten Zeitverlauf supprimiert. Dies unterstützt Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, die den beiden IGFs unterschiedliche Funktionen im Endometrium zuordnen (24,96) und die Auffassung, dass IGF-I und -II auch während der Implantation unterschiedliche Rollen spielen.

Unter Dezidualisierung verhielten sich die Zellkulturen aus Follikel- und Lutealphase nahezu gleich, somit scheint die Zyklusphase aus der die Zellen stammen keinen Einfluss auf die Bildung von IGF-I und -II unter Dezidualisierung zu haben. Die Supprimierung von IGF-II scheint abhängig zu sein von konstanter Progesteron und 17 β -Östradiolgabe. So zeigte sich nach 24 h Hormonentzug ein signifikanter Anstieg der IGF-II mRNA. Demnach kann angenommen werden, dass die Supprimierung hormonabhängig verläuft und reversibel ist.

Die Ergebnisse unter hCG-Gabe deuten darauf hin, dass hCG auf die Bildung von IGF-I in dezidualisierten endometrialen Stromazellen inhibierend wirken könnte. Es zeigte sich auf Proteinebene eine Inhibierung von IGF-I durch Gabe von ansteigenden Konzentrationen an hCG. Erwartet wurde ebenfalls eine Inhibierung auf mRNA-Ebene, die sich bei den Untersuchungen der mRNA

andeutete, sich jedoch im Mittel noch nicht bestätigen ließ. Es werden weitere Untersuchungen von IGF-I unter hCG-Gabe benötigt werden um hierüber genauer Aufschluss zu erhalten. Ein Einfluss von embryonalem hCG auf die endometriale Differenzierung und die Rezeptivität des Endometriums wurde bereits beschreiben (16,20,49,50,88).

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung von IGF-II unter hCG-Gabe in dezidualisierten endometrialen Stromazellen. Dies deutet darauf hin, dass die Regulierung von endometrialem IGF-II unabhängig von dem frühen embryonalen Signal hCG zu verlaufen scheint.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass IGF-I ein zweiphasiges Expressionsmuster zu haben scheint. Während der Proliferationsphase wirkt IGF-I als Mediator von Östrogen und fördert eine ausreichende Proliferation des Endometriums (24,26,34,35). Ein kurzzeitiger Anstieg von IGF-I in der frühen sekretorischen Phase könnte notwendig sein, um zur Rezeptivität des Endometriums beizutragen. IGF-I könnte dann im weiteren Verlauf nicht mehr benötigt werden und deshalb durch maternales Progesteron herunterreguliert werden. Hierzu könnte embryonales hCG nach Konzeption zusätzlich beitragen. IGF-II hingegen scheint eine Rolle in der Differenzierung des sekretorischen Endometriums zu spielen (25). Kommt es jedoch zur Implantation und wird das Stadium der Frühschwangerschaft erreicht könnten hohe Konzentrationen an Progesteron die Bildung von endometrialem IGF-II unterbinden und somit das vom Trophoblasten gebildete IGF-II im embryomaternalen Dialog in den Vordergrund treten.

Literaturverzeichnis

1. Beier, H. M., 1998
Entwicklung und Differenzierung des Embryos: Von der Fertilisation zur Implantation.
Der Gynäkologe; 31: 307-315
2. Beier-Hellwig, K., Sterzik, K., Beier, H. M., 1998
Molekulare und zellbiologische Aspekte der endometrialen Rezeptivität und ihre Diagnostik.
Der Gynäkologe; 31: 325-338
3. Bell, S. C., Jackson, J. A., Ashmore, J., Zhu, H. H., Tseng, L., 1991
Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 synthesis and secretion by progestin and relaxin in long term cultures of human endometrial stromal cells.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 72: 1014-1024
4. Bischof, P., Campana, A., 2000
Molecular mediators of implantation.
Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.; 14: 801-814
5. Boehm, K. D., Daimon, M., Gorodeski, I. G., Sheean, L. A., Utian, W. H., Ilan, J., 1990
Expression of the insulin-like and platelet-derived growth factor genes in human uterine tissues.
Mol. Reprod. Dev.; 27: 93-101
6. Brar, A. K., Frank, G. R., Kessler, C. A., Cedars, M. I., Handwerger, S., 1997
Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP.
Endocrine.; 6: 301-307
7. Brosens, J. J., Hayashi, N., White, J. O., 1999
Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells.
Endocrinology; 140: 4809-4820
8. Cohick, W. S., Clemmons, D. R., 1993
The insulin-like growth factors.
Annu. Rev. Physiol; 55: 131-153
9. Collett-Solberg, P. F., Cohen, P., 1996
The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action.
Endocrinol. Metab Clin. North Am.; 25: 591-614

10. Croze, F., Kennedy, T. G., Schroedter, I. C., Friesen, H. G.,
Murphy, L. J., 1990
Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth
factor-binding protein-1 in the rat uterus during decidualization.
Endocrinology; 127: 1995-2000
11. Curry, T. E., Jr., Osteen, K. G., 2003
The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and
impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle.
Endocr. Rev.; 24: 428-465
12. DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., Robertson, E. J., 1990
A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an
insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting.
Nature; 345: 78-80
13. Diedrich, K., 2000
Gynäkologie und Geburtshilfe.
Springer Verlag
14. Dietl, J., 2001
Implantation aus molekularer Sicht.
Der Gynäkologe; 34: 485-493
15. Dunn, C. L., Kelly, R. W., Critchley, H. O., 2003
Decidualization of the human endometrial stromal cell: an
enigmatic transformation.
Reprod. Biomed. Online.; 7: 151-161
16. Fazleabas, A. T., Donnelly, K. M., Srinivasan, S., Fortman, J. D.,
Miller, J. B., 1999
Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by
chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A; 96: 2543-2548
17. Filicori, M., Fazleabas, A. T., Huhtaniemi, I., Licht, P., Rao, C.,
Tesarik, J., Zygmont, M., 2005
Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive
system interactions and potential in the management of infertility.
Fertil. Steril.; 84: 275-284
18. Filson, A. J., Louvi, A., Efstratiadis, A., Robertson, E. J., 1993
Rescue of the T-associated maternal effect in mice carrying null
mutations in *Igf-2* and *Igf2r*, two reciprocally imprinted genes.
Development; 118: 731-736

19. Fluhr, H., Bischof-Islami, D., Krenzer, S., Licht, P., Bischof, P., Zygmunt, M., 2008
Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells.
Fertil. Steril.; angenommen-im Druck
20. Fluhr, H., Krenzer, S., Deperschmidt, M., Zwirner, M., Wallwiener, D., Licht, P., 2006
Human chorionic gonadotropin inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells.
Fertil. Steril.; 86: 236-238
21. Frost, R. A., Mazella, J., Tseng, L., 1993
Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits the mitogenic effect of insulin-like growth factors and progestins in human endometrial stromal cells.
Biol. Reprod.; 49: 104-111
22. Gao, J. G., Zhu, H. H., Fan, J., Mazella, J., Tseng, L., 1995
Progestin and antiprogestin differentially regulate the expression of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells.
Biol. Reprod.; 53: 355-360
23. Giudice, L. C., Dsupin, B. A., Irwin, J. C., 1992
Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 75: 1235-1241
24. Giudice, L. C., Dsupin, B. A., Jin, I. H., Vu, T. H., Hoffman, A. R., 1993
Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 76: 1115-1122
25. Giudice, L. C., Irwin, J. C., 1999
Roles of the insulinlike growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface.
Semin. Reprod. Endocrinol.; 17: 13-21
26. Giudice, L. C., Mark, S. P., Irwin, J. C., 1998
Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface.
J. Reprod. Immunol.; 39: 133-148

27. Giudice, L. C., Milkowski, D. A., Lamson, G., Rosenfeld, R. G., Irwin, J. C., 1991
Insulin-like growth factor binding proteins in human endometrium: steroid-dependent messenger ribonucleic acid expression and protein synthesis.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 72: 779-787
28. Han, S. W., Lei, Z. M., Rao, C. V., 1999
Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua.
Mol. Cell Endocrinol.; 147: 7-16
29. Han, V. K., Bassett, N., Walton, J., Challis, J. R., 1996
The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 81: 2680-2693
30. Herr, F., Liang, O. D., Herrero, J., Lang, U., Preissner, K. T., Han, V. K., Zygmont, M., 2003
Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 88: 4811-4817
31. Hess, A. P., Hamilton, A. E., Talbi, S., Dosiou, C., Nyegaard, M., Nayak, N., Genbecev-Krtolica, O., Mavrogianis, P., Ferrer, K., Kruessel, J., Fazleabas, A. T., Fisher, S. J., Giudice, L. C., 2007
Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators.
Biol. Reprod.; 76: 102-117
32. Hurskainen, T., Hoyhtya, M., Tuuttila, A., Oikarinen, A., Autio-Harminen, H., 1996
mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization.
J. Histochem. Cytochem.; 44: 1379-1388
33. Irving, J. A., Lala, P. K., 1995
Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1.
Exp. Cell Res.; 217: 419-427

LITERATURVERZEICHNIS

34. Irwin, J. C., de las, F. L., Dsupin, B. A., Giudice, L. C., 1993
Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion.
Regul. Pept.; 48: 165-177
35. Irwin, J. C., de las, F. L., Giudice, L. C., 1994
Growth factors and decidualization in vitro.
Ann. N. Y. Acad. Sci.; 734: 7-18
36. Irwin, J. C., Kirk, D., King, R. J., Quigley, M. M., Gwatkin, R. B., 1989
Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization.
Fertil. Steril.; 52: 761-768
37. Irwin, J. C., Suen, L. F., Faessen, G. H., Popovici, R. M., Giudice, L. C., 2001
Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua:trophoblast interface during human implantation.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 86: 2060-2064
38. Irwin, J. C., Suen, L. F., Martina, N. A., Mark, S. P., Giudice, L. C., 1999
Role of the IGF system in trophoblast invasion and pre-eclampsia.
Hum. Reprod.; 14 Suppl 2: 90-96
39. Irwin, J. C., Utian, W. H., Eckert, R. L., 1991
Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells.
Endocrinology; 129: 2385-2392
40. Jones, J. I., Clemmons, D. R., 1995
Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions.
Endocr. Rev.; 16: 3-34
41. Julkunen, M., Koistinen, R., Suikkari, A. M., Seppala, M., Janne, O. A., 1990
Identification by hybridization histochemistry of human endometrial cells expressing mRNAs encoding a uterine beta-lactoglobulin homologue and insulin-like growth factor-binding protein-1.
Mol. Endocrinol.; 4: 700-707
42. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Schiebler, T. H., 1996
Histologie.
Springer Verlag

43. Krüssel, J. S., Bielfeld, P., Polan, M. L., Simon, C., 2003
Regulation of embryonic implantation.
Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.; 110 Suppl 1: S2-S9
44. Lane, B., Oxberry, W., Mazella, J., Tseng, L., 1994
Decidualization of human endometrial stromal cells in vitro: effects of progesterin and relaxin on the ultrastructure and production of decidual secretory proteins.
Hum. Reprod.; 9: 259-266
45. Lessey, B. A., 2000
Endometrial receptivity and the window of implantation.
Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.; 14: 775-788
46. Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W., Sun, J., 1995
Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility.
Fertil. Steril.; 63: 535-542
47. Licht, P., Losch, A., Dittrich, R., Neuwinger, J., Siebzehnruhl, E., Wildt, L., 1998
Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis.
Hum. Reprod. Update.; 4: 532-538
48. Licht, P., Russu, V., Lehmeier, S., Moll, J., Siebzehnruhl, E., Wildt, L., 2002
Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin.
Fertil. Steril.; 78: 252-258
49. Licht, P., Russu, V., Lehmeier, S., Wildt, L., 2001
Molecular aspects of direct LH/hCG effects on human endometrium--lessons from intrauterine microdialysis in the human female in vivo.
Reprod. Biol.; 1: 10-19
50. Licht, P., Russu, V., Wildt, L., 2001
On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation.
Semin. Reprod. Med.; 19: 37-47
51. Licht, P., von Wolff, M., Berkholz, A., Wildt, L., 2003
Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua.
Fertil. Steril.; 79 Suppl 1: 718-723

LITERATURVERZEICHNIS

52. Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.
Methods; 25: 402-408
53. Lopata, A., Hay, D. L., 1989
The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture.
Hum. Reprod.; 4: 87-94
54. Macaulay, V. M., 1992
Insulin-like growth factors and cancer.
Br. J. Cancer; 65: 311-320
55. Margalioth, E. J., Ben Chetrit, A., Gal, M., Eldar-Geva, T., 2006
Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET.
Hum. Reprod.; 21: 3036-3043
56. Morgan, D. O., Edman, J. C., Standing, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., Rutter, W. J., 1987
Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein.
Nature; 329: 301-307
57. Murphy, L. J., Murphy, L. C., Friesen, H. G., 1987
A role for the insulin-like growth factors as estromedins in the rat uterus.
Trans. Assoc. Am. Physicians; 100: 204-214
58. Murphy, L. J., Murphy, L. C., Friesen, H. G., 1987
Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus.
Mol. Endocrinol.; 1: 445-450
59. Nissley, P., Lopaczynski, W., 1991
Insulin-like growth factor receptors.
Growth Factors; 5: 29-43
60. Norwitz, E. R., 2006
Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications.
Reprod. Biomed. Online.; 13: 591-599
61. Noyes, R. W., 1950
Dating the endometrial biopsy.
Fertil. Steril.; 1: 3-25

62. Pritts, E. A., Atwood, A. K., 2002
Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials.
Hum. Reprod.; 17: 2287-2299
63. Rajaram, S., Baylink, D. J., Mohan, S., 1997
Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions.
Endocr. Rev.; 18: 801-831
64. Reshef, E., Lei, Z. M., Rao, C. V., Pridham, D. D., Chegini, N., Luborsky, J. L., 1990
The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 70: 421-430
65. Rinderknecht, E., Humbel, R. E., 1978
Primary structure of human insulin-like growth factor II.
FEBS Lett.; 89: 283-286
66. Rinderknecht, E., Humbel, R. E., 1978
The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin.
J. Biol. Chem.; 253: 2769-2776
67. Ritvos, O., Ranta, T., Jalkanen, J., Suikkari, A. M., Voutilainen, R., Bohn, H., Rutanen, E. M., 1988
Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells.
Endocrinology; 122: 2150-2157
68. Rogers, P. A., 1995
Current studies on human implantation: a brief overview.
Reprod. Fertil. Dev.; 7: 1395-1399
69. Rubin, R., Baserga, R., 1995
Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity.
Lab Invest; 73: 311-331
70. Rutanen, E. M., Pekonen, F., Nyman, T., Wahlstrom, T., 1993
Insulin-like growth factors and their binding proteins in benign and malignant uterine diseases.
Growth Regul.; 3: 74-77

71. Rutanen, E. M., Salmi, A., Nyman, T., 1997
mRNA expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) is suppressed and those of IGF-II and IGF-binding protein-1 are constantly expressed in the endometrium during use of an intrauterine levonorgestrel system.
Mol. Hum. Reprod.; 3: 749-754
72. Sadler, T. W., 2003
Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen.
Thieme
73. Schanz, A., Hess, A., Shahin, A., Hirchenhain, J., Griesinger, G., Kruessel, J. S., 2004
Molekulare Mechanismen der Embryoimplantation im Endometrium.
Der Gynäkologe; 37: 123-127
74. Schmidt, R. F., Thews, G., Lang, F., 2000
Physiologie des Menschen.
Springer Verlag; 370-407
75. Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E. R., 1983
Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status.
Endocrinology; 113: 297-305
76. Sheth, K. V., Roca, G. L., al Sedairy, S. T., Parhar, R. S., Hamilton, C. J., al Abdul, J. F., 1991
Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid.
Fertil. Steril.; 55: 952-957
77. Shi, C. Z., Collins, H. W., Buettger, C. W., Garside, W. T., Matschinsky, F. M., Heyner, S., 1994
Insulin family growth factors have specific effects on protein synthesis in preimplantation mouse embryos.
Mol. Reprod. Dev.; 37: 398-406
78. Simon, C., Frances, A., Piquette, G. N., el, D., I, Zurawski, G., Dang, W., Polan, M. L., 1994
Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist.
Endocrinology; 134: 521-528

79. Smith, R. M., Garside, W. T., Aghayan, M., Shi, C. Z., Shah, N., Jarett, L., Heyner, S., 1993
Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I.
Biol. Reprod.; 49: 1-12
80. Staun-Ram, E., Shalev, E., 2005
Human trophoblast function during the implantation process.
Reprod. Biol. Endocrinol.; 3: 56
81. Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., Abbondanzo, S. J., 1992
Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor.
Nature; 359: 76-79
82. Stewart, D. R., Overstreet, J. W., Celniker, A. C., Hess, D. L., Cragun, J. R., Boyers, S. P., Lasley, B. L., 1993
The relationship between hCG and relaxin secretion in normal pregnancies vs peri-implantation spontaneous abortions.
Clin. Endocrinol. (Oxf); 38: 379-385
83. Stewart, E. A., Sahakian, M., Rhoades, A., Van Voorhis, B. J., Nowak, R. A., 1999
Messenger ribonucleic acid for the gonadal luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor is not present in human endometrium.
Fertil. Steril.; 71: 368-372
84. Strakova, Z., Mavrogianis, P., Meng, X., Hastings, J. M., Jackson, K. S., Cameo, P., Brudney, A., Knight, O., Fazleabas, A. T., 2005
In vivo infusion of interleukin-1beta and chorionic gonadotropin induces endometrial changes that mimic early pregnancy events in the baboon.
Endocrinology; 146: 4097-4104
85. Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., von Wolff, M., 2006
The human endometrium as a fertility-determining factor.
Hum. Reprod. Update.; 12: 617-630
86. Strowitzki, T., Singer, G. A., Rettig, I., Capp, E., 1996
Characterization of receptors for insulin-like growth factor type I on cultured human endometrial stromal cells: downregulation by progesterone.
Gynecol. Endocrinol.; 10: 229-240

LITERATURVERZEICHNIS

87. Tang, B., Guller, S., Gurbide, E., 1993
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium.
Endocrinology; 133: 2197-2203
88. Tesarik, J., Hazout, A., Mendoza, C., 2003
Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function.
Reprod. Biomed. Online.; 7: 59-64
89. Volpert, O., Jackson, D., Bouck, N., Linzer, D. I., 1996
The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is required for proliferin-induced angiogenesis.
Endocrinology; 137: 3871-3876
90. Wang, H. S., Chard, T., 1999
IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function.
J. Endocrinol.; 161: 1-13
91. Wilcox, A. J., Baird, D. D., Weinberg, C. R., 1999
Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy.
N. Engl. J. Med.; 340: 1796-1799
92. Woodward, A. J., Lenton, E. A., 1992
Differential responses to a simulated implantation signal at various stages of the luteal phase in women.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 74: 999-1004
93. Woodward, B. J., Lenton, E. A., Turner, K., 1993
Human chorionic gonadotrophin: embryonic secretion is a time-dependent phenomenon.
Hum. Reprod.; 8: 1463-1468
94. Zapf, J., Waldvogel, M., Froesch, E. R., 1975
Binding of nonsuppressible insulinlike activity to human serum. Evidence for a carrier protein.
Arch. Biochem. Biophys.; 168: 638-645
95. Zapf, J., Walter, H., Froesch, E. R., 1981
Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia.
J. Clin. Invest; 68: 1321-1330

96. Zhou, J., Dsupin, B. A., Giudice, L. C., Bondy, C. A., 1994
Insulin-like growth factor system gene expression in human
endometrium during the menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab; 79: 1723-1734

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Wallwiener, der mir die Möglichkeit gab an seiner Klinik wissenschaftlich zu arbeiten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Licht für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Fluhr für die Einführung in die experimentellen Methoden, sowie für die konstruktive und motivierende Unterstützung und Beratung in allen methodischen und thematischen Aspekten.

Frau M. Deperschmidt danke ich für die Einführung in die experimentellen Methoden, ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name: Sabine Ursula Carli

Geboren: 13. März 1981 in Böblingen

Eltern: Michael Carli
Beate Carli, geb. Risch

Geschwister: Sebastian Carli

Schulbildung

1987-1991 Justinus-Kerner-Grundschule in Böblingen

1991-2000 Maria von Linden-Gymnasium in Calw-Stammheim

Studium

WS 2000/01 Diplom-Chemiestudium an der
Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg

2001-2004 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

2004-2007 Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

14.03.2003 Ärztliche Vorprüfung

13.11.2007 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

19.11.2007 Approbation als Ärztin