

**Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener**

**Hat das vom Embryo produzierte hCG einen Einfluss
auf Interleukin-11 und
Interleukin-15 in dezidualisierten humanen
endometrialen Stromazellen?**

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

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

vorgelegt von

**Ellen Renate Sachs-Nill geb. Sachs
aus
Schwäbisch Hall**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Licht

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Gallwitz

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1	Klinischer Bezug	11
1.2	Weiblicher menstrualer Zyklus	12
1.3	Anatomie des Uterus	12
1.4	Histologischer Aufbau des Endometriums	14
1.5	Zyklische Veränderungen des Endometriums	15
1.5.1	Desquamations- oder Menstruationsphase	15
1.5.2	Proliferations- oder Follikelphase	16
1.5.3	Sekretions- oder Lutealphase	17
1.5.4	Ischämische Phase	18
1.6	Hormoneller Gesamtzusammenhang	18
1.6.1	Die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse und weitere an dem menstrualen Zyklus beteiligte Hormone	19
1.7	In welcher Konzentration wirken die Hormone in den verschiedenen Phasen des menstrualen Zyklus?	21
1.7.1	Erste Zyklushälfte (ca. 1.-14. Tag) Follikelreifung	22
1.7.2	Zyklusmitte (ca. 14.-16. Tag)	22
1.7.3	Zweite Zyklushälfte (ca. 17.-18. Tag)	23

1.8	Dezidualisierung des Endometriums	24
1.8.1	Stimulierende Faktoren der Dezidualisierung	25
1.8.2	Aufgabe der Dezidualzellen	25
1.8.3	In vitro Dezidualisierung	26
1.9	Implantation	26
1.9.1	Signalaustausch während der Vorimplantation	27
1.9.2	Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem Uterusepithel	28
1.9.3	Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem Endometrium	29
1.9.4	Das Implantationsfenster	31
1.10	Der embryo-maternale Dialog und daran beteiligte Faktoren ..	32
1.11	HCG als eines der essentiellen Hormone des embryo- maternalen Dialogs	35
1.11.1	HCG und In-Vitro-Fertilisation	37
1.12	Die Interleukine 11 und 15	38
1.13	Interleukin-11	39
1.13.1	IL-11 übernimmt eine wichtige Rolle bei der menschlichen Implantation	40
1.13.2	Intrazelluläre Signaltransduktion von IL-11	40
1.13.3	Eine reduzierte IL-11 Produktion ist mit ein Grund für ungeklärte Infertilität	41
1.13.4	IL-11 verlängert das Überleben der Zellen	42
1.13.5	Lokale und hormonelle Faktoren beeinflussen IL-11	42
1.13.6	IL-11, Prolaktin und IGF	43
1.13.7	Weitere Funktionen von IL-11	43
1.13.8	HCG und IL-11	43

1.14	Interleukin-15	44
1.14.1	Aufgabe von IL-15	44
1.14.2	Parallelen zu IL-2	44
1.14.3	IL-15 Expression	45
1.14.4	Aufgaben von IL-15	46
1.14.5	IL-15 und klinisch relevante Infertilität	47
1.15	Ziel dieser Arbeit	48
1.16	Konkrete Fragestellung und experimentelles Vorgehen	49

2. Material und Methoden

2.1	Materialien	50
2.1.1	Geräteliste	50
2.1.2	Laborzubehör/Verbrauchsmaterial	52
2.1.3	Chemikalien	53
2.1.4	Verwendete molekularbiologische Reagenzien	56
2.1.5	ELISAs	57
2.1.6	Oligonukleotide	58
2.1.6.1	Humanes β -actin	58
2.1.6.2	IL-11	58
2.1.6.3	IL-15	58
2.1.7	Statistik	58

2.2	Methoden	59
2.2.1	Gewebeproben	59
2.2.2	Aufbereitung und Präparation der Präparate in endometriale Stromazellen (ESC)	60
2.2.3	Probengewinnung bei ESC	65
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	67
2.2.4.1	RNA-Isolation	67
2.2.4.2	Reverse Transkription / RT-Reaktion	69
2.2.4.3	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	71
2.2.4.3.1	Real-time PCR	73
2.2.4.3.2	CT-Wert (Threshold-Cycle)	74
2.2.4.3.3	Durchführung	74
2.2.5	Biochemische Methoden	77
2.2.5.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	77
2.2.5.2	R&D DuoSet ELISA kit human IL-11 (DY218)	79
2.2.5.3	R&D Duo Set ELISA kit human IL-15 (DY247)	81

3. Ergebnisse

3.1	Allgemeine Anmerkungen	83
3.1.1	Statistische Berechnungen	83
3.1.2	Vorbemerkungen	83
3.1.3	Überprüfung der Dezidualisierung	84

3.2.	Interleukin-11	85
3.2.1.	ESC ohne Dezidualisierung 24 h / Kontrollgruppe	85
3.2.1.1	mRNA-Expression	85
3.2.1.2	Proteinsekretion	87
3.2.2	IL-11 Tag 6 24 h r-hCG	88
3.2.2.1	mRNA-Expression	88
3.2.2.2	Proteinsekretion	89
3.2.3	IL-11 Tag 9 24 h r-hCG	91
3.2.3.1	mRNA-Expression	91
3.2.3.2	Proteinsekretion	93
3.2.4	IL-11 Tag 9 48h r-hCG	94
3.2.4.1	mRNA-Expression	94
3.2.4.2	Proteinsekretion	96
3.3	Interleukin-15	97
3.3.1	IL-15 Tag 6 24 h r-hCG	97
3.3.2	IL-15 Tag 9 24 h r-hCG	99
3.3.3	IL-15 Tag 9 48 h r-hCG	101
3.3.4	IL-15 und ELISA	102

4. Diskussion

4.1	Interleukin-11	103
4.1.1	ESC ohne Dezidualisierung 24 h / Kontrollgruppe	103
4.1.1.1	mRNA Expression	103
4.1.1.2	Proteinsekretion	103
4.1.2	IL-11 Tag 6 24 h r-hCG	104
4.1.2.1	mRNA Expression	104
4.1.2.2	Proteinsekretion	104
4.1.3	IL-11 Tag 9 24 h r-hCG	106
4.1.3.1	mRNA Expression	106
4.1.3.2	Proteinsekretion	107
4.1.4	IL-11 Tag 9 48h r-hCG	108
4.1.4.1	mRNA Expression	108
4.1.4.2	Proteinsekretion	108
4.1.5	Gesamtzusammenschau IL-11 – Thesen	109
4.2	Interleukin-15	112
4.2.1	IL-15 Tag 6 24 h r-hCG	112
4.2.2	IL-15 Tag 9 24 h r-hCG	112
4.2.3	IL-15 Tag 9 48 h r-hCG	113
4.2.4	Gesamtzusammenschau IL-15 mRNA Expression	113
4.2.5	IL-15 und ELISA	114

4.3	Grundsätzliche Gründe für nicht signifikante Ergebnisse bzw. Unterschiede zwischen den Kulturreihen	115
4.4	Verwendung von hCG als Stimulator der Dezidualisierung ..	115
4.5	Beteiligung von Il-11 und 15 an der Fertilität und Regulation durch hCG	116
4.6	Klinischer Ausblick	117
5.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	119
6.	Verzeichnisse	120
6.1	Abbildungen	120
6.2	Tabellen	121
6.3	Grafiken	122
6.4	Literaturverzeichnis	123
6.5	Abkürzungen	134
7.	Danksagungen	137
8.	Lebenslauf	138

1. Einleitung

1.1 Klinischer Bezug

In Deutschland bleiben **ca. 10 bis 20 Prozent** der Ehen **ungewollt kinderlos**. Die Zahlen nehmen weiter zu. Etwa 800.000 Paare suchen deshalb jährlich ärztlichen Rat auf. Die Ursachen für die ungewollte Kinderlosigkeit sind dabei vielfältig. In etwa 30 Prozent liegt die Ursache bei der Frau und in etwa 30 Prozent beim Mann. In weiteren 30 Prozent sind ursächlich beide Partner betroffen. In etwa 10 Prozent der Fälle kann die Ursache der Kinderlosigkeit nicht geklärt werden.

Auf Seiten der Frau findet sich folgende Ursachenverteilung:

- 30-40 % hormonelle Ursachen
- 30-40 % Störungen der Eileiter
- 10 % Störungen der Gebärmutter
- 7-10 % Störungen des Gebärmutterhalses
- 1 % psychisch bedingt
- 10 % ohne fassbare Ursache

Da vor allem die hormonellen Ursachen einen Großteil der Kausalitäten ausmachen, ist es unerlässlich die einzelnen an der Fertilität beteiligten molekularen Zusammenhänge näher zu erforschen. Die klinische Erforschung des Endometriums mittels Ultraschall und anderen Techniken, wie z.B. Biopsien und Analysen der uterinen Sekretion ist bereits intensiv erfolgt und therapeutische Optionen um die endometriale Funktion zu verbessern sind bereits getestet worden.

Die Vertiefung unseres Grundlagenwissens über die molekularen Abläufe während der physiologischen Präimplantationsentwicklung und Implantation ist neben der klinischen Forschung essentiell, um die Erfolgsraten der In-Vitro-Fertilisation weiter und gezielter zu verbessern und um ein besseres klinisches sowie therapeutisches Management im Hinblick auf Sterilität, Infertilität, jedoch auch Kontrazeption entwickeln zu können.

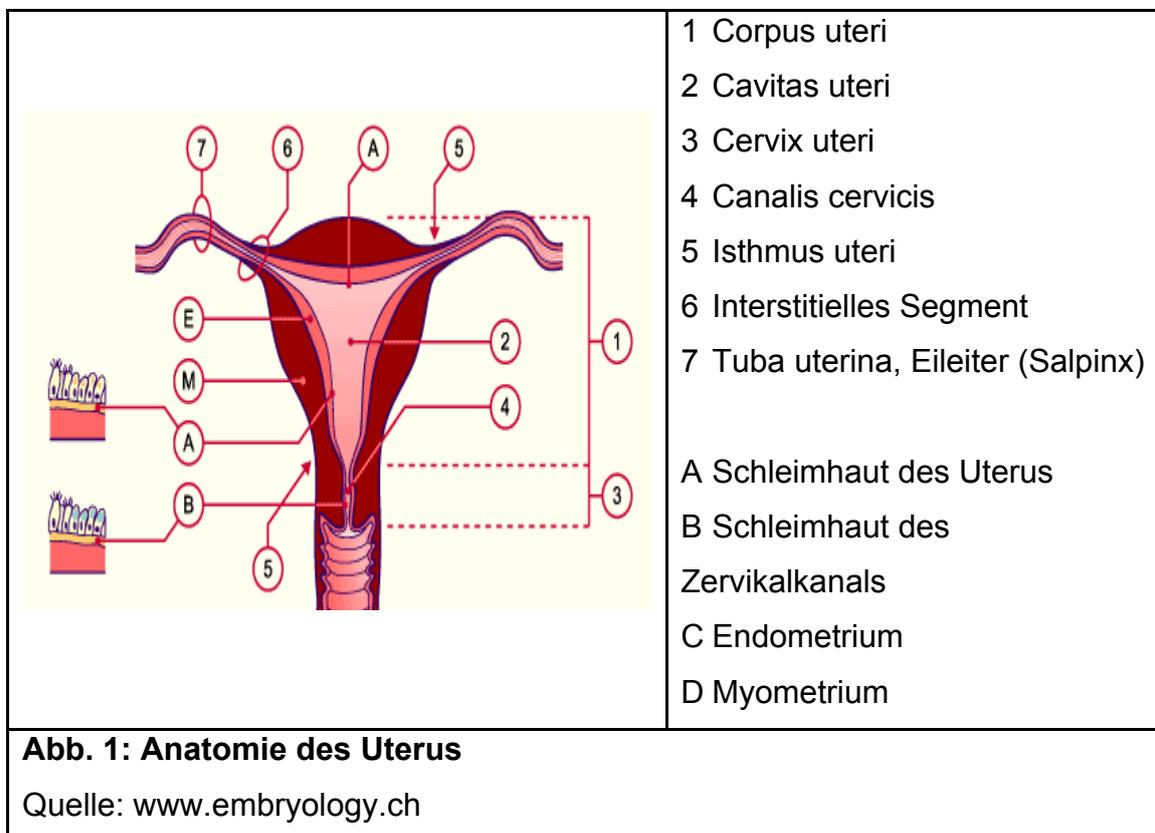
1.2 Weiblicher menstrualer Zyklus

Der monatliche Zyklus der Frau stellt einen sehr komplexen Vorgang dar und ist genauso wie die menschliche Reproduktion und die Implantation des Embryos an einen exakten Zeitplan geknüpft und schon eine geringe Abweichung macht eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle mit anschließender Implantation und physiologischer Schwangerschaft unmöglich.

Die Geschlechtsreife beginnt mit der ersten Periodenblutung (Menarche) die meist zwischen dem 12. und 16. Lebensjahr eintritt. Die letzte Periodenblutung im Alter von ca. 50 Jahren beendet die reproduktive Phase (Menopause). Ausdruck einer normalen Fortpflanzungsfähigkeit ist der regelmäßige menstruale Zyklus, welcher sich am Endometrium der Gebärmutter abspielt. Diese Umbauprozesse am Endometrium sind ein wichtiger die Fertilität beeinflussender Faktor und therapeutische Optionen könnten auch hier ihren Ansatzpunkt haben. (Strowitzki et al., 2006)

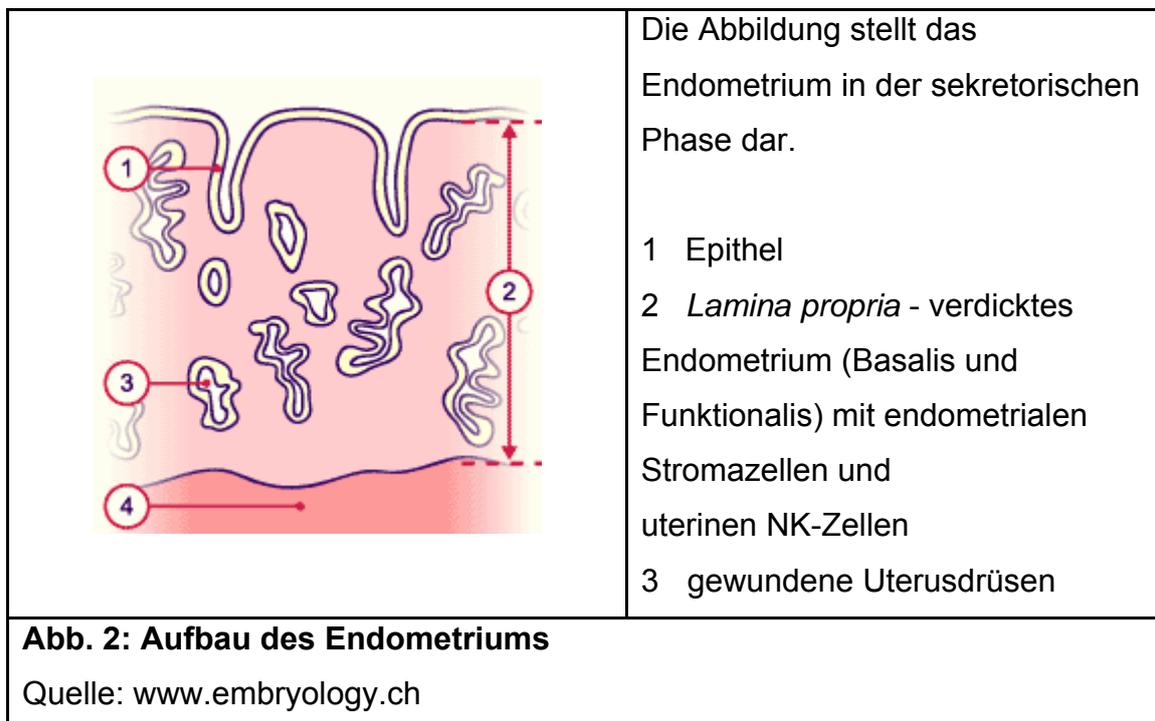
1.3 Anatomie des Uterus

Die Hauptfunktion des Uterus ist die Aufnahme des Embryos und später die Beherbergung des Feten während der Schwangerschaft. Der Uterus ist ein birnenförmiges, muskulöses Hohlorgan mit einer dreischichtigen Wand: Eine äußere Tunica serosa, das Perimetrium, eine dicke Tunica muscularis, das Myometrium, und eine innere Schleimhautauskleidung, das Endometrium. Das Endometrium ist der Ort der Implantation. Es erfährt morphologische und funktionelle Veränderungen, die eng mit der Ausschüttung von Sexualhormonen assoziiert sind. Ohne zyklische hormonelle Beeinflussung, das heißt vor der Pubertät oder nach der Menopause, ist dieses Gewebe keinen Veränderungen unterworfen. Mit der Menarche bereitet sich der Uterus bei jedem Zyklus auf die Aufnahme einer befruchteten Eizelle vor. Dies geschieht durch die Proliferation und die Differenzierung des Endometriums. Bleibt eine Implantation aus, wird die funktionelle (oberflächlichste) Schicht des Endometriums abgesondert und ausgeschieden.



1.4 Histologischer Aufbau des Endometriums

Als Endometrium wird die innere Auskleidung der Gebärmutterhöhle mit Schleimhaut, welche auch als Cavum uteri bezeichnet wird, verstanden. Das Endometrium kann in ein Stratum functionale (kurz: Funktionalis), an dem alle zyklischen Veränderungen stattfinden und das bei der Menstruation abgestoßen wird, und ein Stratum basale (kurz: Basalis), das über den Zyklus hinaus erhalten bleibt, weiter unterteilt werden. (Schiebler et al., Springer Verlag)



Das Stratum functionale beginnt mit dem Oberflächenepithel. Dieses ist einschichtig, hochprismatisch und beinhaltet ebenso Flimmerzellen wie auch sezernierende Zellen mit Mikrovilli. Darunter findet man zellreiches, faserarmes Bindegewebe mit progesteron empfindlichen interstitiellen Zellen. Diese werden auch als Stroma uteri bezeichnet. Zudem befinden sich hier auch tubulöse Drüsen, die Glandulae uterinae. Da die Gefäße in der Funktionalis sehr gewunden verlaufen werden sie Spiralarterien genannt, in der Oberfläche gehen sie in Arteriolen über und bilden dort ein dichtes Kapillarnetz. (Lüllmann-Rauch, Thieme Verlag 2003)

1.5 Zyklische Veränderungen des Endometriums

Folgende **Phasen** können innerhalb **eines Zyklus am Endometrium** unterschieden werden:

Desquamations- oder Menstruationsphase (1.-4. Tag des Zyklus)

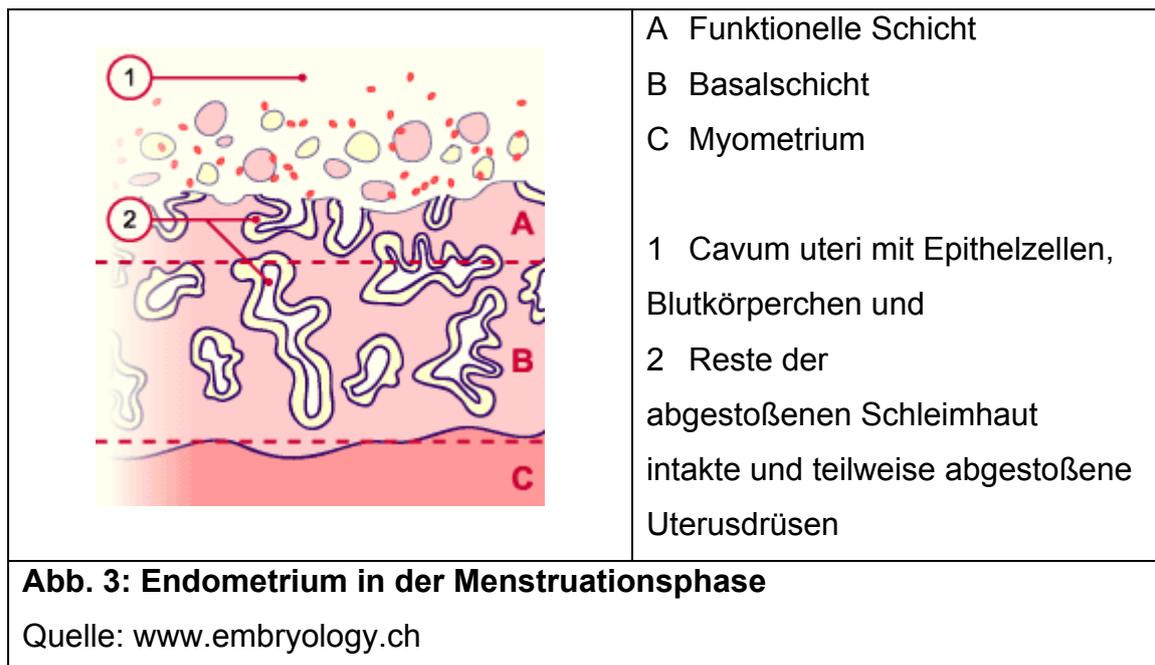
Proliferationsphase (ca. 5.-14. Tag des Zyklus)

Sekretionsphase (etwa vom 15.-28. Tag des Zyklus)

Ischämische Phase (einige Stunden vor Beginn der Abstoßung der Funktionalis)

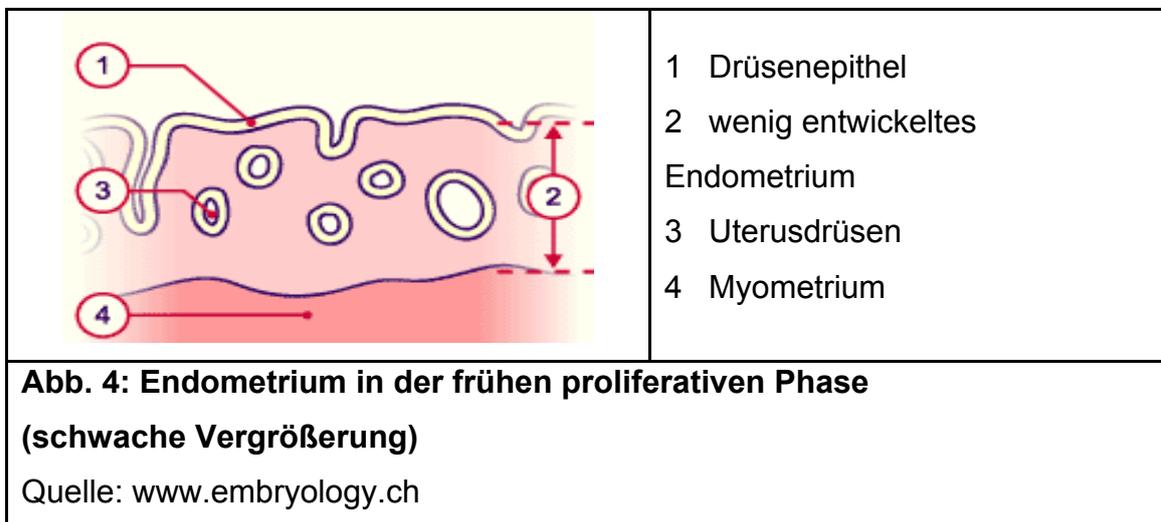
1.5.1 Desquamations- oder Menstruationsphase

Wenn eine Implantation ausbleibt, senkt die Rückbildung des Gelbkörpers die Werte der zirkulierenden Hormone Östradiol und Progesteron, was die Abstoßung der funktionellen Zone des Endometriums zur Folge hat. Durch Blutungen werden die nekrotischen Bezirke der Zona functionalis abgehoben und Blut samt Gewebedetritus gelangen ins Uteruslumen, um von hier nach außen ausgeschwemmt zu werden.



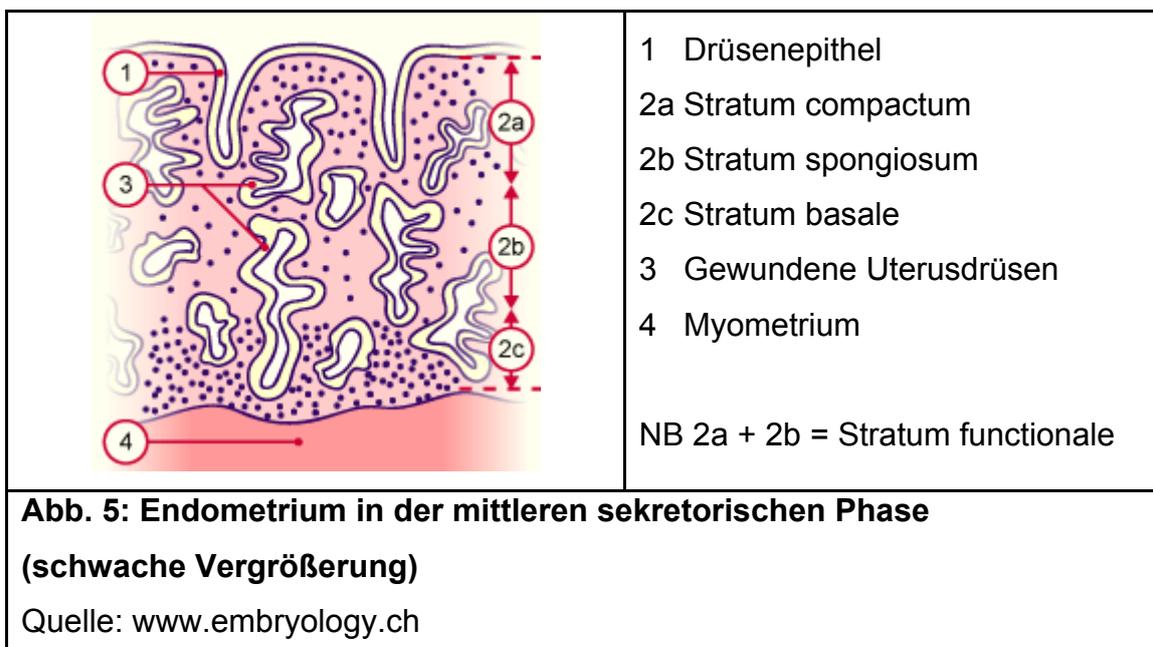
1.5.2 Proliferations- oder Follikelphase

In dieser Phase wird unter dem Einfluss von Östradiol das, durch die vorangegangene Menstruation verloren gegangene, Stratum functionale wieder aufgebaut. Da in dieser Zeit die wachsenden Follikel zunehmend Östradiol produzieren, spricht man auch von Follikelphase. Zunächst kommt es zur Ausbildung eines neuen Oberflächenepithels, das aus dem Epithel der Drüsenreste im Stratum basale hervorgeht. Gleichzeitig beginnt die Proliferation der Bindegewebszellen in dem sich neu bildenden Stratum functionale. Gefäße sprossen ein, die Drüsen wachsen und strecken sich in die Länge.



1.5.3 Sekretions- oder Lutealphase

Nach dem Eisprung wird die Uterusschleimhaut unter dem Einfluss von Progesteron und Östrogenen in ein zur Sekretion befähigtes Gewebe umgebaut. Wegen der Abhängigkeit vom Corpus luteum spricht man ebenso von der Lutealphase. In der Sekretionsphase kommt es nach erfolgter Ovulation als Früheffekt des Progesterons zu Glykogeneinlagerung in die Epithelzellen und Stromazellen. Außerdem vermehren sich die Zellen im basalen Teil des Stratum functionale. Ein Späteffekt des Progesterons ist ein starkes Wachstum der Drüsen­schläuche. Ferner lagern einige Stromzellen nicht nur Glykogen, sondern auch Proteine und Lipide ein. Sie werden als Prädeziduazellen bezeichnet. Kommt es zu einer Implantation wandeln sie sich in Dezidualzellen um. Zusätzlich zur Dezidualisierung von Stromazellen kommt es hierbei zu einer sekretorischen Transformation der Epithelzellen und zu einem Einwandern von Immunzellen, wobei Monozyten und uterine natürliche Killerzellen (uNK) die wichtigste Rolle übernehmen. (Dunn et al., 2003) Bei den Epithelzellen tritt eine Strukturveränderung der Plasmamembran und des Zytoskeletts ein, indem es zu einer Transformation der Mikrovilli kommt. (Strowitzki et al., 2006).



1.5.4 Ischämische Phase

Geht die Eizelle zugrunde, löst das Versiegen der Progesteron- und Östradiolsekretion durch Rückbildung des Corpus luteum eine „**Hormonentzugsblutung**“ aus. Es kommt prämenstruell zu einer Schrumpfung der Schleimhaut, die durch die Minderdurchblutung, Ischämie, der Funktionalis hervorgerufen wird. Eingeleitet wird die Ischämiephase durch parakrine Wirkung von Endothelin, einem hochaktiven Vasokonstriktor des Uterusepithels, der u. a. Spasmen der Spiralarterien an der Grenze zwischen Zona basalis und functionalis auslöst. Das oberhalb der Drosselungsstelle der Gefäße gelegene Gewebe geht zugrunde und wird abgestoßen.

1.6 Hormoneller Gesamtzusammenhang

Ein Zyklus wird wie oben bereits erwähnt in verschiedene Phasen unterteilt. Diese beschreiben einerseits den hormonellen Zyklusablauf am Ovar (Follikel- und Lutealphase), zum anderen beziehen sie sich auf die parallelen zyklischen Veränderungen am Endometrium (Proliferations- und Sekretionsphase). Diese hormonellen Veränderungen finden nicht nur regional statt, sondern sind von einem übergeordneten System dem Hypothalamus und der Hypophyse im Zwischenhirn gesteuert.

1.6.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar Achse und weitere an dem menstrualen Zyklus beteiligte Hormone

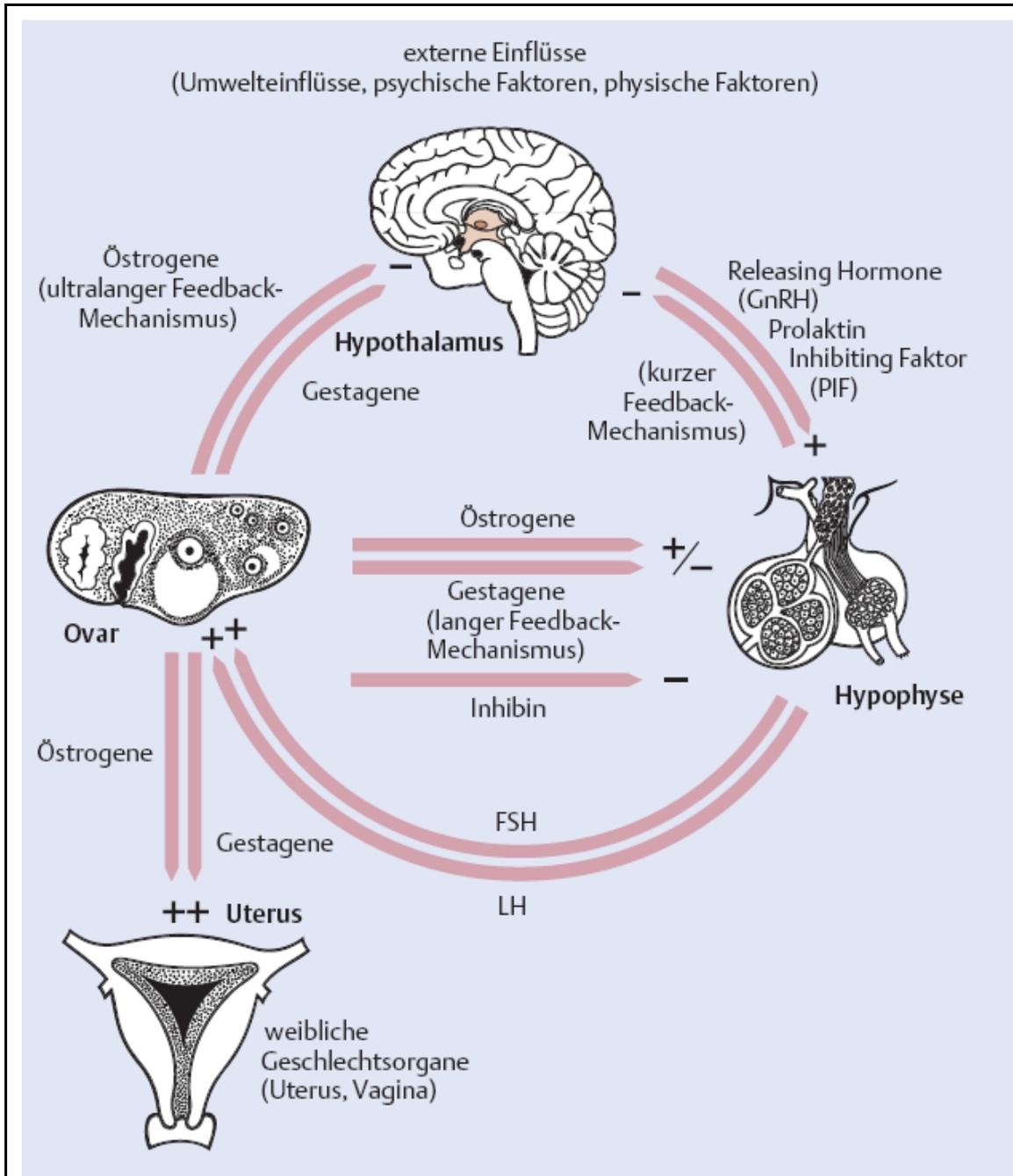


Abb. 6: Die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse

Quelle: Manfred Stauber, Thomas Weyerstahl; Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. Auflage; Thieme Verlag

Die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar Achse stellt die Reihenfolge der beteiligten Hormone am menstrualen Zyklus dar. Der Zyklus wird durch einen spezialisierten Teil des Zwischenhirns, dem **Hypothalamus** zentral gesteuert. Nach der Pubertät beginnt dieser pulsatile **GnRH** (Gonadotropin Releasing Hormon) freizusetzen. GnRH stimuliert die Hirnanhangdrüse (**Hypophyse**), die daraufhin die Hormone **FSH** (Follikel stimulierendes Hormon) und **LH** (Luteinisierendes Hormon) bildet und ins Blut freisetzt.

Unter der Einwirkung von FSH reifen im Eierstock der Frau Eizellen heran, gleichzeitig werden in den **Follikeln** vermehrt **Östrogene** gebildet.

Die Steroidhormone **Östrogen und Progesteron** regulieren die Sekretion von GnRH, LH und FSH. Zudem fördern sie die Proliferation und Differenzierung des Endometriums, was zur Vorbereitung auf eine mögliche Implantation dient. (Licht et al., 1998)

Östrogene werden zum größten Teil im **Ovar** selbst hergestellt. Aber auch die Plazenta, Nebennierenrinde, Leber und Fettgewebe sind in die Östrogenproduktion eingeschlossen. Östrogene haben die Aufgabe das Wachstum von Uterus, Vagina und Mamma während der Pubertät und Schwangerschaft zu kontrollieren. Zudem nehmen sie Einfluss auf die Natrium- und Wasserretention und die Proteinbiosynthese. An den Genitalien sind sie für den Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut verantwortlich und öffnen die Portio der Cervix auf einige Millimeter, sodass Spermien eindringen können, ebenso erhöhen sie die Tubenmotilität.

Progesteron hingegen ist das typische Hormon des Gelbkörpers, welcher auch als **Corpus luteum** bezeichnet wird. Außerdem wird es wie Östrogen auch von der Plazenta und der Nebennierenrinde produziert. Progesteron wirkt auf die Tubenmotilität und ermöglicht den Spermien die Tube bis zur Ampulle zu passieren. Hier findet in der Regel die Befruchtung statt. Zusätzlich hat Progesteron noch einen thermogenetischen Effekt, welcher die Körpertemperatur in der zweiten Zyklushälfte um 0,5 °C erhöht.

1.7 In welcher Konzentration wirken die Hormone in den verschiedenen Phasen des menstrualen Zyklus?

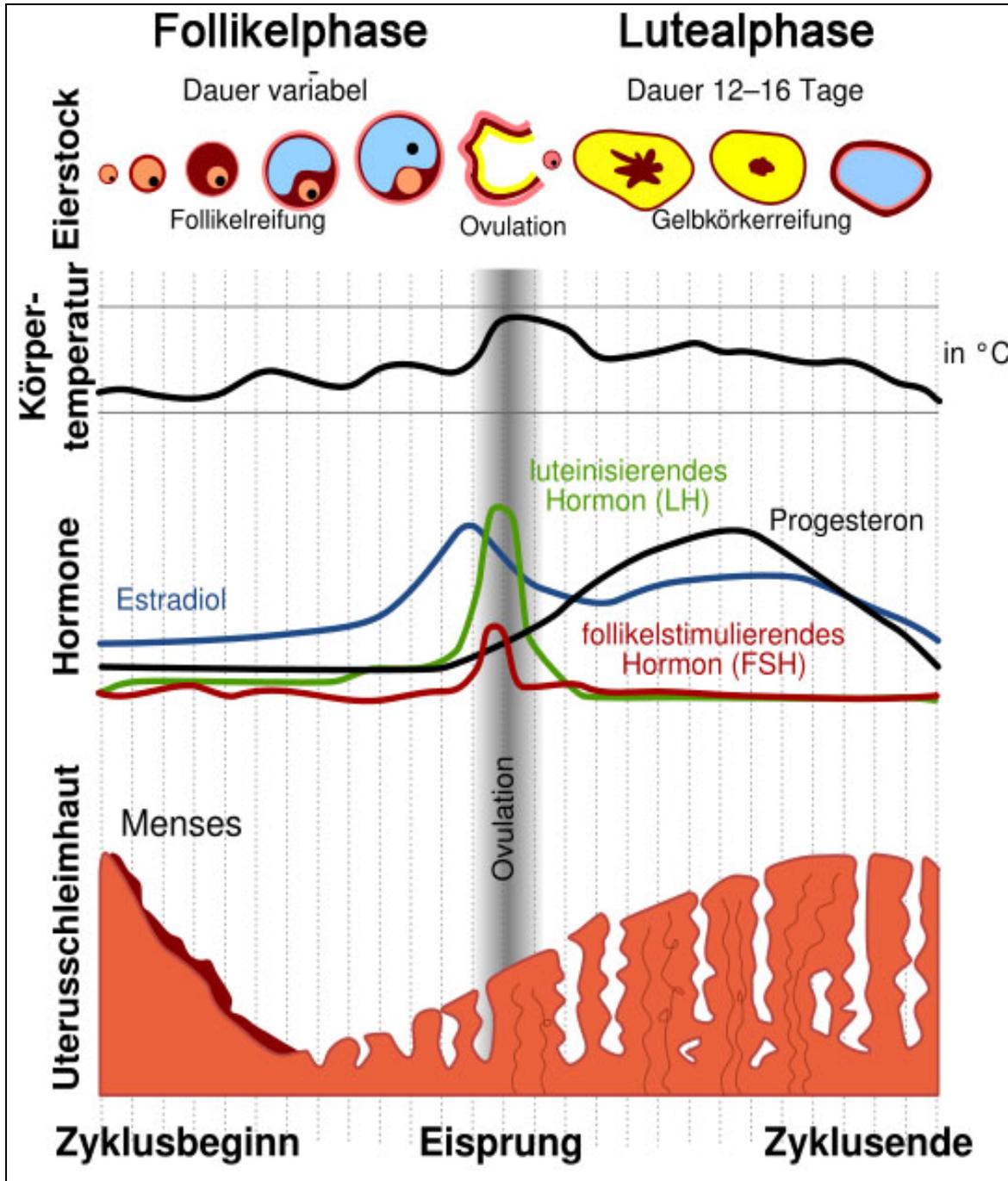


Abb. 7: Das Zusammenwirken der Hormone im weiblichen Zyklus

Quelle: www.wikipedia.de

1.7.1 Erste Zyklushälfte (ca. 1.-14. Tag) Follikelreifung

Die Phase der Follikelreifung kann stark variieren und bei einigen Frauen auch über 14 Tage betragen. Dahingegen ist die Lutealphase mit 14 Tagen immer konstant.

Wie oben beschrieben regelt die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar Achse den menstrualen Zyklus. Am Ovar angekommenes FSH stimuliert die Reifung der Follikel. Die Schleimhaut wird durch die Wirkung von Östradiol um 4 mm auf 5 mm verdickt. Hierbei kommt es zur Proliferation von Oberflächenepithel, Drüsenepithel, Stroma und Spiralarterien. Gegen Ende wird das Bindegewebe ödematös. (Junqueira et al., 1996; Histologie, Springer Verlag)

1.7.2 Zyklusmitte (ca. 14.-16. Tag)

Mit zunehmender Reife des dominierenden Follikels steigt die von ihm gebildete **Östrogen-** und **Inhibin**produktion an, mit der er die weiteren gereiften Follikel unterdrückt, was zu einer Hemmung der hypophysären FSH-Ausschüttung im Sinne einer negativen Rückkopplung führt. Das LH leitet über spezifische LH-Rezeptoren die Luteinisierung des Follikels ein. Dies bewirkt einen präovulatorischen Anstieg von **Progesteron**, der wiederum die positive Feedback-Wirkung der Östrogene unterstützt. Über diesen positiven Rückkopplungsmechanismus kommt es zur plötzlichen Freisetzung größerer Mengen von LH aus der Hypophyse (**LH-Peak**). Durch den LH-peak werden abschließende Reifungsprozesse der Eizelle in Gang gesetzt und der Einsprung in die Tube erfolgt. Diesen Vorgang bezeichnet man als **Ovulation**. Der rupturierte Follikel wird zum Corpus luteum, welches nun vermehrt **Progesteron** produziert. Die Tube der entsprechenden Seite fängt das reife, befruchtungsfähige Ei auf und befördert es in Richtung Gebärmutter. Die Befruchtung (**Fertilisierung**) der Eizelle findet normalerweise innerhalb von 24 h im Eileiter statt. Ein Spermium dringt durch die Eihülle ein, die väterlichen Chromosomen werden in die Eizelle freigesetzt, die Zellteilung beginnt.

Die Wanderung des Embryos durch den Eileiter in die Gebärmutter dauert ca. 4-5 Tage, währenddessen findet eine Reihe von Zellteilungen statt und der Umwandlungsprozess von der Zygote bis zur Blastozyste beginnt. Die Blastozyste nistet sich am 6. oder 7. Zyklustag in das vorbereitete Endometrium ein (**Implantation**).

1.7.3 Zweite Zyklushälfte (ca. 17.-28. Tag)

Wenn das Ei nicht befruchtet wurde, erkennt das Ovar dies dadurch, dass aus der Gebärmutter keine hCG-Hormonsignale kommen. Es bildet sich zwar ein Corpus luteum, welches aber nach ca. 10 bis 14 Tagen zugrunde geht. Da das Corpus luteum große Mengen an Progesteron synthetisiert, fällt nach erfolgloser Befruchtung der Eizelle der Progesterongehalt im Blut, und es kommt zur Abstoßung der Funktionalis des Endometriums. Kommt eine Schwangerschaft zustande wird das Corpus luteum aufrechterhalten bis die Plazenta selbst in der Lage ist ausreichend Progesteron zu bilden.

1.8 Dezidualisierung des Endometriums

Die Dezidualisierung des Endometriums ist die entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Implantation einer befruchteten Eizelle. Die Dezidualreaktion zeichnet sich durch die Infiltration von zahlreichen Leukozyten aus, die aus dem mütterlichen Organismus stammen, sowie der Veränderung der extra-zellulären Matrix (EZM).

Prädeziduazellen, fibroblastenähnliche Vorläuferzellen, welche mit einem Progesteronrezeptor ausgestattet sind, werden nach dem Einfluss von Östrogenen durch Progesteron zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Die darauf reagierenden Zellen werden nun zu großen polygonalen Zellen, welche Glykogen und Lipide speichern. Ab diesem Zeitpunkt bezeichnet man sie als dezidualisierte Stromazellen (DSC). (Dunn et al., 2003) DSC nehmen an Größe und Zellorganellen, die zur Proteinbiosynthese benötigt werden zu. (Irwin et al., 1994) Die deziduale Umwandlung ist noch nicht im Detail bekannt, doch scheint sie an der Bildung einer immunologisch günstigen Umgebung für den Embryo beteiligt zu sein. Außerdem dienen gewisse Dezidualzellen - sie degenerieren und werden anschließend vom Synzytiotrophoblasten phagozytiert - als ernährende Substanz vor der Entstehung des fetoplazentären Kreislaufs.

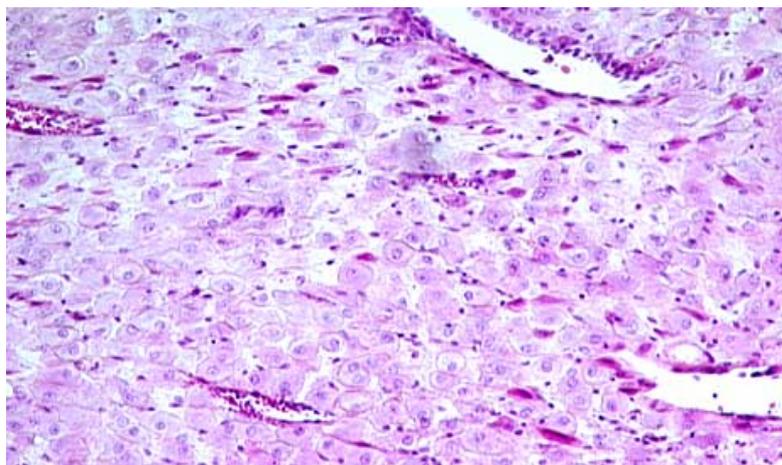


Abb. 8: Dezidualisierte Stromazellen

Quelle: www.embryology.ch

Der Beginn der Dezidualisierung geht von den Blutgefäßen aus und schreitet dann weiter auf das Stroma über. Der Prozess beginnt bereits in der späten Lutealphase und kann dann im Falle einer Schwangerschaft weiter voranschreiten.

1.8.1 Stimulierende Faktoren der Dezidualisierung

In vitro wird die Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen (ESC) durch **Progesteron** hervorgerufen. **Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)** beschleunigt diesen Vorgang, da cAMP die ESC für Progesteron empfindlicher macht. cAMP wird deshalb als Dezidualisierungsstimulus verstanden. (Brar et al., 1997; Brosens et al., 1999; Tangt et al., 1993)

Weitere an der Dezidualisierung beteiligten Stoffe scheinen Modulatoren von cAMP zu sein. Allen voran **Relaxin** und **Prostaglandin E₂ (PGE₂)**. Dezidualisierte Stromazellen ihrerseits produzieren eine Vielzahl weiterer Moleküle. Darunter Laminin, Fibronectin, Tissue factor (TF), Interleukin-1, Interleukin-11, Interleukin-15 und den Vascular endothelial Growth Factor (VEGF). Zu den charakteristischen Produktionsstoffen von DSC gehören Prolaktin und Insulin growth factor binding protein (IGFBP-1), ein dem Insulin ähnliches Protein welches als Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle spielt. (Murphy et al., 1987) Die Konzentration an Prolaktin und IGFBP-1 ist in dezidualisierten Stromazellen besonders hoch. (Dunn et al., 2003) Deshalb stellen sie sichere Dezidualisierungsmarker dar.

1.8.2 Aufgabe der Dezidualzellen

Es wird heute davon ausgegangen, dass während der Schwangerschaft Dezidualzellen parakrine, immunregulierende, ernährende und auf den Embryo bezogene regulierende Funktionen erfüllen. (Irwin et al., 1994)

1.8.3 *In vitro* Dezidualisierung

In vitro werden endometriale Stromazellen durch **Progesteron**, **Medroxyprogesteronacetat (MPA)** oder **cAMP** dezidualisiert. Dabei wirken die Zugabe von **Östradiol** und **Epidermal Growth Factor (EGF)** als beschleunigende Faktoren. (Bell et al., 1991; Irwin et al., 1989; Irwin et al., 1999) Die Dezidualisierung von Stromazellen geht, wie oben bereits erwähnt, mit einer Produktion und Sekretion von einer Vielzahl von Proteinen einher, welche als dezidualisierende Proteine bezeichnet werden. Darunter zählt man vor allem Prolaktin und IGFBP-1.

IGFBP-1 ist das am meisten exprimierte IGFBP und ist ein wichtiges Produkt des sekretorischen Endometriums. (Giudice et al., 1999) Nach der Ovulation stimuliert Progesteron die endometrialen Stromazellen zur Sekretion von IGFBP-1. (Wang et al., 1999) IGFBP-1 mRNA findet sich in prädezidualisierten endometrialen Stromazellen der späten Sekretionsphase und in dezidualisierten Endometriumzellen nach eingetretener Schwangerschaft. (Julkunen et al., 1990) Es ist somit eines der besten Dezidualisierungsmarker. (Irwin et al., 1991) Der Zeitpunkt der Expression von IGFBP-1 im humanen Endometrium spricht dafür, dass dieses Bindeprotein direkt mit der Dezidualisierung der Stromazellen assoziiert ist. (Wang et al., 1999)

1.9 Implantation

Die molekularen Mechanismen der Implantation sind heute nur teilweise bekannt. Sie rufen **komplexe kaskadenartige Interaktionen** zwischen den embryonalen Trophoblastzellen, den Epithelzellen, Dezidualzellen, den immunkompetenten Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM), des mütterlichen Endometriums, hervor.

Schematisch gesehen finden die molekularen Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem mütterlichen Organismus auf drei Ebenen statt:

- Signalaustausch während der Vorimplantation (embryo-maternaler Dialog)
- Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem Uterusepithel (Adplantation)
- Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem Endometrium (Adhäsion und Invasion des Trophoblasten)

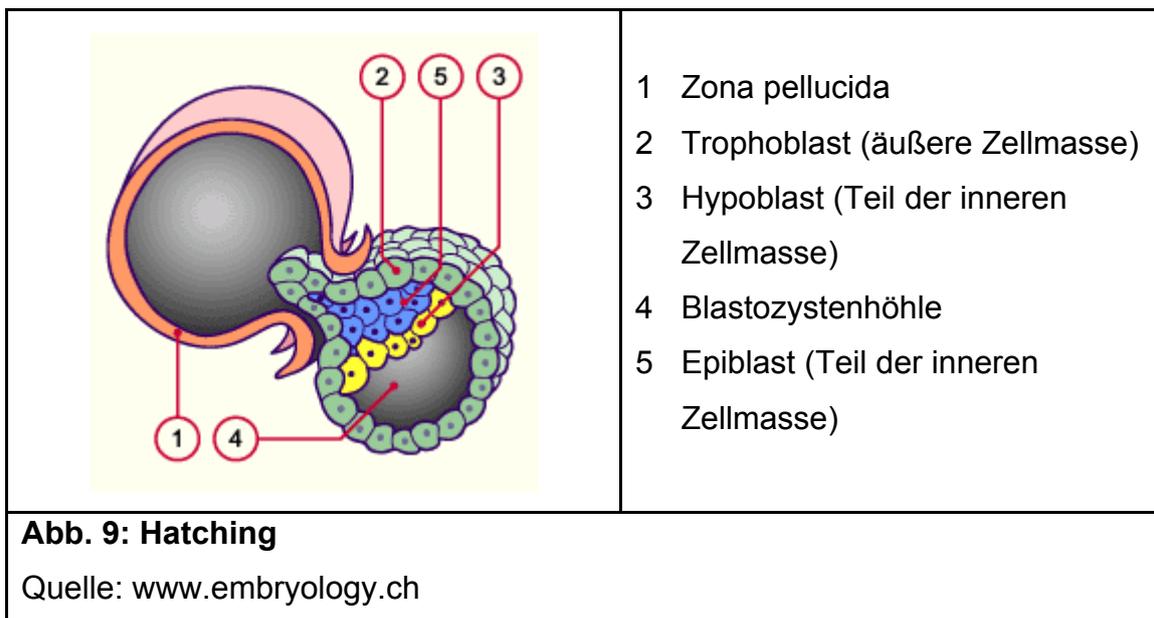
1.9.1 Signalaustausch während der Vorimplantation

An dem komplexen Vorgang der Implantation ist sowohl der Embryo selbst, aber auch das Endometrium beteiligt. Man geht heute davon aus, dass es zu einer Interaktion zwischen diesen zwei Komponenten kommt. Dabei spielen sowohl hormonelle Faktoren, wie auch Zytokin- und Wachstumsfaktorensysteme eine essentielle Rolle. Sobald der Embryo die Gebärmutter erreicht hat, nimmt er über Botenstoffe (z.B. Hormone oder Cytokine) Kontakt mit der Mutter auf. Die Gebärmutter antwortet ebenfalls durch die Sekretion von Botenstoffen. Auf diese Weise beeinflussen sich die Entwicklung von Gebärmutter Schleimhaut und Embryo gegenseitig. Man spricht von einem regelrechten '**Embryo-maternalen Dialog**' (Herrler et al., 2003), an dem das Schwangerschaftshormon (hCG), als eines der frühesten embryonalen Signale möglicherweise eine wichtige, einnistungsfördernde Rolle hat.

Tatsächlich sezerniert die Blastozyste seit ihrem Schlüpfen Moleküle, die auf die ovariale Aktivität, die Beweglichkeit der Tube und des Endometriums (Early Pregnancy Factor (EPF), hCG) wirken. (Sharkey et al., 1995; Kane et al., 1997) Mit der Kompaktion der Morula erscheinen Rezeptoren für den koloniestimulierenden Faktor (CSF), den epithelialen Wachstumsfaktor (EGF), den Leukämie Inhibitions Faktor (LIF) und für das E-Cadherin. Die Cadherine sind kalziumabhängige Zelladhäsionsmoleküle, die bei der Verankerung der Blastozyste im Endometrium eine Rolle spielen. Der Embryo produziert auch in diesem Stadium Interleukin 1 (IL-1 α und β), welches eine Schlüsselrolle bei der Ausrichtung des Embryos zur Uterusschleimhaut hin, einnimmt. (Simón et al., 1998a) Auch der Aktivierungsfaktor der Thrombozyten (PAF) wird vom Embryo produziert. Das Interleukin (IL-1), dessen Rezeptoren während der Luteinphase

auf den Epithelzellen des Endometriums lokalisiert sind, ist nötig, um den LIF im Uterus zu produzieren. (Piccini et al., 2001a,b) Während der Vorimplantationsphase nimmt die Dicke der Oberflächenproteine (Glykocalyx) sowie die elektrostatische Abstoßung zwischen der Blastozyste und dem Endometrium ab, was die Implantation begünstigt.

1.9.2 Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem Uterusepithel



Am 5. bis 6. Tag nach der Befruchtung schlüpft („**hatching**“) der Embryo aus der Zona pellucida und startet die Implantation mit der Apposition. Danach kommt es zur direkten Kontaktaufnahme mit der Gebärmutter Schleimhaut (**Adhäsion**) über so genannte Integrinmoleküle. Anschließend dringen die embryonalen Zellen in die Gebärmutter Schleimhaut ein (**Invasion**) und bilden die Plazenta, welche den Embryo fortan ernährt. Der regelrechte Ablauf dieser Implantationsvorgänge ist nicht nur für die Etablierung der Schwangerschaft, sondern auch für einen problemlosen Schwangerschaftsverlauf bis zur Geburt von entscheidender Bedeutung. Verspätete Implantationen, die gelegentlich beobachtet werden, führen zu einem massiven Anstieg an Fehlgeburten und auch zu Komplikationen im Schwangerschaftsverlauf.

Schon ab der 3. Furchungsteilung beginnt bereits die Transkription und Translation von embryonalen Proteinen, so dass die Blastozyste noch vor der Invasion ins Endometrium eigenständig notwendige Faktoren produzieren kann.

1.9.3 Interaktionen zwischen der Blastozyste und dem Endometrium

Der Trophoblast benimmt sich wie ein "**pseudo-tumorales Gewebe**", welches das Endometrium infiltriert. Die Trophoblastzellen sezernieren proteolytisch aktive Enzyme, die auf die EZM wirken, indem diese für die Invasion des Embryos durchlässiger gemacht wird. Es handelt sich hier hauptsächlich um matrizielle Metalloproteinasen (MMP) (Bischof et al., 1995; Kim et al., 1999) und um Plasminogen-Aktivatoren. (Schatz et al., 1995) Nach der Zerstörung der Basalmembran wächst der Trophoblast in die Dezidua des Uterusgewebes ein (extravillöser Trophoblast). Die Trophoblastzellen exprimieren bestimmte Integrine (Zelladhäsionsmoleküle). Die Integrine, welche aus der $\alpha 6$ Kette bestehen und durch die tiefer gelegenen Zellen exprimiert werden, interagieren nicht mit der Uterusschleimhaut. Dagegen haben die Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 1\beta 1$, die von den oberflächlich gelegenen Zellen exprimiert werden, einen Einfluss auf die Schleimhaut. (Simón et al., 1998b) Es ist also offensichtlich, dass die Modulation der Rezeptoren das Ausmaß des Einwachsens des Trophoblasten determiniert. Das Einwachsen des Trophoblasten und der Abbau der EZM werden durch endometriale Faktoren kontrolliert (sezerniert durch Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Leukozyten). Diese Faktoren wirken auf eine autokrine und parakrine Art, um die Invasion des Trophoblasten zu erleichtern.

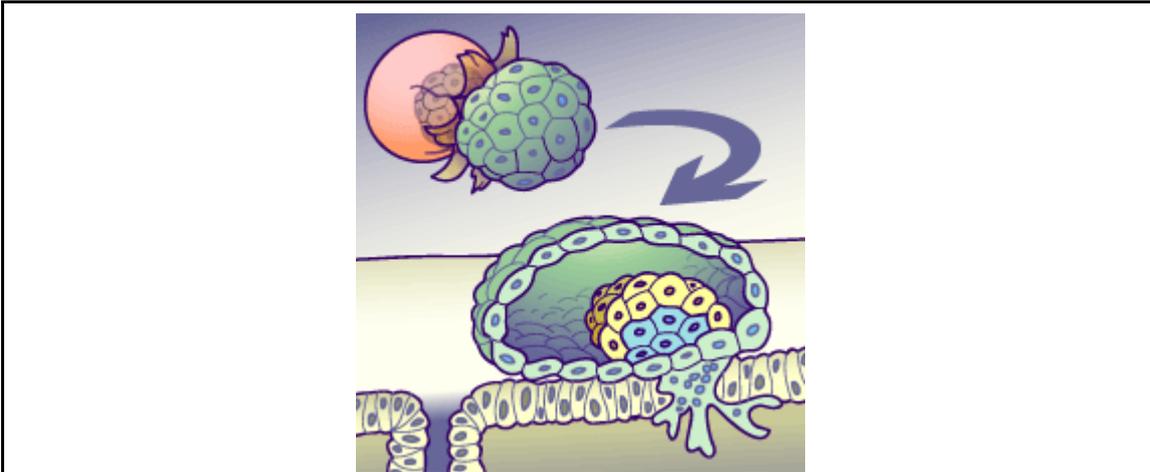
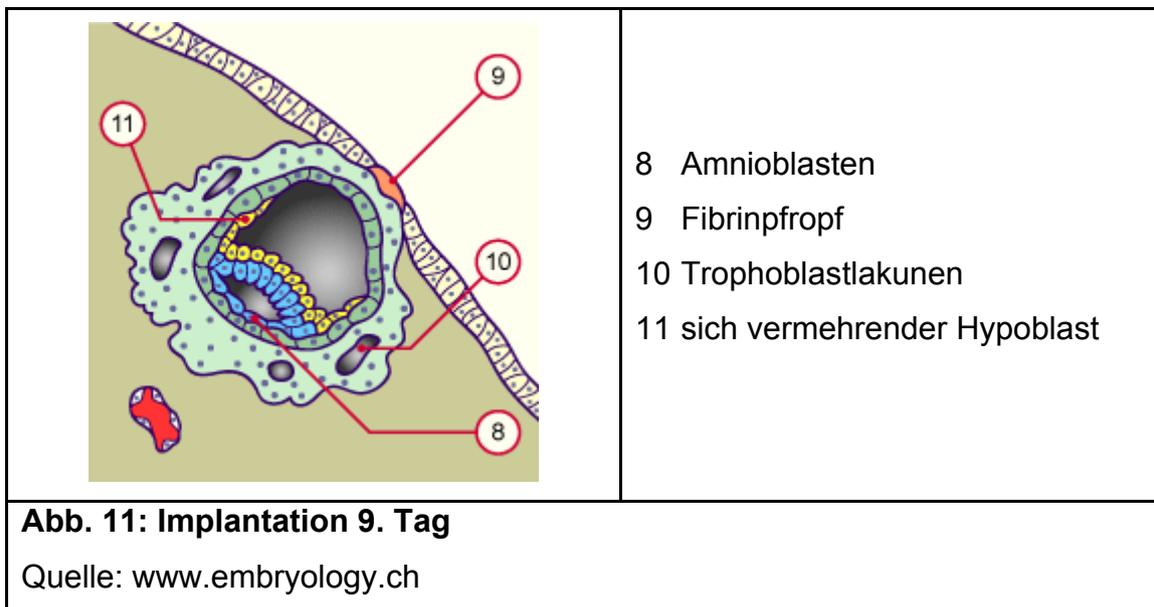


Abb. 10: Adhäsion der Blastozyste

Quelle: www.embryology.ch

Die Apposition und die Adhäsion der Blastozyste an das Uterusepithel benötigt die Sekretion von Faktoren, die sich an spezifische Rezeptoren binden (eines der Gewebe muss den Liganden sezernieren, das andere sollte den Rezeptor exprimieren). Es sind zahlreiche "**Implantationsfaktoren**" bekannt: Das **Interleukin 1 (IL-1)**, der **Inhibitionsfaktor für Leukozyten (LIF)** (Cullinan et al. 1996; Kojima et al. 1994; Laird et al., 1997; Stewart et al., 1994), der **koloniestimulierende Faktor (CSF)** (Pampfer et al., 1991), sowie der **epitheliale Wachstumsfaktor (EGF)** (Ejskjaer et al., 2005) und sein Rezeptor (**EGF-R**). Das embryonale IL-1 bindet sich während der Implantation an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Epithelzellen des Endometriums. Der LIF (ein Glykoprotein, das in die Gruppe der Zytokine gehört) wird ab dem 18. Tag des Menstruationszyklus durch die Uterusepithelzellen synthetisiert, sein Rezeptor wird durch die Blastozyste exprimiert. Er scheint eine Rolle in der Differenzierung des inneren Zytotrophoblasten zum äußeren Synzytiotrophoblasten zu spielen und trägt zur hCG-Sekretion bei. (Simón et al., 1997)

1.9.4 Das Implantationsfenster



Die Implantation des Embryos in die Schleimhaut des Uterus ist unter anderem von Wilcox näher erforscht worden. (Wilcox et al., 1999) Es konnte gezeigt werden, dass das geschätzte Risiko eines frühen Schwangerschaftsverlustes bei einer späten Implantation des Embryos erhöht ist. In 84% der erfolgreichen Schwangerschaften fand die Implantation zwischen dem achten und zehnten Tag statt. (Wilcox et al., 1999) Aufgrund dieser Daten definierte man das so genannte **Implantationsfenster**, in dem die höchste Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Implantation und Schwangerschaft des Embryos besteht. Weiter konnte man zeigen, dass das Endometrium in der späten Sekretionsphase weniger empfänglich für die Implantation eines Embryos ist als davor. (Rogers, 1995) Zudem spricht das Corpus luteum ca. 11 Tage nach der Ovulation weniger auf hCG an als zuvor. (Woodward et al., 1992)

Aus diesen Gesichtspunkten heraus kann man heute davon ausgehen, dass das Implantationsfenster ein **zeitlich eng begrenztes Ereignis** darstellt und vermutlich dazu dient nicht physiologisch gereifte Embryonen, welche eventuell später oder zu wenig hCG produzieren, zu selektionieren. (Wilcox et al., 1999)

1.10 Der embryo-maternale Dialog und daran beteiligte Faktoren

Wie oben bereits erwähnt nimmt die Eizelle schon kurz nach ihrer Befruchtung über zahlreiche Botenstoffe Kontakt zur Mutter auf. Dabei spielen eine Reihe von Adhäsionsmolekülen wie Lektinen und Integrinen, sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle.

Faktor	Beispiel	Erwartete Funktionen
Adhäsionsmoleküle	Lektine, Integrine, L-Selektin, Matrixmetalloproteinasen (MMP)	Apposition und Adhäsion, Unterstützung der Trophoblastendifferenzierung und Invasion
Hormone	17 β -Östradiol, Progesteron	Regulation der Proliferation der endometrialen Stroma- und Epithelzellen
Zytokine und Wachstumsfaktoren	Leukemia Inhibiting Factor (LIF), Interleukin	Förderung des embryomaternalen Dialogs
Angiogenetische Wachstumsfaktoren	Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF)	Beeinflussung der Permeabilität und Aufbau der endometrialen Blutgefäße und Einfluss auf embryomaternalen Dialog und Embryonalentwicklung

Tabelle 1: Auswahl an Faktoren, die mit der embryonalen Implantation assoziiert werden.

Quelle: Molekulare Mechanismen der Embryoimplantation im Endometrium; Der Gynäkologe 2004

Die initiale Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Endometrium ist vor allem von **Lektinen** geprägt. (Dietl, 2001) Bereits nach dem Schlüpfen der Blastozyste aus der Zona pellucida beginnen Trophoblastzellen mit der Expression von L-Selektin. Dabei wird L-Selektin benötigt um die Adhäsion von Leukozyten am Endothel der Blutgefäße zu ermöglichen. (Schanz et al., 2004) Es konnte gezeigt werden, dass es dabei im Endometrium zu einer Hochregulation von L-Selektin bindenden Liganden kommt. Aus diesem Grund nimmt man an, dass Blastozysten L-Selektin zur Bindung an das Endometrium benötigen. Diese noch sehr instabile Verbindung der Blastozyste an das Endometrium wird anschließend durch Integrine verstärkt.

Als **Integrine** werden heterodimere membrane Glykoproteine bezeichnet, die aus einer α - und β - Untereinheit zusammengesetzt sind. Integrine besitzen die Fähigkeit an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) zu binden. Dabei spielen sie vor allem bei der Adhäsion der Blastozyste eine entscheidende Rolle, allen voran Fibronectin, Kollagen und Laminin. (Strowitzki et al., 2006) Integrine werden sowohl vom Embryo wie auch von der maternalen Seite, dem Endometrium, produziert. (Schanz et al., 2004) Dabei zeigt ein Teil der Integrine eine zyklusabhängige Expression. Am Implantationsvorgang ist dabei das $\alpha v \beta 3$ Integrin der wichtigste Vertreter seiner Art. (Lessey, 2000) Es wird sogar vermutet, dass Integrine bei Infertilität eine tragende Rolle spielen. Diesen Schluss lässt die Beobachtung an Mäusen mit signifikant reduzierter Implantationsrate zu, bei welchen zuvor das $\alpha v \beta 3$ Integrin inaktiviert wurde. (Staub-Ram et al., 2005)

Die Invasion des Trophoblasten ist durch den Abbau der extrazellulären Matrix durch verschiedene Proteinase wie z.B. den **Matrixmetalloproteinasen (MMP)** gekennzeichnet. Der Trophoblast selbst und das Endometrium sind für die Steuerung der MMP-Aktivität verantwortlich, indem sie Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP), ausschütten. (Hurskainen et al., 1996; Fluhr et al., 2008) Da MMPs Hauptbestandteile der Basalmembran sind, sind sie essentiell an der Invasion des Trophoblasten beteiligt. Auch bei den

zyklischen Veränderungen des Gewebes in Ovar und Uterus konnte die Beteiligung von MMPs und ihren Inhibitoren als Regulatoren gezeigt werden. (Curry et al., 2003)

Als wichtiges Cytokin im embryo-maternalen Dialog sei hier noch der **Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)** erwähnt. LIF wird zum Zeitpunkt der Implantation verstärkt exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass er bei Inaktivierung in weiblichen Mäusen zu Infertilität führt. So geht man heute davon aus, dass das Fehlen von LIF zu einem endometrialen Defekt führt, welcher die Implantation des Embryos verhindert. (Stewart et al., 1992)

Der **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** spielt als angiogenetischer Wachstumsfaktor beim Anschließen an die mütterlichen Blutgefäße eine entscheidende Rolle. Dabei induziert er die Angiogenese und erhöht die Permeabilität von Blutgefäßen. VEGF wird genauso wie sein dazugehöriger Rezeptor im Endometrium und Trophoblasten exprimiert. Ein Beweis dafür, dass der Embryo die Angiogenese durch binden an endometriale Rezeptoren selbst steuern kann. (Krüssel et al., 2003)

1.11 HCG als eines der essentiellen Hormone des embryo-maternalen Dialogs

HCG ist ein Proteohormon, das im Synzytiotrophoblasten gebildet wird und aus einer α - und einer β -Untereinheiten besteht. Die β -Untereinheit ist spezifisch für das hCG. Die α -Untereinheit kommt dagegen auch in weiteren Hormonen vor: follikelstimulierendes Hormon (FSH), luteinisierendes Hormon (LH) und Thyreoidea stimulierendes Hormon (TSH). HCG und LH wirken über denselben Rezeptor. Die hCG-Produktion des Trophoblasten verhindert die Lyse des Corpus luteum. HCG geht auf die Mutter über und kann sowohl im Serum wie auch im Harn nachgewiesen werden. Dies wird zum Nachweis einer Schwangerschaft bei dem immunologischen Schwangerschaftstest genutzt. Die hCG-Konzentration verdoppelt sich in der Regel in der normalen Frühschwangerschaft alle 2 Tage und erreicht ihr Maximum zwischen der neunten und elften Schwangerschaftswoche. Danach fallen die hCG-Werte langsam auf basale Konzentrationen ab, die kurz vor der 20. Schwangerschaftswoche erreicht werden.

HCG kann ab dem 2-Zell-Stadium als messenger Ribonukleinsäure (mRNA) gemessen werden und erreicht als eines der ersten Signale des Embryos vor der Implantation messbare Konzentrationen. (Bonduelle et al., 1988; Fishel et al., 1984; Hearn et al., 1988; Woodward et al., 1993)

Im menschlichen Urin kann es allerdings erst ab dem 7-8 Tag nach der Konzeption gemessen werden. (Baird et al., 1991)

HCG beeinflusst die endometriale Aktivität auf zwei verschiedene Weisen:

- (I) die LH Aktivität mithilfe der Steuerung der Progesteron Freisetzung aus dem Corpus luteum und
- (II) eine direkte Einflussmöglichkeit auf das Endometrium (Licht et al. 2001; Lopata et al., 1997) in Bezug auf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren während der Schwangerschaft.

(zu I) Die LH Aktivität unter dem Einfluss von hCG ist gut dokumentiert. (Ducan 2000) Progesteron übt eine direkte kontrollierende Funktion auf das Endometrium aus und zwar über eine LIF-Sekretion, welche von Interleukin 4 mit Hilfe von T-Zellen moduliert wird.

(zu II) Die direkte Modulation des Endometriums mit hCG erfolgt ebenfalls über LIF, sowie über VEGF, IGFBP-1, M-CSF und MMP-9. Die Gabe von hCG (500 IU/ml) ruft eine signifikante Inhibition von intrauterinem IGFBP-1 und M-CSF hervor. LIF, VEGF und MMP-9 werden hingegen signifikant stimuliert. Zusammenfassend können verschiedene direkte Veränderungen durch hCG am Endometrium beobachtet werden und unterstreichen somit die klassische endokrinologische Rolle dieses Hormons. (Licht et al., 2007)

In Arbeiten von Licht et al. (Licht et al., 2001) wurde bereits gezeigt, dass hCG einen Effekt auf ESC hat. Die *in vivo* Studien konnten zeigen, dass sich unter dem Einfluss von hCG die Expression von IGFBP-1, VEGF, LIF, M-CSF und MMP-9 in ESC verändert. Die hCG induzierte Expression von IGFBP-1 und Prolaktin konnte erst kürzlich in einer Arbeit von Fluhr et al. (Fluhr et al., 2006) *in vitro* bestätigt werden. Außerdem wirkt hCG auf die Dezidualisierung von humanen ESC (Kayisli et al., 2003; Tang et al., 1993) und hat multiple Effekte während der Schwangerschaft wie z.B. die Zunahme des uterinen Blutstroms, eine Immunsuppression an der mütterlich-fetalen Schnittstelle und die Förderung der Trophoblasten-Invasion in den Uterus. (Rao et al., 2001)

1.11.1 HCG und In-Vitro-Fertilisation

Die Behandlung mit dem Schwangerschaftshormon hCG scheint die Implantationsraten menschlicher Embryonen zu erhöhen.

Die Implantationsraten im Eizellspendeprogramm stiegen signifikant an, wenn vor dem Embryotransfer hCG gegeben wurde. Hierbei muss es sich um einen direkten Effekt auf die Gebärmutter Schleimhaut handeln, da im Eizellspendeprogramm mit künstlichen Zyklen gearbeitet wird, also ein körpereigener Gelbkörper überhaupt nicht vorhanden ist. (Tesarik et al., 2003)

Diese Erkenntnisse bestätigen Daten, die zeigen konnten, dass hCG einen direkten, die Fruchtbarkeit fördernden Effekt auf die Gebärmutter Schleimhaut zu haben scheint. (Licht et al., 2001) So konnte gezeigt werden, dass hCG einen direkten Einfluss auf die Einnistung des Embryos auf verschiedenen Wegen unterstützen kann. So werden durch hCG lokale Parameter verändert, die die Durchblutung (VEGF), die Ausreifung der Gebärmutter Schleimhaut (IGFBP-1), die Einnistung selbst (LIF, M-CSF) und die Plastizität des Endometriums (MMPs) beeinflussen.

Insgesamt legen diese neuen Daten nahe, hCG einen verstärkten Stellenwert im Rahmen der weiteren Grundlagenforschung und speziell in der Fertilitätsbehandlung zukommen zu lassen.

1.12 Die Interleukine 11 und 15

Da endometriale Defekte mit als ein Grund für Infertilität und erhöhte Fehlgeburtenrate gelten, ist es unerlässlich die Funktion des Endometriums während der Dezidualisierung näher zu erforschen. Hierbei spielen wie oben bereits erwähnt unter anderem Zytokine in der Übermittlung der Steuerung der Implantation und der Anlage der Plazenta eine entscheidende Rolle. Es ist allerdings nicht gerade einfach ein solch kompliziertes Netzwerk der Interaktion zu entschlüsseln. Auch biologische Überlappungen in der Funktion und Regulation führen bislang immer wieder zu widersprüchlichen Annahmen. So ist der Mechanismus der endometrialen- embryonalen Interaktion, welche zur Implantation und Plazentation im Menschen führt, noch völlig unverstanden. In dieser Arbeit soll dabei der Schwerpunkt auf die Interleukine 11 und 15 gesetzt werden, die in der Literatur bereits als Hauptfaktoren im endometrialen Geschehen beschrieben sind.

Interleukine (IL-x) sind zu den Zytokinen zählende Peptidhormone, d.h. sie sind körpereigene Botenstoffe der Zellen des Immunsystems. Das Wort Interleukin kommt dabei aus dem Lateinischen: inter = zwischen und leukos = weiß. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch anderen an der Immunreaktion beteiligten Zellen (z.B. Makrophagen). Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden sie in mehrere Untergruppen unterteilt, die durch Zahlen gekennzeichnet werden.

1.13 Interleukin-11

IL-11 ist ein 23 Kilo Dalton nicht glykolisiertes Protein ohne Cysteinanteil und wird von DSC im humanen Uterus produziert. (Dimitriadis et al., 2000)

Als erstes konnte IL-11 in mehreren Studien als ein Wachstumsfaktor der Hämatopoese zusammen mit anderen Faktoren beschrieben werden. (Du et al., 1994) Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IL-11 auch eine wichtige anti-inflammatorische Aktivität hat. (Sands et al., 1999)

IL-11 gehört mit IL-6 zu einer Zytokinfamilie. Die Rezeptoruntereinheit Glykoprotein gp130 ist dabei allen Molekülen gemeinsam. Das Glykoprotein "gp130" (zuerst beschrieben als "Interleukin-6-Transducer-Chain" oder "Interleukin-6-Signal-Transducer") ist ein wichtiges Protein, welches die Signale einiger Zytokine in die Zielzellen weitervermittelt (intrazellulärer Signalweg) und die Funktion eines Rezeptors hat. Zu diesen Zytokinen gehört neben Interleukin-6 und Interleukin-11 auch Oncostatin-M, der ziliäre neurotrophe Faktor und der Leukämie-Inhibitor-Faktor. Diese Zytokine aktivieren mithilfe von gp130 Zielgene, die in die Zelldifferenzierung, das Zellüberleben, die Apoptose und die Proliferation involviert sind. Die Mitglieder dieser Zytokinfamilie haben pro- und antientzündliche Eigenschaften und spielen für die Hämatopoese, bei der Akute-Phase-Reaktion und der Immunantwort des Organismus eine Rolle.

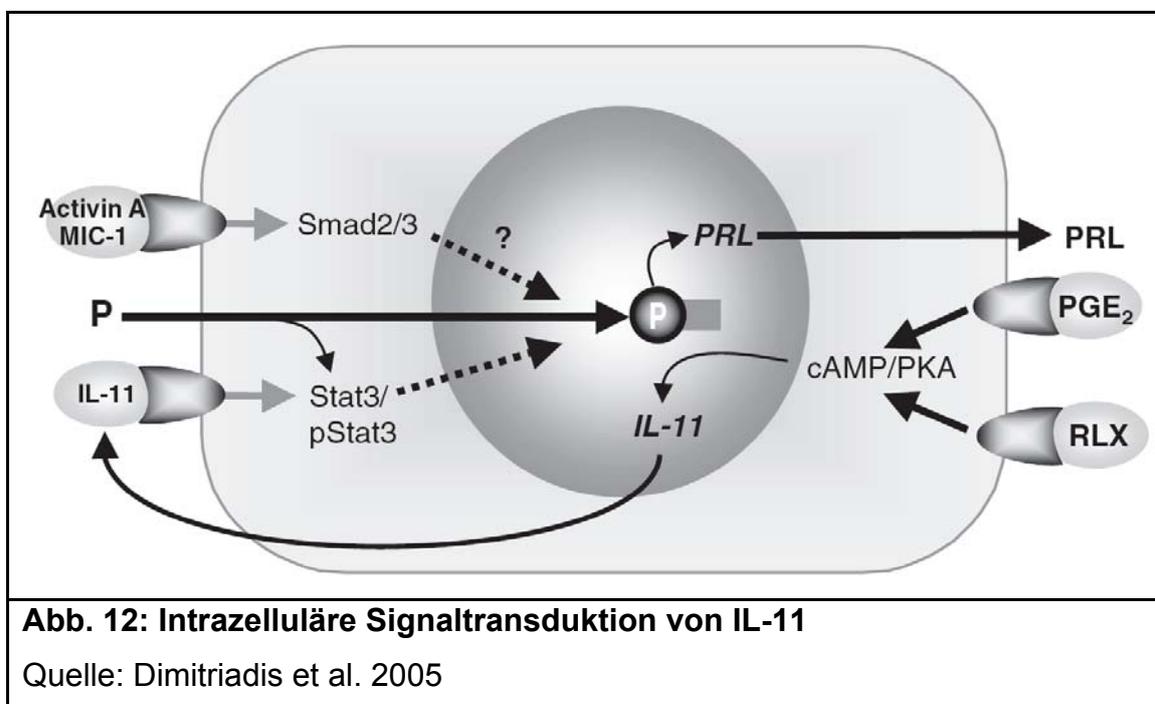
Versuche mit humanen ESC Kulturen konnten zeigen, dass IL-11 sowohl ein Produkt von dezidualisierten Stromazellen ist, ebenso wie ein Schlüsselfaktor im Übermitteln der dezidualen Umwandlung. (Dimitriadis et al., 2002) Es zeigte sich auch, dass die Neutralisation von endogenem IL-11 mithilfe der Zugabe von IL-11 Antikörpern die Prolaktin und IGFBP-1 Expression reduziert, beides ebenfalls Marker der Dezidualisierung. Somit sei auch die enge Verbindung der Prolaktin und IGFBP-1 Produktion mit IL-11 dargestellt. (Dimitriadis et al., 2002)

1.13.1 IL-11 übernimmt eine wichtige Rolle bei der menschlichen Implantation

Die Evidenz nimmt zu, dass IL-11 eine wichtige Funktion auch in der Implantation von menschlichen Embryonen hat. IL-11 wird im Menschen sowohl in endometrialen Drüsen wie auch von luminalem Epithel exprimiert, obwohl es widersprüchliche Angaben gibt bezüglich der Zeit der maximalen epithelialen Produktion, möglicherweise aufgrund von unterschiedlichen Protokollen der Immunhistochemie. (Cork et al., 2001; Dimitriadis et al., 2000; von Rango et al., 2004)

Der Rezeptor IL-11R α und gp130 werden sowohl in luminalem wie auch in glandulärem Epithel exprimiert. (Cork et al., 2002; Cullinan et al., 1996; von Rango et al., 2004) Allerdings ist keine periodische Veränderung der IL-11R α Expression ersichtlich. Dadurch ist für die endometriale Funktion wahrscheinlich ausschließlich der Ligand, also IL-11 verantwortlich.

1.13.2 Intrazelluläre Signaltransduktion von IL-11



Die Abbildung zeigt die komplexe Interaktion zwischen IL-11 Progesteron, Prostaglandin (PR), Östrogen (E₂), Relaxin (RLX), Activin A und Makrophagen hemmendes Protein-1 (MIC-1) zur Stimulation der Dezidualisierung in endometrialen Stromazellen.

Prolaktin ist der wichtigste Marker der Dezidualisierung. Progesteron hingegen ist für die Dezidualisierung unerlässlich und der Effekt von Progesteron kann mit Hilfe von PG E₂ oder Elaxin deutlich gesteigert werden. IL-11 bindet extrazellulär an seinen Rezeptor und stimuliert so über pSTAT3 (phosphorylation signalling transduced and activator of transcription 3) die Synthese und Freisetzung von Prolaktin (PRL). Östrogen (E₂) und oder Relaxin (RLX) lösen nach ihrer Bindung an ihre Rezeptoren intrazellulär über cAMP als Signaltransduktor die IL-11 Synthese und Freisetzung aus. Progesteron hingegen vermindert die IL-11 Expression. Sowohl Activin A wie auch MIC-1 stimulieren die Dezidualisierung über die Aktivierung von Smads. (Dimitriadis et al., 2005)

1.13.3 Eine reduzierte IL-11 Produktion ist mit ein Grund für ungeklärte Infertilität

Im Mausmodell wo der Rezeptor alpha für IL-11 (so genannte Knockout Mäuse) ausgeschaltet wurde, konnte gezeigt werden, dass dies die Infertilität der Mäuse bedingte (Bilinski et al., 1998; Robb et al., 1998). Deshalb wird eine entscheidende Rolle von IL-11 auch bei der Infertilität des Menschen vermutet. Dies legt eine Studie nahe, in der die IL-11 Konzentrationen von Frauen mit ungeklärter Infertilität mit den IL-11 Konzentrationen von fertilen Frauen verglichen wurden. Bei den infertilen Frauen waren die IL-11 Konzentrationen signifikant geringer als in der fertilen Vergleichsgruppe. (Dimitriadis et al., 2007)

IL-11, sowie sein Rezeptor IL-11R α und LIF (Leukaemia inhibitory factor) sind bei infertilen Frauen mit Endometriose während des Implantationsfensters herunter reguliert. (Dimitriadis et al., 2005) Die verminderte IL-11 Produktion konnte hierbei vor allem in Epithel-, nicht jedoch in Stromazellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse legen eine essentielle Rolle von IL-11 in der Implantation des Embryos ins humane Endometrium nahe.

1.13.4 IL-11 verlängert das Überleben der Zellen

IL-11 spielt in jedem Fall eine entscheidende Rolle in endometrialen Stromazellen, indem es ihr Überleben verlängert und sie vor Zellschäden während der embryonalen Implantation und Trophoblasteninvasion schützt. (Tanka et al., 2001)

1.13.5 Lokale und hormonelle Faktoren beeinflussen IL-11

Mehrere Studien haben IL-11- und seine Rezeptor –mRNA sowie das Protein selbst, in DSC in der späten sekretorischen und frühen schwangeren endometrialen Phase identifiziert. (Chen et al., 2002; Cork et al., 2002; Dimitriadis et al., 2002, 2003; Karpovich et al., 2003) Dabei wird es durch eine Kombination von Östrogen mit Progesteron in seiner Sekretion reduziert, während hingegen die alleinige Gabe von Östrogen die IL-11 Sekretion stimuliert. (von Rango et al., 2004)

Die IL-11 Sekretion wird zudem durch RLX (Relaxin) und PGE₂ (Prostaglandin E₂) während der Dezidualisierung im Menschen reguliert. (Dimitriadis et al., 2005) Somit weist man, dass sowohl lokale Faktoren wie auch Steroidhormone die IL-11 mRNA Expression und Sekretion im menschlichen Endometrium regulieren. Diese Erkenntnisse sind sehr wichtig um die Regulation der Implantation als Teil der Fertilität zu verstehen.

Ob hCG ebenfalls eine regulatorische Wirkung auf Interleukin-11 hat wurde bislang noch nicht untersucht.

1.13.6 IL-11, Prolaktin und IGF

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Produktion von IL-11 mit der Produktion von molekularen Markern der Dezidualisierung Prolaktin und IGFBP-1 korreliert. Wenn der IL-11 Rezeptor in ESC blockiert wird, sind auch diese beiden Dezidualisierungsmarker reduziert. Dies lässt ebenfalls auf eine wichtige Funktion von IL-11 während der Dezidualisierung beim Menschen schließen. (Karpovich et al., 2004)

1.13.7 Weitere Funktionen von IL-11

Die IL-11 Signale sind für die Reifung von spezifischen decidualen NK Zellen notwendig (Ain et al., 2004), ebenso wie für die Regulation der Trophoblasteninvasion im Menschen. (von Rango et al., 2004) Die Trophoblastenmigration wird hierbei über eine Aktivierung des signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) beeinflusst.

1.13.8 HCG und IL-11

Ob der Embryo in der Präimplantationsphase über die Produktion von hCG die IL-11 Sekretion beeinflussen kann konnte bislang noch nicht eruiert werden und soll deshalb in dieser Arbeit untersucht werden.

1.14 Interleukin-15

IL-15 ist ein 14-15 kDa großes Mitglied der vier α -Helix Cytokin Familie, welche auch IL-2 mit einschließt. Der Effekt von IL-15 wird über einen trimeren Membranrezeptor vermittelt, welcher auch IL-2 als Rezeptor dient. Diese IL-2 Rezeptoren verfügen über eine β - und α - Kette, welche noch eine spezifische α –Kette beinhaltet. (Dimitriadis et al., 2005)

Als mRNA existieren zwei Isoformen im Endometrium. Eine Isoform stellt ein sekretorisches Protein dar, das andere verschlüsselt die Proteinstruktur im Zytoplasma. (Verma et al., 2000)

1.14.1 Aufgabe von IL-15

IL-15 fördert die Aktivierung von Neutrophilen, Makrophagen und T-Zellen. Es kontrolliert somit die Funktion und die Versorgung von Lymphozyten. (Kang et al., 2004)

Außerdem ist IL-15 für die Entwicklung von NK-Zellen im Knochenmark verantwortlich und stimuliert hier die Proliferation und Produktion von Zytokinen. (Burton et al., 1994; Carson et al., 1994; Carson et al., 1995; Seder et al., 1995)

Darüber hinaus wurde auch eine spezifische Rolle für IL-15 in der Entwicklung von NK Zellen bei IL-15 γ -Rezeptor knockout Mäusen, welche frei von NK Zellen sind gezeigt (Miyazaki et al., 2002).

1.14.2 Parallelen zu IL-2

Das Cytokin IL-2 ist als effektiver Stimulator der Proliferation von uterinen CD56 Bright auf natürlichen Killerzellen bekannt. (Ferry et al., 1990; King et al., 1992) Dabei reguliert es VEGF-C in uNK herunter. Da sich die beiden Cytokine IL-2 und IL-15, wie oben bereits erwähnt, denselben Rezeptor (β und γ) teilen und gezeigt werden konnte, dass sie die Proliferation von uNK Zellen in vitro stimulieren, werden weitere Gemeinsamkeiten bezüglich der Wirkungsweise vermutet. (Verma et al., 2000)

IL-2 wurde allerdings nicht im menschlichen Endometrium gefunden, wohingegen IL-15 im Stroma- und im Drüsengewebe des Endometriums vorkommt. (Kitaya et al., 2000) Somit ist IL-15 ein erstklassiges Cytokin für die Stimulation der Proliferation von uNK Zellen *in vivo*, welche bei der Nidation des Embryos von entscheidender Bedeutung sind.

1.14.3 IL-15 Expression

IL-15 mRNA und IL-15 als Protein konnten in nicht schwangerem menschlichem Endometrium in der Dezidua sowie der Plazenta gefunden werden. (Kitaya et al., 2000; Okada et al., 2000b; Verma et al., 2000) IL-15 mRNA wird dabei stärker während der sekretorischen Phase und im ersten Trimenon der Schwangerschaft als in der proliferativen Phase expremiert. (Kitaya et al., 2000)

Makrophagen sind ebenso eine wichtige Quelle von IL-15 im Uterus. (Verma et al., 2000)

Obwohl es viele Unstimmigkeiten in der Literatur gibt aufgrund von Unterschieden in der Kultivierung wird davon ausgegangen, dass die IL-15 mRNA Expression und Proteinsekretion sich während der Dezidualisierung *in vitro* in endometrialen Stromazellkulturen steigert. Dabei wird entweder cAMP oder Progesteron benützt um die IL-15 Expression zu fördern. (Dunn et al., 2002; Kitaya et al., 2000; Okada et al., 2000a)

Interferon- γ scheint hierbei ein Co-Faktor zu sein, welcher die Expression zusätzlich erhöht. Als alleiniger Stimulator kann Interferon- γ jedoch nicht eingesetzt werden. Die wahrscheinlichste Quelle der Interferon- γ Produktion im Endometrium ist die uNK- Zelle. (Dunn et al., 2002)

Vom Ovar produzierte **Steroidhormone**, **TNF- α** und **TGF- β** scheinen ebenfalls als Schlüsselregulatoren bei der endometrialen IL-13 sowie IL-15 Produktion eine essentielle Rolle zu spielen. Dabei beeinflussen sie die endometriale entzündliche Immunantwort während den normalen menstrualen Zyklen und können so ihren Anteil aufgrund ihrer veränderten Expression zu Dysfunktionen bei der menstrualen Blutung und zu Endometriose leisten. (Roberts et al., 2005)

IL-1 β scheint eine entgegengesetzte Rolle als negativer Regulator in der Aktivierung von IL-15 zu haben (Okada et al., 2004) und verhindert somit abnorm hohe IL-15 Werte in der frühen Phase der Dezidualisierung. Interessanterweise wurde bei Frauen mit unerklärten, wiederholten Aborten neben Endometrium mit erhöhten Werten für IL-15, auch Endometrium mit normalen Werten für IL-15 gefunden. (Chegini et al., 2002) Dieser Zusammenhang konnte allerdings nicht in der Dezidua einer frühen Schwangerschaft gezeigt werden.

1.14.4 Aufgaben von IL-15

IL-15 und Dezidualisierung

In Zellkulturen von menschlichen ESC wurde die Produktion von IL-15 unter dem Einfluss von dezidualisierenden Stimuli nachgewiesen. (Dunn et al., 2002) Es wird deshalb angenommen, dass die IL-15 Sekretion von DSC im menschlichen Uterus die uNK zur Proliferation stimuliert. (Verma et al., 2000) Im Gegenzug dazu sekretieren die uNK Faktoren die wiederum auf die DSC wirken. Es zeigt sich auch hier eine vielfältige Interaktion, welche es näher zu erforschen gilt.

IL-15 und CD 16 (-) NK Zellen

Endogen produziertes IL-15 spielt eine zentrale Rolle in der postovulatorischen Phase des menstrualen Zyklus indem es die Rekrutierung von peripheren CD 16 (-) NK Zellen aus dem Blut ins menschliche Endometrium fördert. (Kitaya et al., 2005)

1.14.5 IL-15 und klinisch relevante Infertilität

Endometriose

Studien zu diesem Thema haben gezeigt, dass sowohl IL-13 wie auch IL-15 mRNA und Protein in ektopischem Endometriumgewebe in erhöhter Konzentration, verglichen mit normal platziertem Endometrium, vorkommt. Diese Erhöhung korreliert nicht mit einer bestimmten Phase im menstrualen Zyklus. (Chegini et al., 2003) Ebenso konnte die Präsenz von IL-13 und IL-15 in peritonealer Flüssigkeit bei Patientinnen mit Endometriose in erhöhter Konzentration gemessen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Cytokine eine Schlüsselrolle in der lokalen inflammatorischen Immunantwort haben.

Kontrazeptiva

Eine veränderte Expression von IL-15 wird als Ursache von irregulären Blutungen bei Frauen, welche gestagenhaltige Kontrazeptiva einnehmen, angesehen.

(Rhoton-Vlasak et al., 2005)

Bedeutung von IL-15 bei Patientinnen mit wiederholt fehlgeschlagenen IVF-Embryonen Transfer

Die inadäquate Steuerung von Interleukinen und die damit verbundene gestörte uterine Rezeptivität ist mit ein Grund dafür, weshalb der IVF-Embryonen Transfer bei Frauen nicht zur gewünschten Implantation des Embryos führt. Hierbei spielen vor allem IL-18 und IL-15 als lokale Faktoren der Aktivierung von uNK Zellen eine wichtige Rolle. So ist es der Eizelle ohne die Aktivierung von uNK Zellen nicht möglich in das Endometrium zu invasieren und schlussendlich zu implantieren. (Lédée-Bataille et al., 2005)

1.15 Ziel dieser Arbeit:

Den Zusammenhang von hCG und Cytokinen zu erforschen.

Über **humanes Chorion Gonadotropin (hCG)**, als eines vom Embryo gebildeten frühen Signalhormon, gibt es bereits gesichertes Wissen über dessen molekularen Aufbau und die Wirkung am Ovar bzw. Corpus luteum wie bereits oben beschrieben. Allerdings ist die vermutete parakrine embryo-endometriale Kommunikation noch wenig untersucht und erforscht worden.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der sekretorischen wie auch in der folliculären Phase des menstrualen Zyklus hCG/LH-Rezeptor mRNA exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte in Deziduazellen der Frühschwangerschaft nur verkürzte Varianten der Rezeptor mRNA gemessen werden.

Die Gabe von hCG (500 IU/ml) bewirkte in vivo eine signifikante Inhibition von intrauterinem IGFBP-1 und M-CSF, während hingegen LIF, VEGF und MMP-9 signifikant herunter reguliert wurden. (Licht et al., 2007)

HCG reduziert zudem die Konzentration an IGF-I selektiv und ist deshalb entscheidend an der Modulation der endometrialen Rezeptivität und Differenzierung während der frühen Implantation des Embryos beteiligt. (Fluhr et al., 2007)

Ein weiterer Beweis für die regulatorische Funktion von hCG während der Implantation konnte in Bezug auf MMP/TIMP (matrix metalloproteinases-2 und -9 /tissue inhibitor of metalloproteinases) System gefunden werden. Die Sekretion von MMP von Seiten der Trophoblasten ist erhöht, während hingegen die endometriale TIMP Expression unter dem Einfluss von hCG reduziert wird. (Fluhr et al., 2008)

In Vivo wird die Dezidualisierung von Progesteron induziert und schließt das Auftreten von natürlichen uterinen spezifischen Killerzellen, welche durch die Expression von CD56 charakterisiert sind mit ein. Ergänzend dazu wird ebenfalls Interleukin-15 sekretiert, (Dunn et al., 2002) wobei offen bleibt, ob diese Sekretion ebenfalls durch die Wirkung von hCG hervorgerufen wird.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass hCG unterschiedlich direkte Effekte auf das Endometrium hat, welche eingehender zu erforschen sind. Welche Beteiligung hat hCG an der Dezidualisierung und an der endometrialen Aktivität? Diese Frage ist nach wie vor offen und ihr soll in dieser Arbeit nachgegangen werden. Deshalb wurde die Wirkung von hCG auf endometriale Stromazellen *in vitro* während der Dezidualisierung auf die von den Stromazellen gebildete Konzentration an Interleukin 11 und Interleukin 15 untersucht. Und zwar sowohl auf DNA,- wie auch auf Proteinebene.

1.16 Konkrete Fragestellung und experimentelles Vorgehen:

Hat hCG einen Einfluss auf IL-11 sowie IL-15 in dezidualisierten humanen endometrialen Stromazellen?

Dazu wurden endometriale Stromazellen *in vitro* dezidualisiert um anschließend mit 0-100 U/ml für 24 und 48 h inkubiert zu werden.

Die mRNA-Expression wurde danach mittels real- time PCR für IL-11 und IL-15 gemessen.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe von ELISA gemessen.

2 Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller	Firmensitz
ABI Prism 7000 Sequence Detection system Real time PCR Gerät	Applied Biosystems	Foster City; CA; USA
Autoklav	H & P Labortechnik	Oberschleißheim
Eismaschine AF-20	Scotsman	COTECH, England
ELISA Messgerät Sunrise	Tecan	Crailsheim
Kühlschrank	Robert Bosch GmbH	Stuttgart
Magnetrührer/Thermomixer	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik	Staufen
Mikroskop Fluovert FU	Leitz/Leica	Wetzlar
Mikrozentrifuge UEC	Qualitron,	Korea
Multistepper Multipette	Eppendorf AG,	Hamburg
Multistepper Multipette plus	Eppendorf AG,	Hamburg
pH-Meter MP225	Mettler Toledo	Indien
Peltier Thermal Cycler DNA Engine DYAD™ MJ Research	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
Photometer	Eppendorf AG	Hamburg
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg
Pipetten P10, P100, P200, P1000	Glison	Middleton, WI; USA

Pipettierhilfe Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Schüttler und Inkubator Titramax 1000	Heidolph Instruments	Schwabach
Thermomixer compact	Eppendorf AG	Hamburg
Vortexgerät MS1 Minishaker	IKA®	Staufen
Vortexer-Genie™	Bender und Hobein AG	Zürich; Schweiz
Waage	Sartorius AG	Göttingen
Waschgerät für 96-well- Platten	Tecan,	Crailsheim
Wasserbad, beheizbar	GFL®	Burgwedel
Werkbank (steril) Hera safe	Heraeus/Kendro	Osterode
Zellkultur-Inkubator	Binder	Tuttlingen
Zentrifuge Mulifuge 3 S-R	Heraeus/Kendro	Osterode
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus/Kendro	Osterode
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus/Kendro	Osterode

Tabelle 2: Geräteliste

2.1.2 Laborzubehör/Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller	Firmensitz
0,2 ml PCR Strips	Biozym	Hessisch Oldendorf
0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf	Hamburg
15 ml; 50 ml Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
20 ml Spitze	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
5; 10 und 25 ml sterile Kunststoffpipetten	Falcon® Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes; NJ; USA
6-, 12-, 24-well-Platten	BD, Greiner Bio-One GmbH, Costar	Falcon; GB , Frickenhausen, Schiphol; Belgien
8-well-Streifen für ELISA	R&D Systems GmbH	Wiesbaden
96-well-PCR-Platte	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Abdeckfolie für 96-well-Platte	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Handschuhe Latex	Derma-clean	Malaysia
Microtubes	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
Millicell Zellkultureinsätze PICMO	Millipore	Billerica; MA; USA
Neubauer-Zählkammer	Multimed Wicker	Kirchheim Teck
Objektträger	R. Langenbrinck	Emmingen
Parafilm „M“	American National Can™	Chicago; USA
Pasteur-Pipette, 250 mm	WU-Mainz	Mainz

Pipettspitzen, in diversen Größen	Biozym, Greiner Bio-One GmbH, Costar	Hessisch Oldendorf, Frickenhausen, Schiphol; Belgien
Sterile Petrischale aus Glas	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Sterile Pinzette		
Steriler Filter 180 µm:	Millipore	Billerica; MA; USA
Steriler Filter 40 µm Falcon	Biosciences Discovery Labware	Bedford; MA; USA
Steriles Skalpell	Feather Safety	Japan
Zählhilfe	IVO	Villingen-Schwenningen
Zellkulturflaschen, 75 cm²	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Tabelle 3: Laborzubehör und Verbrauchsmaterial		

2.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller	Firmensitz
75% Ethanol (100% Ethanol (absolut reinst) mit dd H₂O (Ampuwa) verdünnt)	Merck	Darmstadt
Aktivkohle gefiltert	Roth	Karlsruhe
Ampuwa= ddH₂O	Fresenius Kabi	Bad Homburg
Chloroform, reinst	AppliChem GmbH	Darmstadt
Dextran T 70	Roth	Karlsruhe

Dulbecco-PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺)	Gibco	Paisley; UK
Ethanol absolut zur Analyse	Merck	Darmstadt
FCS	Biochrom KG	Berlin
Gentamycin Sulfate	Cambrex	Walkersville; MD; USA
Isopropanol, p.a.	Merck	Darmstadt
Kollagenase 200 U/mg: 0,5 % Kollagenase in DMEM/F-12 (ohne Zusätze) ansetzen und 5 ml-Aliquots bei -20 °C aufbewahren.	Biochrom	Berlin
Methanol zur Analyse	Merck	Darmstadt
PBS, steril, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺	Gibco	Paisley; UK
Reagent Diluent: 1% BSA in PBS	Sigma-Aldrich	München
Stop-Lösung: 2N Schwefelsäure H₂SO₄		
Substrat: 1:1 Mischung aus Color Reagent A und B	R&D Systems GmbH	Wiesbaden
TriFast™	PeqLab	Erlangen
TRIZOL®	Invitrogen	Karlsruhe
Trypanblau 0,4 %	Gibco	Paisley; UK
Trypsin-EDTA	Gibco	Paisley; UK
Waschpuffer: 0,05% Tween in PBS		

Zellkulturmedium DMEM/F-12 ohne Phenol-Rot	Gibco	Paisley; UK
Tabelle 4: Chemiekalien		

2.1.4 Verwendete molekularbiologische Reagenzien

Name	Hersteller	Firmensitz
17 β -Östradiol E 2758	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
Progesteron P 8783	Sigma	Deissenhofen
Programm: Primer Express® Software v2.0	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
rekombinantes hCG (C6322)	Sigma	Diessenhofen
Inhalt der Kits:		
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Primer forward und reverse; Arbeitslösung 6 μ M (3 μ l Stocklösung (250 μ M) + 122 μ l dd H ₂ O)	Invitrogen	Karlsruhe
RNase Inhibitor	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
IL-11		
Capture Antibody	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Detection Antibody	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Standard	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
IL-15		

Capture Antibody	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Detection Antibody	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Standard	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Streptavidin-HRP	Applied Biosystems	Foster City, CA; USA
Tabelle 5: Reagenzien		

2.1.5 ELISAs

Name	Hersteller	Firmensitz
R&D Duo Set ELISA kit human IL-11 (DY218)	R&D Systems GmbH	Wiesbaden
R&D Duo Set ELISA kit human IL-15 (DY247)	R&D Systems GmbH	Wiesbaden
Tabelle 6: ELISAs		

2.1.6 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.

2.1.6.1 Humanes β -actin

forward: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'
reverse: 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

2.1.6.2 IL-11

forward: 5'-TCTCTCCTGGCGGACACG-3'
reverse: 5'-AATCCAGGTTGTGGTCCCC-3'

2.1.6.3 IL-15

forward: 5'-AAGTGATGTTCACCCCAGTTGC-3'
reverse: 5'-GCATCTCCGGACTCAAGTGAAA-3'

2.1.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die GraphPad PRISM Software Version 4 verwendet. Die Daten wurden mit einer „one-way“ Analyse der Varianz und anschließendem „Dunnett's multiple comparison test“ oder „Bonferroni's multiple comparison test“ ausgewertet.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeproben

Im Rahmen von Hysterektomien bei gesunden prämenopausalen Frauen an der Universitätsfrauenklinik Tübingen wurde endometriales Stroma- und Drüsengewebe gewonnen, um als physiologisches Endometrium als Modell für die Wirkung von hCG auf eben solches Gewebe dienen zu können.

Dabei wurden die Uteri der Patientinnen nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Die Patientinnen sollten sich in der Prämenopause befinden. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass die Hysterektomie nicht aufgrund einer malignen Erkrankung, Endometriose, zystischen Veränderungen, Polypen oder Hyperplasien durchgeführt wurde. Die Patientinnen sollten in den letzten 3 Monaten vor der OP keine Hormonpräparate und auch kein Intrauterinpessar zur Kontrazeption verwendet haben. Somit bestand das Patientinnenkollektiv vor allem aus Frauen bis ca. zum 50. Lebensjahr höchstens 53 Lebensjahr, die wegen Uterus myomatosus oder einer Senkungsproblematik hysterektomiert wurden. Dabei wurde nicht zwischen vaginalem, abdominalem Vorgehen oder laparoskopisch assistierter totaler Hysterektomie (LATH) bzw. laparoskopisch suprazervikaler Hysterektomie (LASH) differenziert. Die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät willigte in die Durchführung dieser Arbeit ein, mit der Auflage, dass alle Patientinnen von der Weiterverwendung ihrer Uteri aufgeklärt werden und dazu schriftlich ihre Einwilligung geben.

2.2.2 Aufbereitung und Präparation der Präparate in endometriale Stromazellen (ESC)

Vorbereitungen:

DMEM/F-12 wurde mit 10 % FCS und 1% Gentamycin angesetzt und im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Präparation:

Das Gewebe wurde nach Entnahme durch den Pathologen in ein gekühltes (4°C) DMEM/F-12 überführt und wenn möglich sofort weiterverarbeiten oder bei 4 °C max. 12 h gelagert. Die Weiterverarbeitung erfolgte in einer Petrischale. Zuerst wurde das Transportmedium abgesaugt und gleichzeitig darauf geachtet, dass möglichst kein Gewebe verloren ging. Anschließend entfernte man mit dem sterilen Skalpell Blutkoagel und Myometriummreste. Das Gewebe wurde daraufhin mit 10 ml PBS gewaschen und in ca. 1 mm³ große Stücke zerteilt. Zum Verdau des Gewebes, d.h. um die Stromazellen zu vereinzeln und diese vom Epithel abzutrennen, wurden die Gewebestücke in 5 ml 0,5 % Kollagenase inkubiert und zwar bei 37°C im Brutschrank. Alle 15 Minuten war vorsichtiges und gründliches auf- und abpipettiert notwendig um das Gewebe weiter zu zerkleinern. Die Inkubation wurde beendet wenn das Gewebe homogen und verdaut erschien. Nach Zugabe von 5 ml DMEM/F-12 und Filtration des Gewebeverdaus durch einen 180 µm Filter in ein 50 ml-Röhrchen, wurde mit 10 ml PBS langsam und gründlich nachgespült. Das im Filter verbliebene Material wurde verworfen. Im Durchfluss befanden sich jetzt nur noch endometriale Stromazellen (ESC) und endometriale Epithelzellen (EEC). Diese wurden nochmals filtriert, sodass sich im Durchfluss nur noch die ESC und auf dem Filter die EEC befanden.

Getrennte Aufbereitung von Stromazellen

Der Durchfluss mit den ESC wurde nun 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 2 ml DMEM/F-12 (mit 10% FCS und 1% Gentamycin) gelöst. Die 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau in einem 0,5 ml Eppendorf Cup vermischt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Nun konnten die Zellen auf Vitalität geprüft und gezählt werden. Bei zu hoher Zelldichte (>50 Zellen pro Zählquadrat) wurde nochmals eine Probe aus der Zellsuspension entnommen und nach der Verdünnung mit PBS erneut gezählt. Nun erfolgte die Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen: Pro Flasche (75 cm²) ca. 2×10^6 Zellen in 10 ml DMEM/F-12 (mit 10% FCS und 1% Gentamycin). Nach circa einer Stunde erfolgte der erste Mediumwechsel um Verunreinigungen durch Epithelzellen, Leukozyten und Erythrozyten zu reduzieren. Dabei wurde gleichzeitig unter dem Mikroskop die Adhärenz der ESC geprüft.

Versorgung von endometrialen Stromazell-Kulturen

Vorbereitungen:

DMEM/F-12 wurde mit FCS und 1% Gentamycin angesetzt und eventuell angegebene Zusätze hinzugefügt, sowie im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Mediumwechsel bei ESC

Das verbrauchte Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dazu gab man nun frisches DMEM/F-12 mit angegebener Konzentration FCS und 1% Gentamycin. Bei einer 75 cm² Flasche benötigte man 10 ml, bei einer 6-well-Platte 2 ml pro well. Entsprechend dann bei einer 12-well-Platte 1ml pro well und bei einer 24-well-Platte 500 µl pro well.

Subkultivierung

Vorbereitungen:

DMEM/F-12 wurde mit der angegebenen Konzentration FCS und 1 % Gentamycin angesetzt und im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Ebenso wurde PBS und Trypsin-EDTA im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Subkultivierung:

Zur Subkultivierung von ESC-Kulturen saugte man zuerst das verbrauchte Medium ab. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (10 ml für eine 75 cm²-Zellkulturflasche) gewaschen. Danach kam Trypsin/EDTA (2 ml für eine 75 cm²-Zellkulturflasche) dazu und die Kultur wurde für 10 Minuten in den Brutschrank gestellt. Unter dem Mikroskop prüfte man, ob sich alle Zellen vom Boden abgelöst hatten. Wenn ja wurde die Kultur nochmals in den Brutschrank gegeben und mit der Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden abgespült. Nun konnte DMEM/F-12 mit 10 % FCS und 1 % Gentamycin zu 8 ml pro 75 cm²-Zellkulturflasche zugegeben werden. Nachdem der Boden gründlich abgespült war und die suspendierten Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt waren, wurde die Kultur bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand konnte danach vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 2-5 ml, je nach Größe des Pellets, DMEM/F-12 gelöst werden. 10 ml der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau in einem 0,5 ml Eppendorf Cup vermischt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Hier konnte man die Zellen auf Vitalität prüfen und die Zellzahl bestimmen. Bei zu hoher Zelldichte, also mehr als 50 Zellen pro Zählquadrat, wurde nochmals eine weitere Probe aus der Zellsuspension entnommen und nach der Verdünnung mit PBS erneut gezählt. Um eine Konzentration von 2×10^5 ESC pro ml einzustellen gab man weiteres DMEM/F-12 hinzu. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 6-well, 12-well oder 24-well Platten je nach Menge der Zellkulturmedien. Dabei wurde zuerst die Zellsuspension pro well 2 ml, 1 ml oder 0,5 ml vorgelegt. Anschließend gab man die entsprechende Menge an Zellsuspension 4×10^5 ESC, 2×10^5 ESC oder 1×10^5 ESC dazu (siehe Tabelle 7).

Kulturgefäß	75 cm²- Flasche	6-well- Platte	24-well- Platte	48-well- Platte	96-well- Platte
Mediummenge	10 ml	1,5 ml pro well	750 µl pro well	210 µl pro well	150µl pro well
Zellzahl pro well	2x10 ⁶	150.000	100.000	50.000	50.000
Tabelle 7: Mediummengen und Zellzahl für bestimmte Kulturflaschen und - platten					

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.

Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen

Als Dezidualisierung wird, wie oben bereits im Detail beschrieben, die Differenzierung endometrialer Stromazellen in der Lutealphase bezeichnet, die vor allem unter dem Einfluss von Progesteron steht. In dieser Phase bereitet sich das Endometrium auf eine eventuelle Implantation des Embryos vor.

Im *in vitro* Modell wurde dieser Zustand durch Inkubation für 9 Tage mit 30 nM Östradiol und 1 µM Progesteron (EP) erreicht. Die Dezidualisierung erfolgte in Anlehnung an Irwin et al. (1989) und wurde in 24 well-Platten mit 1x10⁵ ESC durchgeführt.

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 % Gentamycin) 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 % Gentamycin), 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 2.2.3 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 μ l frisches Medium pro well zugegeben.

24h-Entzug von Progesteron und 17 β -Östradiol

Die Zellen wurden zunächst 3 Tage mit Kontrollmedium (DMEM/F-12 mit 5 % FCS und 1 % Gentamycin) behandelt. Anschließend wurden die Zellen 9 Tage lang mit Zellkulturmedium (DMEM/F-12 mit 5 % FCS und 1 % Gentamycin) unter Zugabe von 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol dezidualisiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Am Tag 9 bekamen 4 wells für weitere 24 Stunden Zellkulturmedium mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol und 4 wells Kontrollmedium. 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Gewinnung der Proben zur RNA-Isolation wie unter 2.2.3 beschrieben.

Stimulation mit humanem Choriongonadotropin

Die rekombinante hCG-Stocklösung hatte eine Konzentration von 1.000 mU/µl in DMEM/F-12. Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit Lösungen in den Konzentrationen 100, 10, 1 und 0,1 mU/µl hergestellt. Um eine Konzentration von 100 mU/µl zu erhalten wurden 35 µl Stocklösung in 315 µl DMEM/F-12 gelöst. Für die darauffolgenden Verdünnungen von 10, 1 und 0,1 mU/µl wurden jeweils 35 µl der entstandenen Verdünnung wiederum in 315 µl DMEM/F-12 gelöst. Die Inkubationsmedien in den Konzentrationen 0, 10, 100, 1.000, 10.000 und 100.000 mU/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 bzw. 48 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 2.2.3 beschrieben gewonnen.

2.2.3 Probengewinnung bei ESC

Zellkulturüberstände

ESC- Zellkulturüberstände wurden in 24-well Platten überführt. Dabei wurde 0,5 ml Medium folgendermaßen auf die wells verteilt: Pro well wurden 2 Aliquots mit je 250 µl Zellkulturüberstand abgefüllt und die Platten anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Die EEC-Zellkulturüberstände hingegen wurden von den Zellkultureinsätzen in 24-well-Platten überführt. Dazu wurde pro well 2 Aliquots mit je 200 µl Kulturmedium außerhalb des Zellkultureinsatzes abgefüllt und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

Probengewinnung für die RNA-Isolation

Vorbereitungen:

DMEM/F-12 wurde mit FCS und 1% Gentamycin angesetzt und im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. PBS und Trypsin-EDTA wurden ebenfalls im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Methodik:

ESC in 24-well-Platten

Aus den ESC wells wurde zunächst das restliche Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 500 ml PBS pro well gewaschen. Pro well gab man 100 µl Trypsin-EDTA hinzu und stellte die Kultur für 10 Minuten in den Brutschrank. Damit sich die Zellen vollständig ablösten, gab man noch 500 µl DMEM/F-12 pro well hinzu. Anschließend konnte der Boden gründlich ab gespült werden und die suspendierten Zellen in ein 2 ml Eppendorf Cups überführt werden, um sie danach 10 Minuten bei 4°C mit 10.000 U/min zentrifugiert zu können. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und das Pellet in 500 µl TriFast oder TRIZOL aufgenommen. Die Proben wurden nun wieder bei -80°C gelagert und frühestens nach 24 h mit der RNA-Isolation begonnen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolation

Vorbereitungen:

Alle verwendeten Reagenzien müssen auf 4°C gekühlt sein. Ebenso sollte die Tischzentrifuge auf 4°C gekühlt sein und das Wasserbad auf 55-60°C vorgeheizt.

Weitere Hinweise:

Wenn nicht anders angegeben erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

Reagenzien	
TriFast/TRIZOL:	500 µl für ein Zellpellet aus einem konfluenten well einer 6-, 12- oder 24-well-Platte
Chloroform:	100 µl pro 500 µl TriFast/TRIZOL
Isopropanol:	250 µl pro 500 µl TriFast/TRIZOL
75% Ethanol:	500 µl pro 500 µl TriFast/TRIZOL
Tabelle 8: Reagenzien für RNA-Isolation	

Methodik:

Das in 500 µl TriFast/TRIZOL bei -80°C eingefrorene Zellmaterial wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Hinzu kamen 100 µl Chloroform. Zunächst wurde 15s vorgetextet. Bei Raumtemperatur musste nun eine 5 Minuten lange Inkubation abgewartet werden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 12.000 U/min 15 Minuten lang bei 4°C. Die obere wässrige Phase (ca. 300 µl) wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Cup überführt. Dabei wurden Verunreinigungen durch die Interphase vermieden. Die untere Phenol-Chloroform-Phase und die Interphase wurden verworfen. Nach Zugabe von 250 µl Isopropanol wurde gründlich geschüttelt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde nochmals für 10 Minuten bei 12.000 U/min bei 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Gefäßrand vorsichtig trocken getupft. Nach Zugabe von 500 µl 75 % Ethanol wurde erneut für 6 Minuten bei 4°C mit 8.000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der Pellet bei Raumtemperatur trockenen gelassen (ca. 10 Minuten, da es nicht vollständig austrocknen soll). 4 µl ddH₂O mit 4°C wurden nun dazugegeben und der Pellet darin gelöst. Als nächstes wurden 2 µl zur Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen und mit 48 µl ddH₂O auf die Meßverdünnung von 1:25 eingestellt. Die gelöste RNA wurde auf 4 Aliquots verteilt. Jetzt konnte die RNA bei -80°C gelagert werden. Allerdings sollte wiederholtes Auftauen und Einfrieren der RNA vermieden werden, was durch die Markierung von aufgetauten Aliquots berücksichtigt wurde.

RNA-Messung mit dem Photometer

Die Verdünnung wurde auf 2 µl und 48 ml eingestellt. Die Maßeinheit beträgt somit µg/µl. Vor Ablauf der Messung muss das Photometer mit ddH₂O Leerwert geeicht werden. Zwischen den Messungen wurde die Küvette immer gründlich mit ddH₂O abgespült. A_{260} sollte >0,01 sein. Ansonsten war eine erneute Messung mit geringerer Verdünnung indiziert. Jetzt konnte die RNA-Konzentration und Ratio (A_{260}/A_{280}) dokumentiert werden.

2.2.4.2 Reverse Transkriptions-Reaktion / RT-Reaktion

Bei der Reaktion der reversen Transkription (RT) wird RNA in cDNA (complementary DNA) durch das Enzym reverse Transkriptase umgewandelt. Die reversen Transkriptasen sind RNA-abhängige 5'-3'-DNA-Polymerasen, die aus Retroviren (z.B. avian myoblastosis virus) isoliert wurden. Mit Hilfe der 5'-3'-DNA-Polymerase wird ausgehend von Oligonukleotid-Primern (Random Hexamere) zelluläre mRNA in komplementäre cDNA umgewandelt, die dann z. B. in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden kann.

Bei der reversen Transkription der RNA können je nach Wahl der Oligonukleotidprimer für die RT ausschließlich die gewünschte RNA umgeschrieben werden.

Vorbereitungen:

Die RNA Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut, ebenso wie die anderen Reagenzien (RT-Buffer, dNTPs, Random Hexamer, Multi Scribe RT, dd H₂O). Das Probenvolumen wurde nach folgender Gleichung berechnet:

Probenvolumen mit 500 ng RNA + dd H₂O = 10 µl

Hinweis:

Wenn nicht anders angegeben erfolgten alle Schritte auf Eis. Der RNase-Inhibitor und die Reverse Transcriptase wurden hingegen immer bei -20 °C belassen und nur zum Pipettieren kurz auf Eis gehalten.

Herstellen des Reaktionsansatzes:

Aus den Reagenzien wurde ein Master-Mix hergestellt. Dieser bestand aus:

Reagenzien	pro Reaktion
10x RT Buffer	3 µl
25x dNTPs	1,2µl
10x Random Hexamers	3µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0,6 µl
MultiScribe RT (50 U/µl)	1,5 µl
dd H ₂ O	10,7µl
RNA 500 ng	x µl
dd H ₂ O	(10-x) µl
Gesamtvolumen	30 µl
Tabelle 9: Reagenzien für RT-Reaktion	

War der Master Mix zusammengestellt wurde er zu je 20 µl in die PCR-Tubes vorgelegt. Dazu gab man die dd H₂O in der jeweils berechneten Menge, sodass das Probenvolumen insgesamt stets 10 µl betrug. Zuletzt kamen die RNA Proben hinzu, sodass das Gesamtvolumen 30 µl betrug.

RT-Reaktion:

Die RT-Reaktion wurde mir Hilfe des Programms RT ABI bei 25°C 10 min und bei 37°C 120 min durchgeführt. Anschließend wurden in alle Proben jeweils 60 µl dd H₂O zugegeben und die cDNA Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion, auch kurz als PCR bezeichnet, ist es möglich bestimmte DNA-Sequenzen millionenfach selektiv zu vervielfältigen. Die Spezifität dieser Reaktion für eine ausgesuchte Sequenz in der Ziel-DNA wird durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotidprimern erreicht, die die ausgesuchte Sequenz sowohl auf dem (+), als auch auf dem (-)Strang der Ziel-DNA begrenzen.

Die PCR kann in drei Schritte unterteilt werden:

1. Denaturierung
2. Annealing
3. Elongation

Das **Aufschmelzen** oder **denaturieren** der Ziel-DNA in zwei Einzelstränge erfolgt aufgrund der Erhitzung des Reaktionsgefäßes. Bei erniedrigter Temperatur lagern sich die Oligonukleotidprimer an ihre komplementären Sequenzen in der DNA an (**annealing**) und die zugesetzte DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von beiden Primern neue DNA-Stränge (**elongation**). Die einzelnen Vervielfältigungsschritte können in einem Reaktionsansatz mehrfach wiederholt werden, da durch die Thermoresistenz der verwendeten DNA-Polymerase die neusynthetisierten DNA-Stücke aufgeschmolzen werden können ohne die Polymerase durch die Erhitzung zu zerstören. Die in der Lösung im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer lagern sich erneut entweder an die parentalen DNA-Stränge oder an die neusynthetisierten Stränge an. Die Taq-Polymerase (von dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammende hitzestabile Polymerase) kann erneut den Ziel-DNA-Bereich synthetisieren. Nach einer 40fachen Wiederholung dieses Zyklus liegen etwa 1 Milliarde Kopien der ausgesuchten DNA-Sequenz vor. Das Produkt der Amplifikation kann gemessen werden.

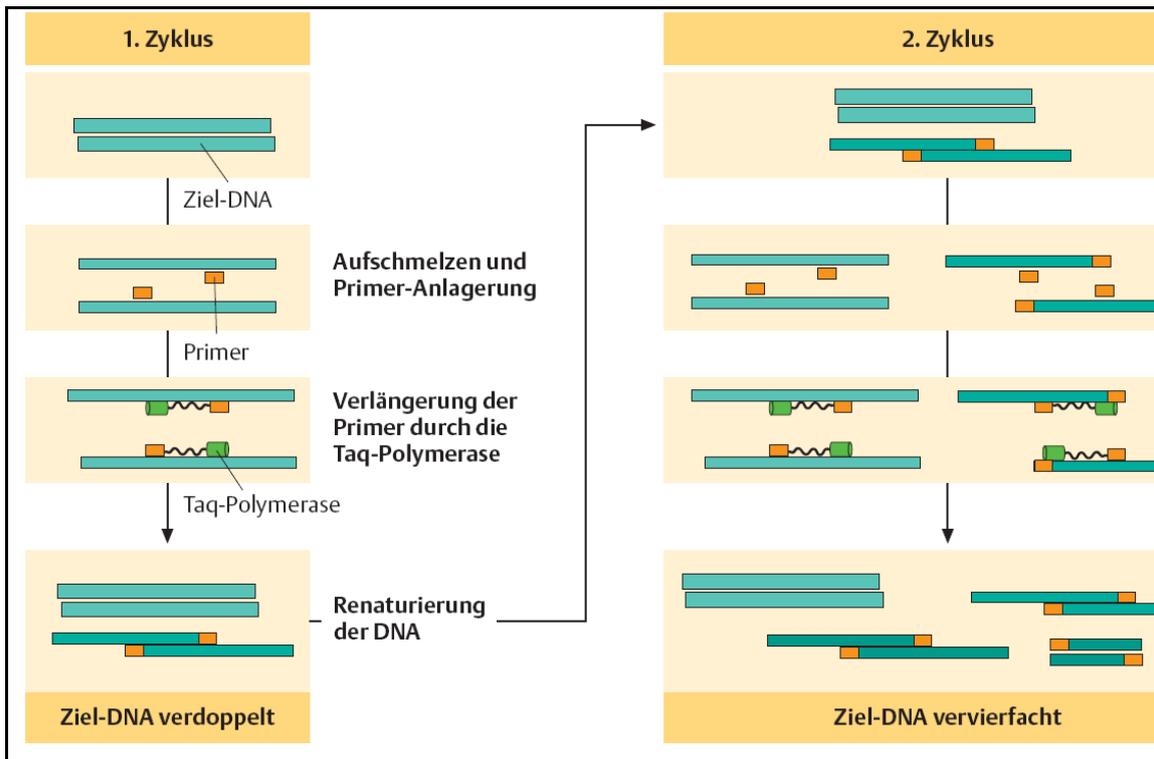


Abb. 13: Ablauf der Polymerasekettenreaktion

Quelle: Herbert Hof, Rüdiger Dörries; Medizinische Mikrobiologie 3. Auflage
 Thieme Verlag

2.2.4.3.1 Real-time PCR

Die **realtime Polymerase Ketten Reaktion (rt-PCR)** dient ebenso wie die herkömmliche PCR der Amplifikation von cDNA Abschnitten. Der Ablauf dieser Amplifikation findet in einem Thermocycler statt. Der Vorteil der real-time PCR gegenüber der konventionellen PCR ist, dass die Geschehnisse im PCR-Röhrchen real, d.h. zyklusweise, mit verfolgt werden können. Das Prinzip beruht darauf, dass ein Fluoreszenzfarbstoff (z.B. SYBR® Green) zu dem PCR-Ansatz dazu gegeben wird, der in doppelsträngiger DNA interkaliert. Während der einzelnen Zyklen wird die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffs gemessen, wodurch die DNA-Menge der Probe quantifiziert werden kann.

In frühen PCR-Zyklen findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt, an die sich ein Plateau zum Ende hin anschließt. Mit Hilfe des Computerprogramms kann der Verlauf der PCR graphisch als Kurve (vgl. Abb. 14) mit x =Zykluszahl und y = relative Fluoreszenzintensität dargestellt werden. Für die Quantifizierung ermittelt das Computerprogramm einen Schwellenwert.

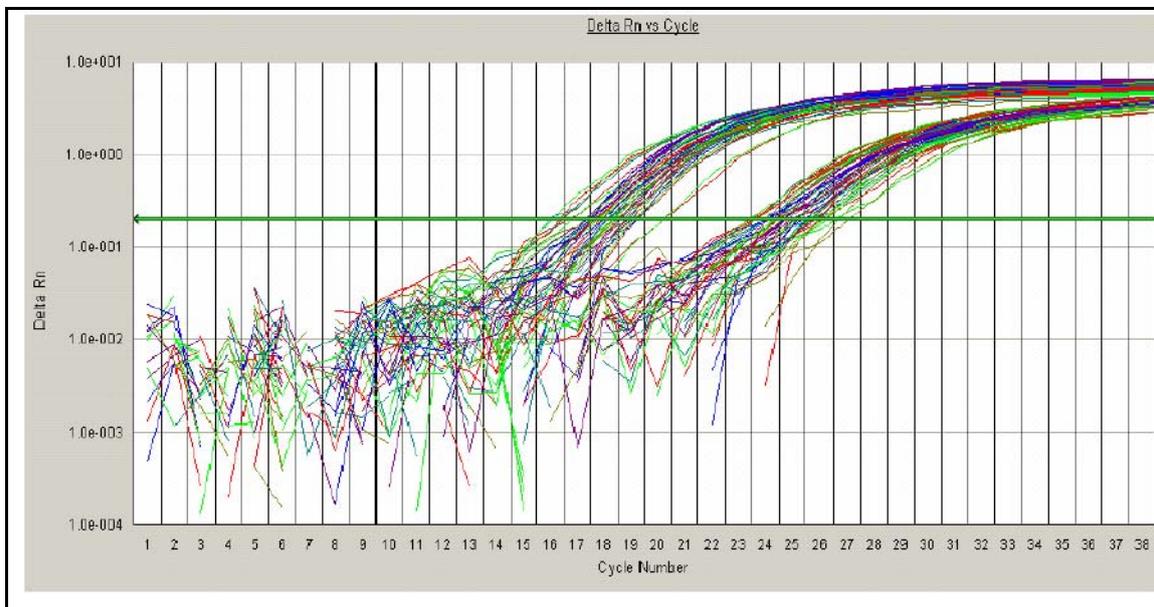


Abb. 14: Amplifikationskurve

Die RNA für das „housekeeping“-Protein β -Aktin wird nach ungefähr 17 Zyklen amplifiziert und das zu untersuchende Protein Interleukin 11 erst später ab Zyklus 24.

2.2.4.3.2 Ct-Wert (Threshold-Cycle)

Der Ct-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.

Der Ct-Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Kurve mit dem Schwellenwert. Wenn bekannt wäre, wie stark die Vermehrungsrate ist, könnte auf die ursprüngliche Templatmenge zurück geschlossen werden. Da dies aber nicht der Fall ist, wird eine Kontrolle (housekeeping Protein) verwendet. 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 IL-11 und IL-15 zu ermitteln. IL-11 und IL-15 wurden gleich effizient amplifiziert wie β -Actin.

Der Ct-Wert kann nun wie folgt errechnet werden: Der Ct- Wert der Kontrolle wird von den Ct-Werten der jeweiligen Probe abgezogen, wodurch ΔCt entsteht. Die relative Menge an vorhandener cDNA wird als $2^{-\Delta Ct}$ ausgedrückt. Da hierbei die relativen Expressionsraten von IL-11 und IL-15 bezogen auf die Expression von β -Actin mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode verglichen wurde, spricht man auch von der vergleichenden C_T -Methode zur relativen Quantifizierung (Livak et al., 2001).

2.2.4.3.3 Durchführung

Vorbereitungen:

Die cDNA-Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und dann auf Eis gestellt, ebenso wurde mit den Primern verfahren.

Hinweise:

Alle der folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Reaktionsansatz:

Der Master-Mix bestand aus SYBR Green PCR Master Mix von Applied Biosystems, welcher im Kühlschrank bei +5 aufbewahrt wurde, Primer forward und reverse plus dd H₂O.

Der Master-Mix wurde für jedes Primerpaar separat hergestellt und wurde wie folgt berechnet:

Für die Durchführung der PCR wurde ein Master Mix hergestellt, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Reagenzien	
SYBR Green PCR Master Mix	5 µl
vorwärts Primer (6 µM)	0,5 µl
rückwärts Primer (6 µM)	0,5 µl
dd H₂O	1 µl
Tabelle 10: Master Mix für die PCR	

Danach wurde der Master Mix zu jeweils 7 µl in die entsprechenden wells vorgelegt. Dazu kamen dann jeweils 3 µl cDNA. Danach wurde die 96-well-PCR-Platte mit Abdeckfolie verschlossen und zentrifugiert.

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler. 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 (vgl. Abb. 15) 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, während dessen es zur Denaturierung des amplifizierten Produkts kam. Anhand der so ermittelten Schmelztemperaturen T_M konnte die Spezifität der abgelaufenen Amplifikation festgestellt werden.

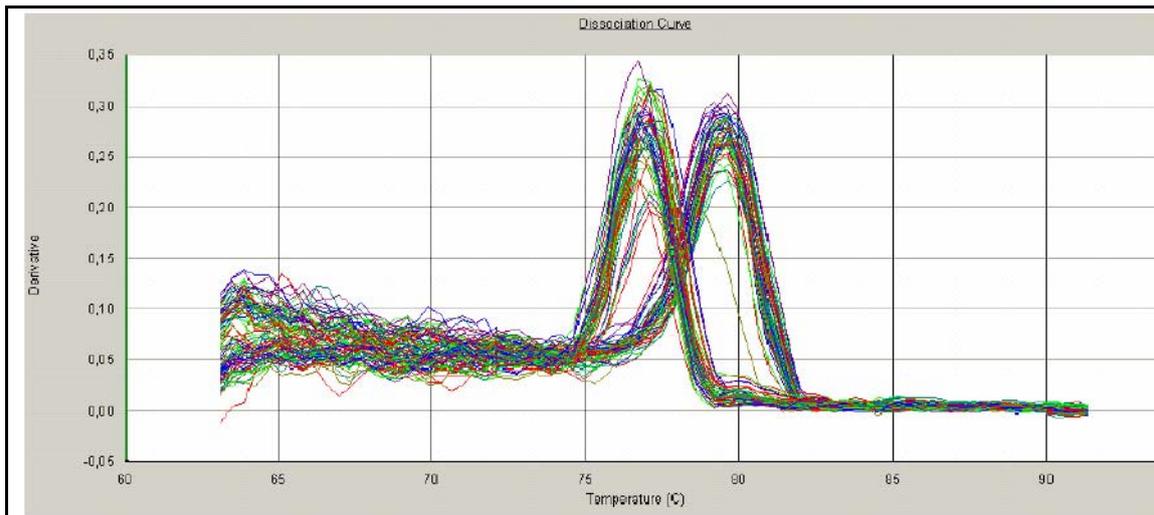


Abb. 15: Schmelzkurve

Darstellung einer charakteristischen Schmelzkurve einer real-time PCR. Die Schmelzkurve bei ungefähr 79°C ist von dem „housekeeping“ Protein β -Aktin, die Schmelzkurve bei ungefähr 76°C ist von Interleukin 11.

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der **Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)** bzw. **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren (**Assay**), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der ELISA gehört zur Gruppe der Immunassay-Verfahren. Mit Hilfe des ELISA können grundsätzlich Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (**Antigen**) binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das sogenannte Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, in der Regel durch Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Die von uns verwendete ELISA Technik wird auch als **Sandwich-ELISA** bezeichnet, da zwei Antikörper (**Ak**) verwendet werden, welche beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (**coating**-Antikörper) wird an eine feste Phase (in unserem Fall an eine spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am (**coating**-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(**detection**)-Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein

Enzym gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der **Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex** (deshalb der Name Sandwich-ELISA - das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein zum Enzym passendes Substrat (**Chromogen**) zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz erfolgen kann. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten. (Quelle: www.wikipedia.de)

Im Falle von alkalischer Phosphatase wird als Chromogen z.B. *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht *p*-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

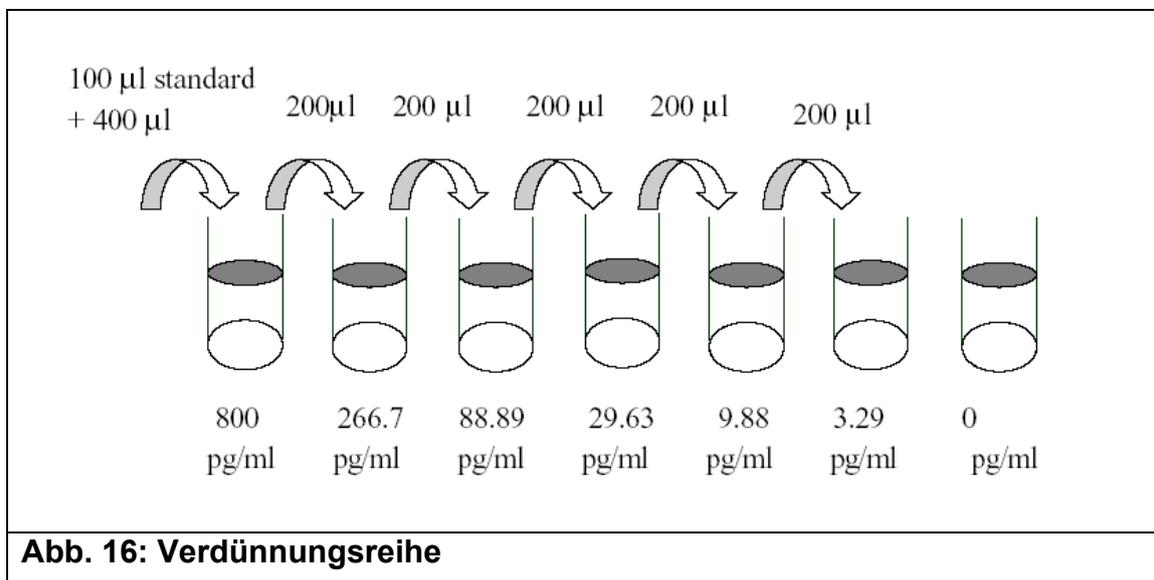
2.2.5.2 R&D DuoSet ELISA kit human IL-11 (DY218)

Durchführung am Tag 1

Die gewünschte Anzahl an 8-well-Streifen wurde beschriftet und in einem Ständer platziert. Der Capture Antibody working solution wurde vorbereitet (pro well werden 100 µl benötigt plus 10 % Pipettierreserve). In jedes well wurden 100 µl Capture Antibody working solution pipettiert. Anschließend wurde die Inkubation bei Raumtemperatur über mindestens 12 Stunden durchgeführt.

Durchführung am Tag 2

Alle wells wurden 3x mithilfe der automatischen ELISA-Waschmaschine mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde in jedes well 300µl Reagent Diluent pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin war eine erneute 3 malige Waschung nötig. Nachdem die Proben langsam auf Eis aufgetaut waren wurden die Standards nach folgender Verdünnungsreihe hergestellt



Nun konnte in jedes well 100 µl Probe bzw. Standard pipettiert werden und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Daraufhin war eine erneute 3 malige Waschung erforderlich. Die Detection Antibody solution wurde vorbereitet und in jedes well 100 µl davon pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde erneut eine 3 malige Waschung durchgeführt. Die Streptavidin-HRP working solution wurde vorbereitet und in jedes well 100 µl pipettiert. Die anschließende Inkubation wurde lichtgeschützt für 20 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin war eine erneute 3 malige Waschung nötig. Das Substrat wurde auf einer 1:1 Mischung aus Reagenz A und B hergestellt und zu je 100 µl pro well pipettiert. Daraufhin erfolgte erneut eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Vor der Messung wurde die Reaktion mit 50 µl Stopp-Lösung pro well beendet.

Messung:

Zuerst ist eine Einstellung der Standardkurve unumgänglich. Ebenso muss der Verdünnungsfaktor bei den Proben eingestellt werden. Bei allen Standards und Proben ist der Nullwert abzuziehen. Die Proben konnten nun im ELISA-reader bei 450 nm Wellenlänge gemessen werden. Als Referenzwellenlänge wurde 620 nm verwendet.

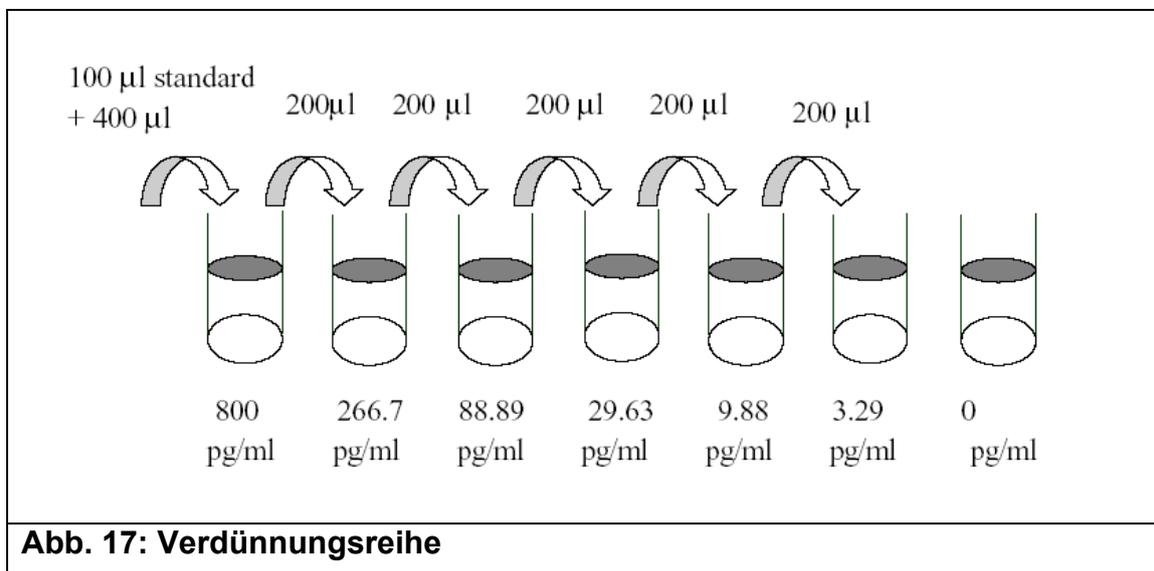
2.2.5.3 R&D DuoSet ELISA kit human IL-15 (DY247)

Durchführung am Tag 1

Die gewünschte Anzahl an 8-well-Streifen wurde beschriftet und in einem Ständer platziert. Der Capture Antibody working solution wurde vorbereitet (pro well werden 100 µl benötigt plus 10 % Pipettierreserve). In jedes well wurden 100 µl Capture Antibody working solution pipettiert. Anschließend wurde die Inkubation bei Raumtemperatur über mindestens 12 Stunden durchgeführt.

Durchführung am Tag 2

Alle wells wurden 3x mithilfe der automatischen ELISA-Waschmaschine mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde in jedes well 300 µl Reagent Diluent pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin war eine erneute 3 malige Waschung nötig. Nachdem die Proben langsam auf Eis aufgetaut waren wurden die Standards nach folgender Verdünnungsreihe hergestellt



Nun konnte in jedes well 100 µl Probe bzw. Standard pipettiert werden und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Daraufhin war eine erneute 3 malige Waschung erforderlich. Die Detection Antibody solution wurde vorbereitet und in jedes well 100 µl davon pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde erneut eine 3 malige Waschung durchgeführt. Die Streptavidin-HRP working solution wurde vorbereitet und in jedes well 100 µl pipettiert. Die anschließende Inkubation wurde lichtgeschützt für 20 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin war eine erneute 3 malige Waschung nötig. Das Substrat wurde auf einer 1:1 Mischung aus Reagenz A und B hergestellt und zu je 100 µl pro well pipettiert. Daraufhin erfolgte erneut eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Vor der Messung wurde die Reaktion mit 50 µl Stopp-Lösung pro well beendet.

Messung:

Zuerst ist eine Einstellung der Standardkurve unumgänglich. Ebenso muss der Verdünnungsfaktor bei den Proben eingestellt werden. Bei allen Standards und Proben in der Nullwert abzuziehen. Die Proben konnten nun im ELISA-reader bei 450 nm Wellenlänge gemessen werden. Als Referenzwellenlänge wurden 620 nm verwendet.

3. Ergebnisteil

3.1 Allgemeine Anmerkungen

3.1.1 Statistische Berechnungen

Jeder Versuch wurde mit Quaduplikaten der Zellkulturen in Doppelwertbestimmung pro Tag durchgeführt. Die Zellkulturen hierfür wurden von drei bis fünf Patientinnen gewonnen. 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 $p < 0,05$.

3.1.2 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. Es wurden nur Zellkulturen für die Versuche genommen, die eine signifikante Erhöhung der Prolaktin mRNA und deren Proteinsekretion, als Zeichen einer erfolgreichen Dezidualisierung zeigten.

Der Tag der ersten Hormonzugabe wurde als Tag 0 definiert. Die mRNA-Expression und die Proteinsekretion wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, ohne hCG-Inkubation auf 100 % gesetzt. Die Inkubationszeit mit hCG wurde auf jeweils 24 oder 48 Stunden festgelegt. Die Kulturen wurden einmal ohne vorangegangene Dezidualisierung 24 Stunden mit hCG inkubiert. Die anderen Zellkulturen wurden bis zum Tag 6 oder bis zum Tag 9 der Dezidualisierung beobachtet. Anschließend erfolgte die Messung der IL-11 und

IL-15 mRNA-Expression mittels semiquantitativer realtime-PCR und die dazugehörigen Proteinkonzentrationen per ELISA bei IL-11. Da die Proteinkonzentrationen bei IL-15 im ELISA nicht in den messbaren Bereich kamen wurde hier nur die mRNA-Expression gemessen.

Die Proben wurden wie folgt beschriftet:

Beispiel: S040929 A

Alle Stromazellen erhielten ein S, danach kam das Entnahmedatum 04 für das Jahr 2004, 09 für den Monat September und 29 für den 29. Tag. Falls an einem Tag mehrere Proben entnommen wurden, erfolgte zusätzlich eine alphabetische Nummerierung. Als Zellkulturen erfolgte diese Bezeichnung durchgehend weiter.

3.1.3 Überprüfung der Dezidualisierung

Die erfolgte Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen unter Progesteron und 17 β -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. (Fluhr et al., 2007)

3.2 IL-11

Zur Untersuchung des Verhaltens von IL-11 wurden die humanen endometrialen Stromazellen 6 bzw. 9 Tage mit 1 μ M Progesteron und 30 nM 17 β -Östradiol behandelt. IL-11 wurde anschließend auf mRNA- und Proteinebene an den Tagen 0, 6 und 9 bestimmt. Der Tag 0 wurde gewählt, um einen Ausgangswert zum Vergleich zu besitzen und um ausschließen zu können, dass die Beobachtungen im zeitlichen Verlauf auch ohne Dezidualisierung der Zellen stattfinden. Tag 6 stellt die Öffnung des Implantationsfensters dar und hierbei ging es um die Frage inwieweit der Embryo über seine hCG-Sekretion die Öffnung des Implantationsfensters über IL-11 selbst steuern kann. Am Tag 9 findet in der Regel die Schließung des Implantationsfensters statt. Kann hier der Embryo über seine hCG-Sekretion den Schluss des Implantationsfensters durch hohe Konzentrationen hinauszögern oder durch zu niedrige Konzentrationen herbeiführen?

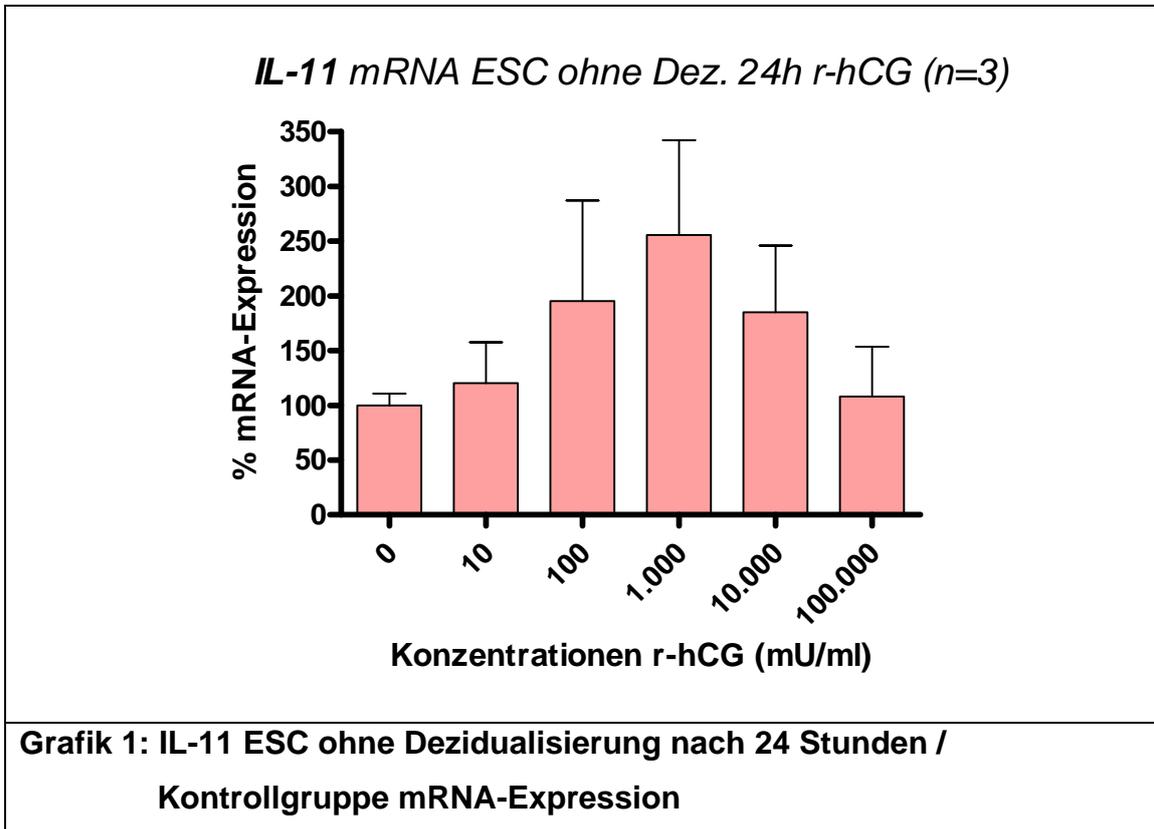
3.2.1 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe

3.2.1.1 mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von Interleukin-11 ohne vorangegangene Dezidualisierung mit Progesteron und Östradiol zeigt die steigende mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration an r-hCG. Dafür standen uns 3 Zellkulturreihen zur Verfügung.

Bei 1.000 mU/ml r-hCG erreicht die mRNA-Expression ihren maximalen Höchststand, bis zu dem 5 $\frac{1}{2}$ -fachen bei Probe S051026, um dann bei Konzentrationen über 1.000 wieder auf Werte um die 50 % bei 100.00 mU/ml r-hCG abzufallen.

Im Vergleich der Einzelergebnisse ist zu erkennen, dass sie stark voneinander abweichen, jedoch in allen Proben die Tendenz zu erkennen ist, dass in Abhängigkeit von der Konzentration die mRNA Expression zuerst ansteigt um bei Konzentrationen von über 1.000 wieder zu sinken.

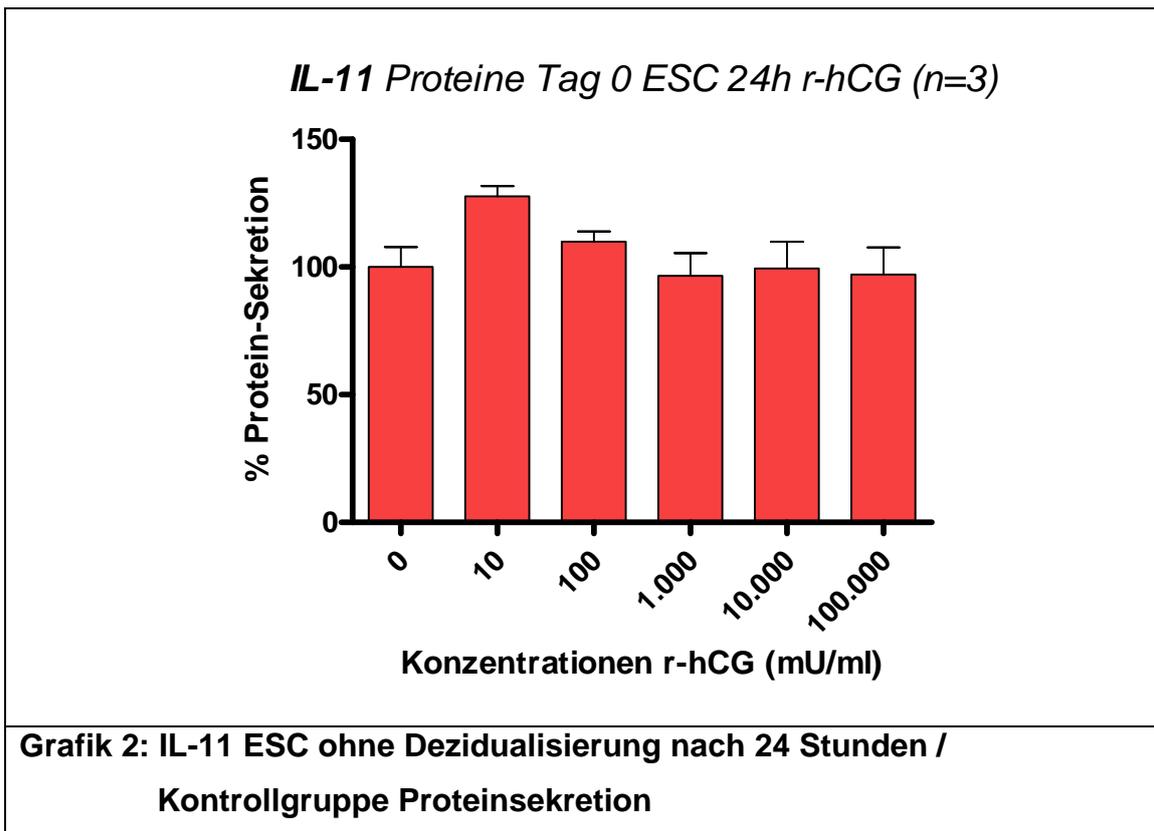


Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S051019	100	85,19	50,68	85,91	58,35	44,90
Standard-abweichung	37,55	35,94	26,40	65,35	9,26	28,48
S051021	100	40,69	40,1	73,7	38,57	48,65
	30,39	9,25	23,27	27,21	17,55	5,05
S051026	100	234,89	594,96	545,79	458,62	230,67
	32,61	154,54	295,85	163,06	98,9	211,28

Tab. 11: Rohdatenwerte: IL-11 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe mRNA-Expression

3.2.1.2 Proteinsekretion

Als Gegenüber zur mRNA Expression beobachtet man bei der Protein-Sekretion dieser Kulturreihen keine konzentrationsabhängige Steigerung bis zu einem Maximum mit anschließendem Abfall. Die Protein-Sekretion steigt bei 10 mU/ml leicht über 100 % an, um anschließend wieder auf niedrigere Protein-Sekretionen um die 100 % oder leicht darunter abzufallen.



Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S051019	100	129,074633	109,491396	73,2707801	66,2663705	69,6972912
ELISA						
S051021	100	113,941323	111,095881	101,544125	98,4083204	98,553222
ELISA						
S051026	100	139,020067	120,099263	118,379034	133,78905	90,7324339
ELISA						

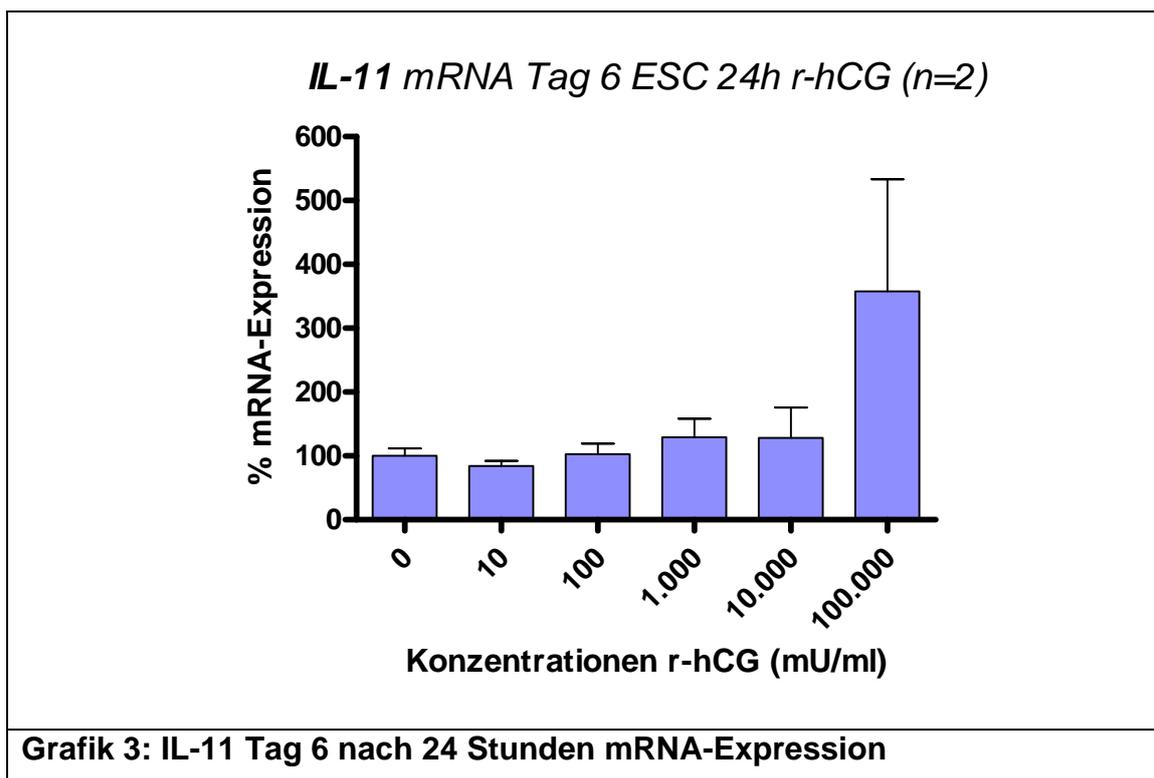
Tab. 12: Rohdatenwerte: IL-11 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe Proteinsekretion

3.2.2 IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden

3.2.2.1 mRNA-Expression

Für diesen Versuchsteil waren 4 Zellkulturen vorgesehen. Davon konnten allerdings nur 2 ausgewertet werden, da die anderen zwei Messungen große Peptierungsgenauigkeiten aufwiesen.

Am Tag 6 der Inkubation mit hCG bleibt die m-RNA Transkription in Abhängigkeit zur hCG Konzentration bis 10.000 mU/ml in etwa um die 100 Prozent konstant, um dann bei 100.000 mU/ml sprunghaft auf 350 bis 500 % anzusteigen.



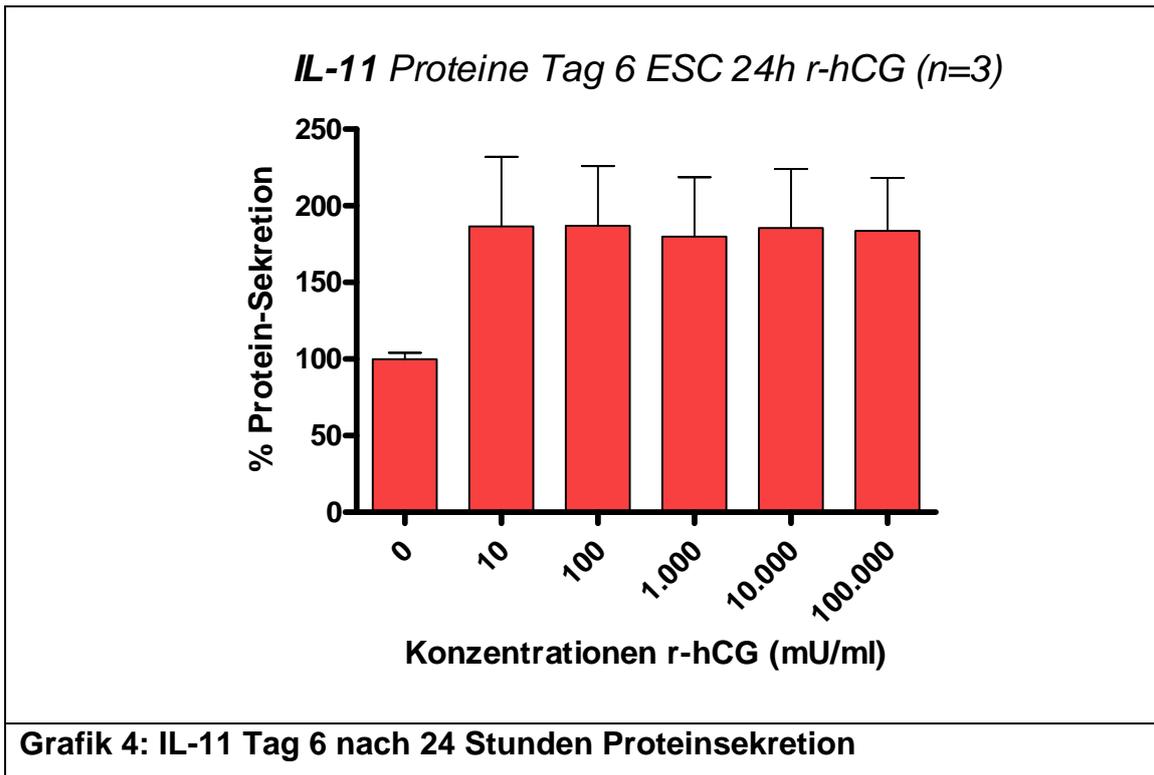
Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S040519	100 17,2	136,58 39,1	195,19 52,54	257,61 48,37	805,35 283,33	
S050621B	100 39,77	84,41 13,87	69,16 7,28	63,59 20,65	30,86 13,32	22,14 5,18

Tab. 13: Rohdatenwerte: IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden mRNA-Expression

Die Rohdatenwerte zeigen ein gegensätzliches Verhalten der beiden Proben. Während Probe S040519 mit steigenden r-hCG Konzentrationen auch steigende mRNA Expression aufzeigt, verhält sich Probe S050621 gerade umgekehrt.

3.2.2.2 Proteinsekretion

Hier steigt die Protein-Sekretion schon bei geringer Inkubation von r-hCG von 10 mU/ml auf Werte um die 225 % an und bleibt auch bei steigender hCG Konzentration in diesem Bereich konstant. Allerdings weichen auch hier die Einzelergebnisse stark voneinander ab. Die Tendenz des sprunghaften Anstiegs bei 10 mU/ml r-hCG ist nur bei Probe S040526 ersichtlich. Bei Probe S050621B hingegen sinkt die Proteinsekretion bei r-hCG Inkubation auf Werte unter 100 % ab. Bleibt aber bei noch höheren Konzentrationen nahezu konstant. Probe S051019 zeigt eine im Verhältnis zur Konzentration kontinuierlich steigende Proteinsekretion.



Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S040526 ELISA	100	395,177941	349,917261	316,975468	316,668023	304,659595
S050621B ELISA	100	87,7463775	91,9785085	88,9343696	86,3344554	82,6955934
S051019 ELISA	100	104,20944	132,233317	130,088035	153,736717	163,476619

Tab. 14: Rohdatenwerte: IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden Proteinsekretion

3.2.3 IL-11 Tag 9 24 Stunden

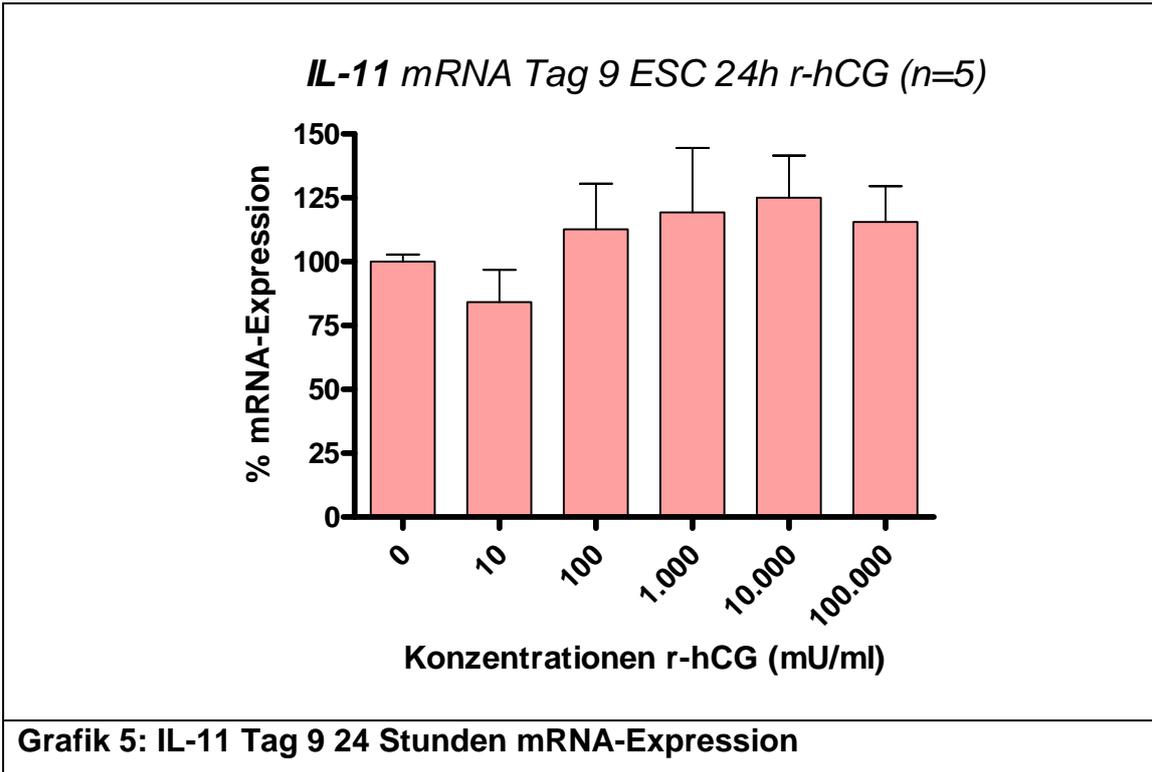
3.2.3.1 mRNA-Expression

Für die Testreihe zur Messung der mRNA waren 5 Zellkulturen auswertbar.

In der Gesamtzusammenschau der Ergebnisse am Tag 9 der Dezidualisierung fällt bei leichter Erhöhung der r-hCG Konzentration auch die mRNA-Expression zunächst leicht um 25 Prozent ab. Bei höherer r-hCG Konzentration steigt die mRNA Transkription wieder auf Werte um die 125 Prozent an.

Die Einzelergebnisse zeigen ein sehr unterschiedliches Bild:

Bei Probe S040519 und S040526 beobachtet man einen kontinuierlichen Anstieg der mRNA-Expression mit Konzentration bis zu 1.000 mU/ml. Bei höheren Konzentrationen an r-hCG fällt die mRNA-Expression hier wieder ab. Bei Probe S040922 und S040929 beobachtet man diese in Abhängigkeit zu Konzentration kontinuierliche Zunahme der mRNA-Expression bis zu einer r-hCG Konzentration von 10.000 mU/ml. Probe S041001 ist die einzige in dieser Versuchsreihe, welche bei r-hCG Konzentrationen von 1.000 und 10.000 mU/ml eine Abnahme in der mRNA-Expression zeigt.

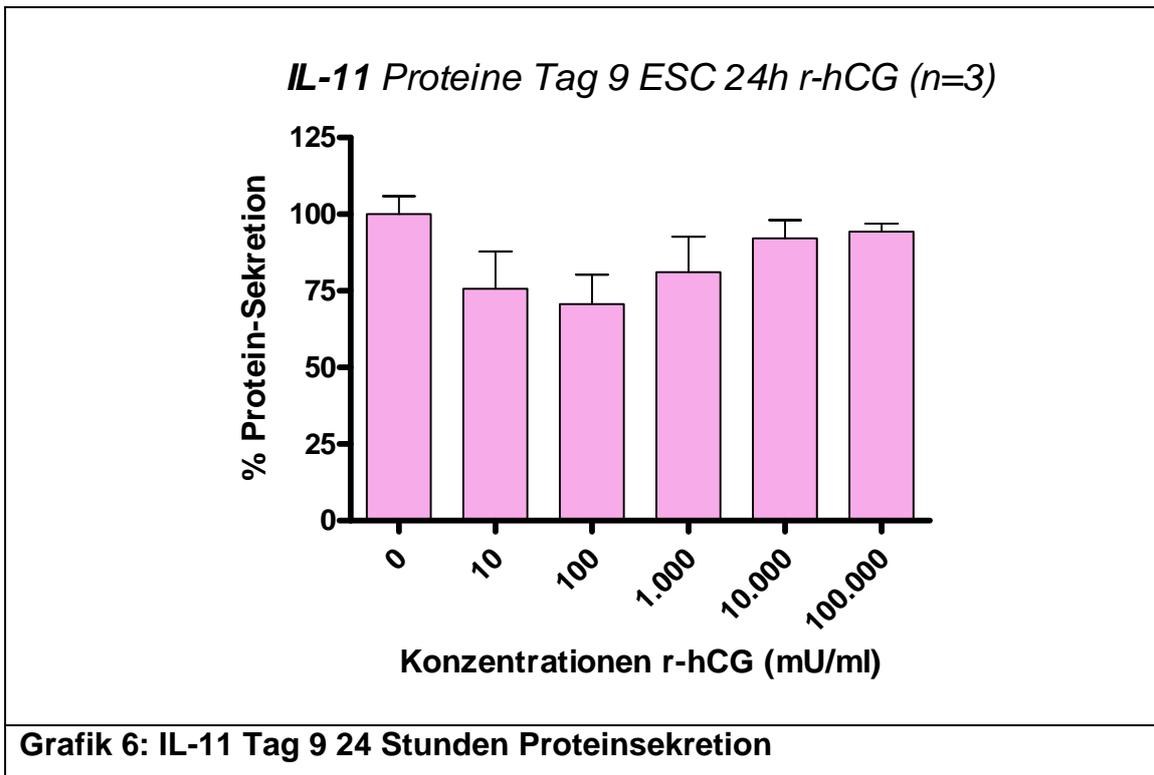


Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S040519	100 +/- 7,08	100,41 27,23	103,15 33,22	108,11 27,15	107,89 27,46	
S040526	100 +/- 11,4	140,64 13,33	159,65 35,72	277,56 79,02	210,26 42,06	156,20 21,46
S040922	100 +/- 8,35	177,86 59,57	172,52 54,83	136,82 86,69	207,77 61,12	105,58 12,26
S040929	100 +/- 16,49	21,79 11,93	25,23 5,96	25,12 19,65	78,19 16,23	54,95 12,72
S041001	100 +/- 6,946	63,74 9,66	67,32 24,36	49,83 15,55	51,79 19,72	78,77 37,48

Tab. 15: Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 24 Stunden mRNA-Expression

3.2.3.2 Proteinsekretion

Die Messung der Proteinsekretion konnte bei 3 Zellkulturen erfolgen. Dabei zeigte sich auch hier eine leichte Verringerung der Proteinsekretion bei niedrigen Konzentrationen von r-hCG. Im höheren Bereich von 10.000 und 100.000 mU/ml blieb die Proteinsekretion bei Werten um die 100 % nahezu konstant.



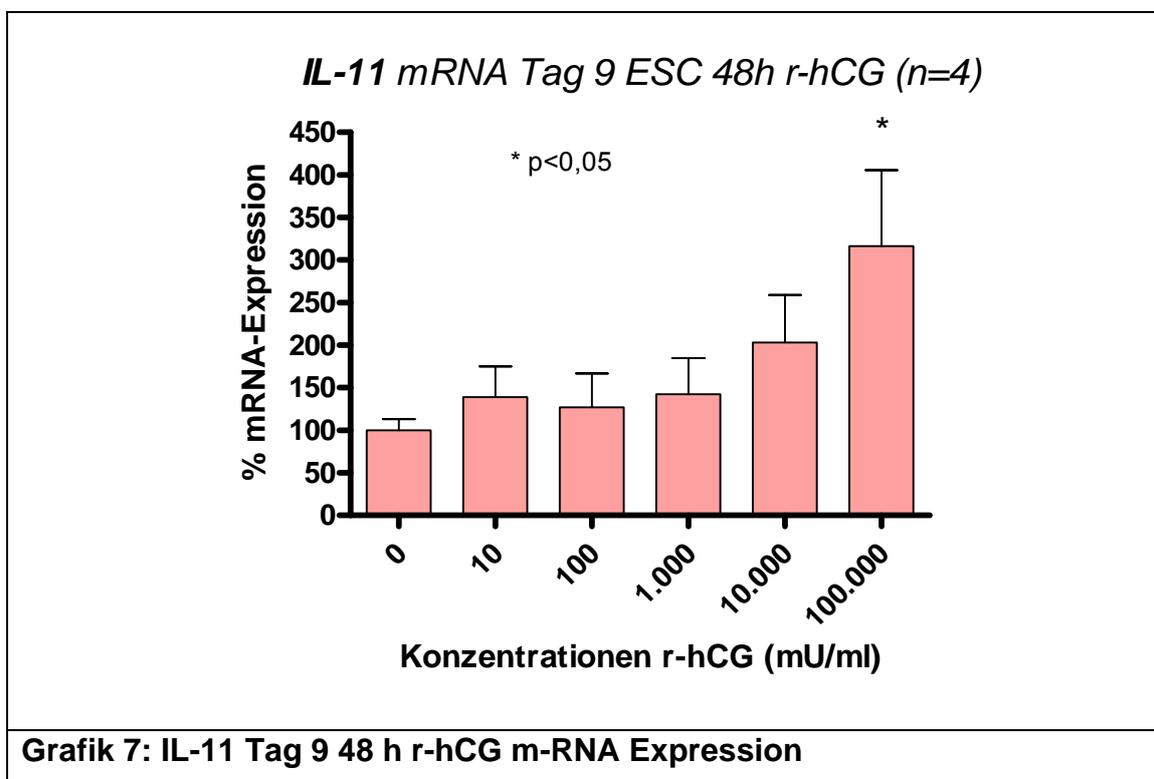
Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S04092	10	39,476721	32,907974	35,510575	91,170898	94,497553
9 ELISA	0	4	4	9	5	8
S04100	10	72,022125	78,813576	101,10295	76,897885	89,319923
1 ELISA	0	6	2	3	3	1
S04092	10	95,865789	110,51346	103,36092	98,761260	115,28364
2 ELISA	0	5	6	6	4	8

Tab. 16: Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 24 Stunden Proteinsekretion

3.2.4. IL-11 Tag 9 48 h r-hCG

3.2.4.1 m-RNA Expression

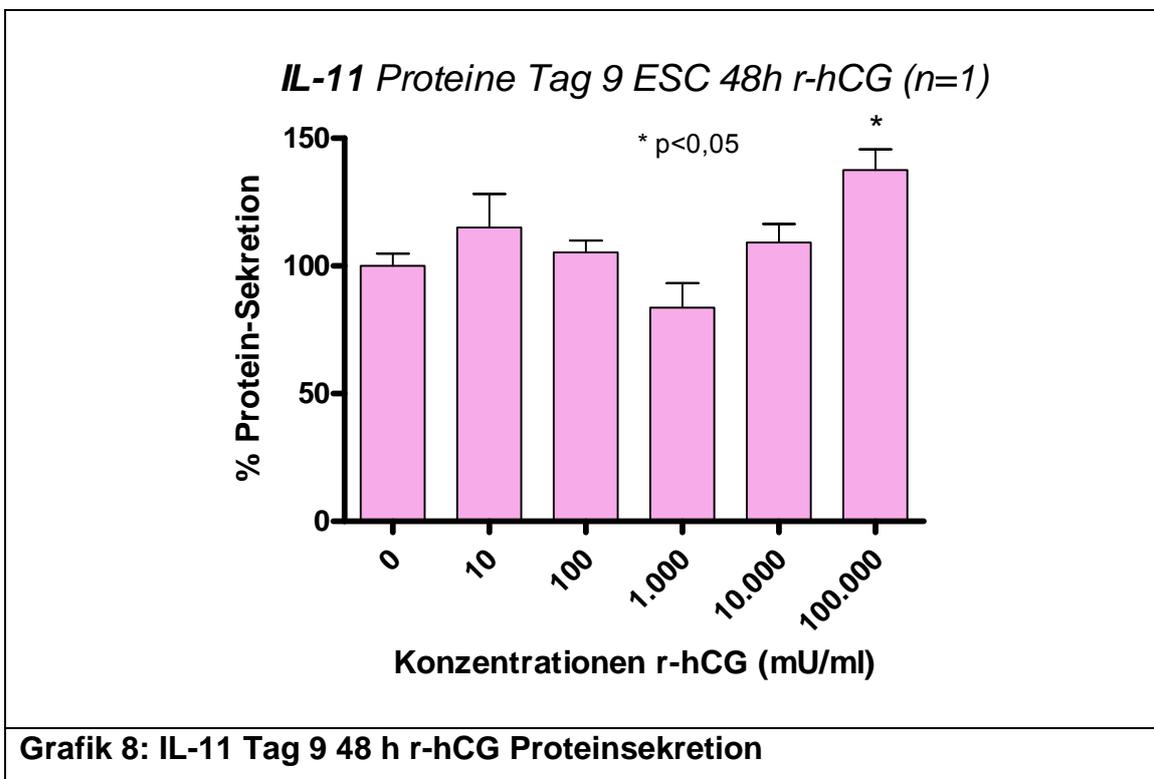
Dabei waren 4 Zellkulturen zur mRNA-Expression auswertbar. Der signifikant sprunghafte Anstieg auf bis zu 400 % mRNA-Expression bei 100.000 mU/ml mit $p < 0,05$ ist hierbei besonders auffällig. Dieser Höchststand konnte auch in einer Zellkulturreihe auf Proteinebene bestätigt werden.



Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000	
S050113	100	148,22	354,90	341,99	511,69	539,84	
	59,71	99,34	143,46	125,87	115,86	165,03	
S050308	100	54,94	89,69	140,50	161,54	513,77	
	23,58	34,44	33,62	179,35	191,43	504,39	
S050426	100	473,91	52,02	56,15	49,74	71,70	
	12,47	314,66	12,88	24,06	8,55	7,50	
S050628	Nicht auswertbar, da zu hohe Ct-Werte						
Tab. 17: Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 48 h r-hCG m-RNA Expression							

3.2.4.2 Proteinsekretion

Die Proteinsekretion am Tag 9 mit 48h r-hCG Inkubation konnte anhand von einer Zellkulturreihe analysiert werden. Dies soll die IL-11 Proteinsekretion exemplarisch darstellen. Bei dieser Probe blieb die Proteinsekretion bei Konzentrationen zwischen 10 und 10.000 mU/ml r-hCG um die 100 % nahezu konstant. Der sprunghafte Anstieg der Proteinsekretion bei einer Konzentration von 100.000 mU/ml ist mit $p < 0,05$ signifikant.



Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S05042	10	115,10700	105,36960	83,670019	109,24188	137,52649
6 ELISA	0	1	8	6	2	7

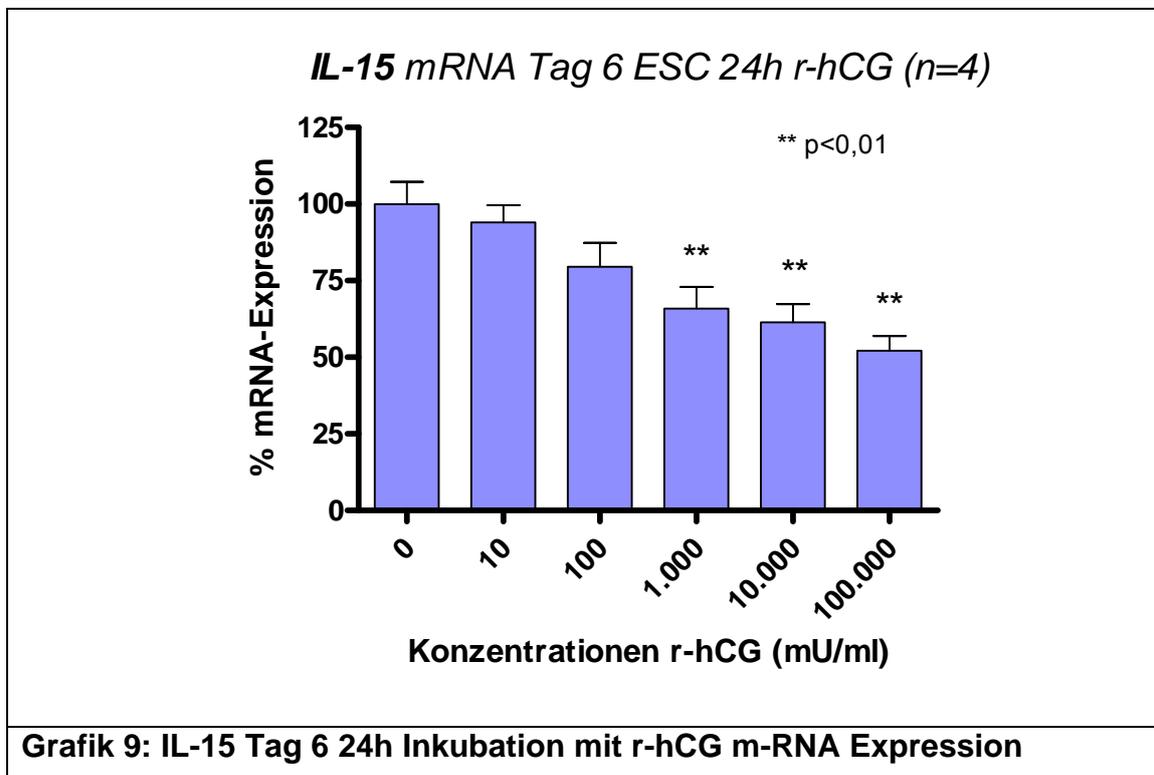
Tab. 18: Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 48 h r-hCG Proteinsekretion

3.3 Interleukin-15

3.3.1 IL-15 Tag 6 24h Inkubation mit r-hCG

Bei dieser Versuchsreihe konnten 4 Zellkulturen ausgewertet werden.

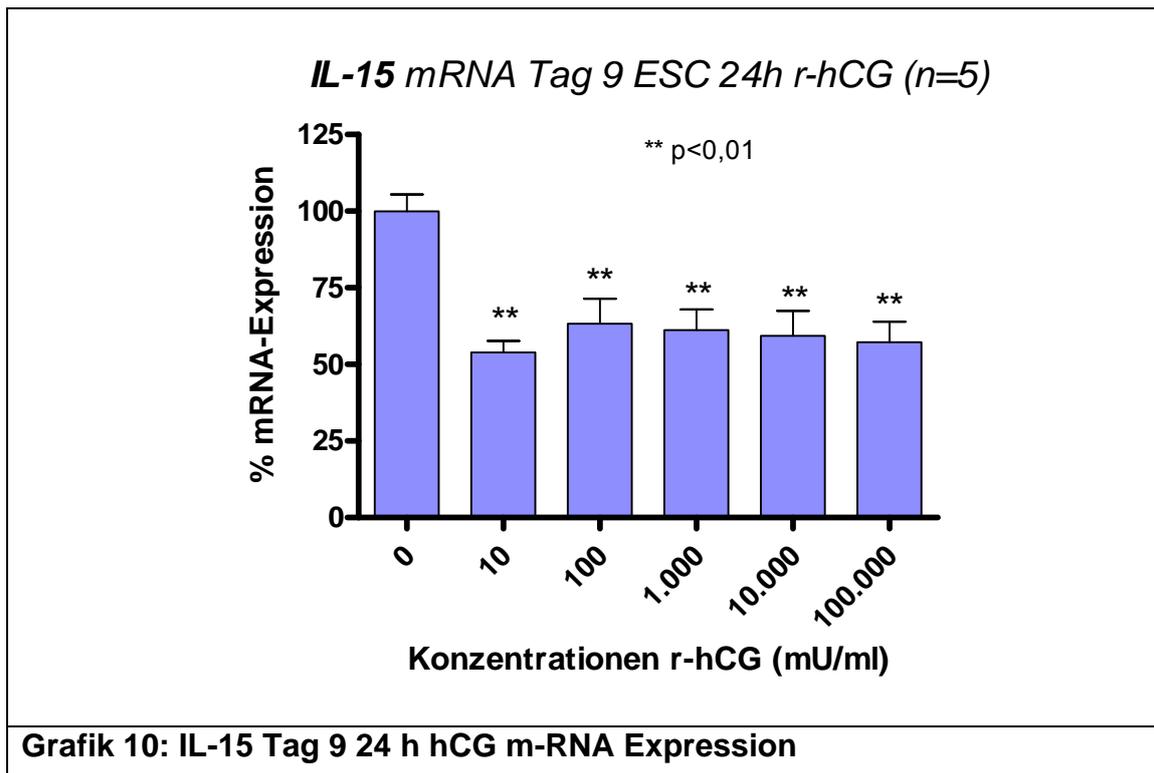
Die mRNA Expression nimmt ausgehend von 100 Prozent ohne r-hCG Inkubation mit steigender Konzentration an r-hCG kontinuierlich bis auf 60 Prozent ab. Dabei sind die Ergebnisse ab einer Konzentration von 1.000 mit $p < 0,01$ signifikant.



Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S040519	100	82,63	44,38	54,08	39,95	
	9,76	35,46	10,98	11,67	5,90	
S040526	100	106,79	69,46	82,37	56,26	64,63
	44,52	14,37	32,91	50,58	17,88	25,99
S040604A	100	94,56	72,87	70,32	56,12	43,87
	28,35	15,44	25,32	12,23	7,83	9,35
S050621B	100	83,86	93,26	123,78	98,20	63,39
	18,63	16,26	18,16	39,47	40,55	9,57
Tab. 19: Rohdatenwerte: IL-15 Tag 6 24h Inkubation mit r-hCG m-RNA Expression						

3.3.2 IL-15 Tag 9 24 h hCG

Am Tag 9 beobachten wir ebenfalls eine mit $p < 0,01$ signifikante Abnahme der mRNA Transkription auf Werte um die 60 Prozent. Diese Abnahme erfolgt jedoch schon bei einer Konzentration von 10 mU/ml r-hCG und bleibt auch bei noch höheren Konzentrationen in diesem Bereich nahezu konstant.



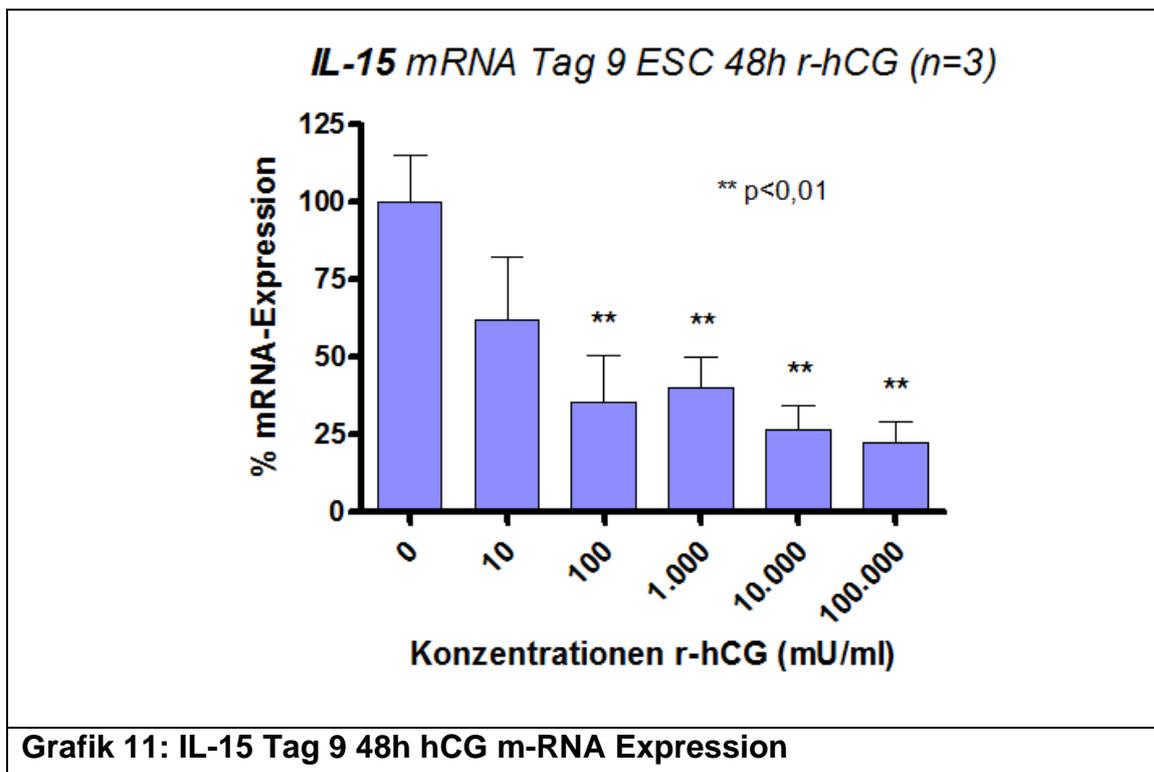
Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S040519	100 23,42	119,83 14,36	111,36 26,00	116,44 22,82	87,61 14,14	
S040526	100 23,01	49,61 10,62	36,96 10,34	29,95 7,19	23,43 13,23	29,04 9,46
S040922	100 19,45	77,64 23,32	52,62 13,55	72,14 7,54	53,98 10,90	38,87 2,62
S040929	100 20,47	61,14 12,52	52,10 21,41	55,71 10,36	50,08 10,72	40,86 9,42
S041001	100 27,77	50,90 17,42	46,46 4,98	49,23 8,38	44,86 15,27	39,65 6,95
Tab. 20: Rohdatenwerte: IL-15 Tag 9 24 h hCG m-RNA Expression						

3.3.3 IL-15 Tag 9 48h hCG

Zu diesem Versuchsteil standen 4 Zellkulturreihen zur Verfügung.

Die Probe S050426 wurde herausgenommen, da die Werte sehr stark von den restlichen Ergebnissen abweichen.

Die zur Auswertung am Tag 9 herangezogenen Werte nach 48-stündiger Inkubation mit r-hCG zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der mRNA-Expression auf unter 25 Prozent bei 100.000 mU/ml. Ab einer Konzentration von 100 mU/ml r-hCG sind die Ergebnisse mit $p < 0,01$ statistisch signifikant.



Probe	0	10	100	1.000	10.000	100.000
S050113	100	268,94	16,52	64,80	22,83	78,89
	36,16	186,58	3,50	48,24	0,32	51,13
S050308	100	13,23	12,96	12,40	7,60	4,00
	63,50	2,18	8,25	9,99	3,37	1,54
S050628	100	46,45	61,75	70,64	47,91	21,39
	15,87	31,79	53,02	27,23	21,33	8,54

Tab. 21: Rohdatenwerte: IL-15 Tag 9 48h hCG m-RNA Expression

3.3.4 IL-15 und ELISA

Interleukin-15 war im ELISA nicht messbar. Dies liegt vermutlich daran, dass der IL-15 ELISA nicht ausreichend sensitiv ist und bei wahrscheinlich relativ niedrigen IL-15 Konzentrationen nicht in den messbaren bzw. vom ELISA erfassbaren Bereich kommt. Aus diesem Grund liegen keine Proteindaten von IL-15 vor.

4. Diskussion

4.1 IL-11

4.1.1 ESC ohne Dezidualisierung 24h / Kontrollgruppe

4.1.1.1 mRNA Expression

Zuerst wurde die mRNA-Expression von Interleukin-11 ohne vorangegangene Dezidualisierung mit Progesteron und Östradiol gemessen. Diese Messungen dienen als Kontrollgruppe.

Im Vergleich der Einzelergebnisse ist zu erkennen, dass sie stark voneinander abweichen, jedoch in allen Proben die Tendenz zu erkennen ist, dass in Abhängigkeit von der Konzentration die mRNA Expression zuerst ansteigt um bei Konzentrationen von über 1.000 wieder zu sinken. Dies könnte dafür stehen, dass der Embryo über sein hCG-Signal versucht das Endometrium trotz keiner normal abgelaufenen Dezidualisierung für die Implantation zu stimulieren. Dies zeigt sich allerdings nur anhand der IL-11 mRNA Expression. Es handelt sich somit nur um ein intrazelluläres Signal. Die Proteinsekretion zeigt keine konzentrationsabhängige Veränderung, was auf eine ausschließlich autokrine Wirkung hinweisen könnte.

4.1.1.2 Proteinsekretion

Als Gegenüber zur mRNA Expression beobachtet man bei der Proteinsekretion dieser Kulturreihen keine konzentrationsabhängige Steigerung bis zu einem Maximum mit anschließendem Abfall. Ohne vorangegangene Dezidualisierung kann Interleukin-11 also keine durch hCG regulierte parakrine Funktion haben.

4.1.2. IL-11 Tag 6 24 h r-hCG

4.1.2.1 mRNA-Expression

Tag 6 der Dezidualisierung wurde deshalb ausgewählt, da er in vivo als der Tag der Öffnung des Implantationsfensters gilt.

Die mRNA-Transkription bleibt in Abhängigkeit zur hCG Konzentration bis 10.000 mU/ml in etwa um die 100 Prozent konstant, um dann bei 100.000 mU/ml sprunghaft auf 350 bis 500 % anzusteigen. Es bedarf also einer ausreichend hohen Konzentration an hCG um die mRNA-Expression zu stimulieren. Der Embryo sollte demnach schon frühzeitig in der Lage sein hohe hCG-Konzentration zu produzieren, um die Rezeptivität des Endometriums effektiv beeinflussen zu können. Eine Zunahme der mRNA-Expression von IL-11 am Tag 6 könnte am Endometrium dafür verantwortlich sein die Rezeptivität zu erhöhen und somit die Öffnung des Implantationsfensters herbeizuführen.

4.1.2.2 Proteinsekretion

Die durchschnittliche Protein-Sekretion steigt schon bei geringer Inkubation von r-hCG von 10 mU/ml auf Werte um die 225 % an und bleibt auch bei steigender hCG Konzentration in diesem Bereich konstant. Da die einzelnen Proben sehr unterschiedliche Ergebnisse aufzeigten, soll an dieser Stelle jedes Ergebnis separat diskutiert werden. Von den prämenopausalen Frauen die Ihre Uteri zur Verfügung stellten, wurden keine anamnestischen Daten erhoben. Es liegen somit keine Informationen über die Anzahl der ausgetragenen Schwangerschaften, eventueller Aborte, ungewollter Kinderlosigkeit oder sonstige gynäkologische oder internistische Erkrankungen vor. Aus diesem Grund ist ein Rückschluss der gemessenen Werte auf die Fertilität rein spekulativ.

Probe S040526 zeigte einen sprunghaften Anstieg bei 10 mU/ml r-hCG auf hohe Proteinsekretionen. Hier scheint das Endometrium besonders sensitiv auf schon geringe hCG-Konzentrationen zu reagieren. Vielleicht können Frauen mit diesen Werten leichter schwanger werden, da das Endometrium sehr sensibel reagiert und sich somit seine Rezeptivität leicht erhöhen lässt.

Bei Probe S050621B hingegen sinkt die Proteinsekretion bei r-hCG Inkubation auf Werte unter 100 % ab. Hier könnte es sich um Probenmaterial von einer Frau handeln, welche Probleme hatte schwanger zu werden. Das Endometrium reagierte auf hCG genau kontrovers und verminderte seine Rezeptivität. Eigentlich verständlich, da der Embryo für den Organismus pseudotumorales Gewebe darstellt und somit abgestoßen werden sollte. Vielleicht sind solche Frauen was die Tumoranfälligkeit angeht besser geschützt, da sie Fremdgewebe früher erkennen und abstoßen.

Probe S051019 zeigte eine im Verhältnis zur Konzentration kontinuierlich steigende Proteinsekretion. Vielleicht ist dies der Normalfall. Ein ausgewogenes Verhältnis von Inkubation und Sekretion.

Um diese Aussagen zu untermauern wären weitere Versuchsreihen mit den anamnestischen Angaben über die Zahl der Schwangerschaften und evtl. durchgemachter Aborte oder Kinderwunschbehandlungen nötig.

4.1.3 IL-11 Tag 9 24 h r-hCG

4.1.3.1 mRNA-Expression

In der Gesamtzusammenschau der Ergebnisse am Tag 9 der Dezidualisierung fällt bei leichter Erhöhung der r-hCG Konzentration die mRNA-Expression zunächst leicht um 25 Prozent ab. Bei höherer r-hCG Konzentration steigt die mRNA Transkription wieder auf Werte um die 125 Prozent an.

Die Einzelergebnisse zeigen ein sehr unterschiedliches Bild:

Bei Probe S040519 und S040526 beobachtet man einen kontinuierlichen Anstieg der mRNA-Expression mit Konzentration bis zu 10.000 mU/ml. Bei höheren Konzentrationen an r-hCG fällt die mRNA-Expression hier wieder ab. Vielleicht ist es dem Embryo möglich bei hCG-Konzentrationen zwischen 100 und 10.000 mU/ml das Implantationsfenster weiter offen zu halten.

Bei Probe S040922 und S040929 beobachteten wir diesen in Abhängigkeit zu Konzentration kontinuierliche Zunahme der mRNA-Expression bis zu einer r-hCG Konzentration von 10.000 mU/ml.

Probe S041001 ist die einzige in dieser Versuchsreihe, welche bei r-hCG Konzentrationen von 1.000 und 10.000 mU/ml eine Abnahme in der mRNA-Expression zeigt. Wenn man davon ausgeht, dass eine hohe hCG-Konzentration das Implantationsfenster weiter offen hält, könnte man hier kontrovers die Schließung trotz hohen hCG-Konzentrationen annehmen.

4.1.3.2 Proteinsekretion

Die Messung der Proteinsekretion konnte nur bei 3 Zellkulturreihen erfolgen. Dabei zeigte sich auch hier eine leichte Verringerung der Proteinsekretion bei niedrigen Konzentrationen von r-hCG. Im höheren Bereich von 10.000 und 100.000 mU/ml blieb die Proteinsekretion bei Werten um die 100 % nahezu konstant.

Hohe Werte scheinen also die Proteinsekretion aufrechtzuerhalten. Auch diese Erkenntnis könnte unsere Vermutung untermauern, dass die Schließung des Implantationsfensters durch hohe hCG-Konzentrationen verhindert wird.

4.1.4. IL-11 Tag 9 48 h r-hCG

4.1.4.1 mRNA Expression

4 Zellkulturen standen zur mRNA-Expressionsauswertung zur Verfügung. Der signifikant sprunghafte Anstieg auf bis zu 400 % mRNA-Expression bei 100.000 mU/ml mit $p < 0,05$ ist hierbei besonders auffällig. Dieser Höchststand konnte auch in einer Zellkulturreihe auf Proteinebene bestätigt werden. Eine längere, 48h Inkubation mit hCG ändert das Verhalten des Endometriums in Bezug an die mRNA-Expression, welche signifikant erhöht wird. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass eine kontinuierliche und länger anhaltende Einwirkung von hCG auf das Endometrium dieses durch Stimulation der IL-11 mRNA Sekretion auf eine Implantation vorbereitet.

4.1.4.2 Proteinsekretion

Die Proteinsekretion am Tag 9 mit 48h r-hCG Inkubation konnte anhand von einer Zellkulturreihe analysiert werden. Bei dieser Probe blieb die Proteinsekretion bei Konzentrationen zwischen 10 und 10.000 mU/ml r-hCG um die 100 % nahezu konstant. Der sprunghafte Anstieg der Proteinsekretion bei einer Konzentration von 100.000 mU/ml ist mit $p < 0,05$ signifikant.

Eine sehr hohe Konzentration an hCG, welche nur von überlebendfähigen, normal entwickelten Embryonen erreicht werden kann, kann somit als möglicher Grund die Schließung des Implantationsfensters zu verhindern angesehen werden.

4.1.5 Gesamtzusammenschau IL-11- Thesen

IL-11 ist ein konstanter Faktor, welcher Dezidualisierung ungestört ablaufen lässt.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung von IL-11 am Tag 6 und Tag 9 unter 24h hCG-Gabe in dezidualisierten endometrialen Stromazellen. Dies deutet darauf hin, dass hCG auf die Bildung von IL-11 in dezidualisierten endometrialen Stromazellen gleichbleibend wirken könnte. Bei den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich im Mittel auf Proteinebene eine Konstanthaltung von IL-11 durch Gabe von ansteigenden Konzentrationen an hCG. Unter der Annahme einer konstant haltenden Wirkung von hCG auf die Produktion von IL-11 in endometrialen Stromazellen könnte man die Vermutung anstellen, dass der implantierende Embryo auf diese Weise die Möglichkeit hat IL-11 konstant zu halten und so die Dezidualisierung des Endometrium weiter vorantreibt.

IL-11 muss während der Dezidualisierung und Implantation konstant bleiben.

IL-11 ist in der Literatur als entscheidender Faktor beschrieben, welcher das Zellüberleben verlängert und auf diese Weise endometriale Stromazellen vor Zellschäden während der embryonalen Implantation schützt. (Tanka et al., 2001) Es könnte aus diesem Grund vermutet werden, dass IL-11 in Anwesenheit eines Embryos über dessen hCG Produktion weder herauf noch herunter reguliert werden muss. Stattdessen ist es essentiell die IL- 11Sekretion, in der wichtigen Phase der Nidation des Embryos, konstant zu halten um endometriale Stromazellen vor Zellschäden zu schützen. Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse würden mit dieser These in Einklang stehen.

Die Dezidualisierung ist eine hauptsächlich maternale Aufgabe.

Zusammenfassend lässt sich allerdings auch feststellen, dass die Proteinsekretion von IL-11 durch hCG kaum reguliert wird. Somit kann vermutet werden, dass IL-11 eher nicht durch hCG reguliert wird, sondern anderen Regulatoren unterworfen sein muss. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination von Östrogen mit Progesteron die Sekretion von IL-11 reduzieren. Die alleinige Gabe von Östrogen stimuliert die IL-11 Sekretion. (von Rango et al., 2004) Es kann also davon ausgegangen werden, dass das vom Ovar produzierte Östrogen und vom Corpus luteum produzierte Progesteron den größten Einfluss haben und die Dezidualisierung hauptsächlich eine maternal regulierte Aufgabe ist.

Die Dezidualisierung ist nicht durch hCG reguliert.

IL- 11 gilt als Dezidualisierungsfaktor und wird wie bereits unter 1.8.1 beschrieben nachgewiesener Maßen von cAMP (Brar et al., 1997; Brosens et al., 1999; Tanget et al., 1993) und Progesteron vorangetrieben. In der Literatur wird zudem eine Regulation von IL-11 durch RLX (Relaxin) und PGE₂ (Prostaglandin E₂) diskutiert. (Dimitriadis et al., 2005) An der Sekretion von IL-11 mRNA und IL-11 Protein sind somit sowohl lokale Faktoren als auch Steroidhormone beteiligt. Eine Regulation von IL-11 durch hCG, als eines vom Embryo ausgehenden Signals, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Dezidualisierung läuft vom Embryo unabhängig ab.

Der Embryo kann die Dezidualisierung somit nicht allein über eine hCG-Ausschüttung mit Wirkung auf das IL-11 vorantreiben. Somit bleibt zu vermuten, dass die Regulierung von endometrialem IL-11 unabhängig von dem frühen embryonalen Signal hCG verläuft.

Allerdings stören uns bei dieser Annahme die signifikanten Ergebnisse von IL-11 bei 48h Inkubation mit hCG in hohen Konzentrationsbereichen. Es gibt also sehr wahrscheinlich einige Ausnahmen der vorher postulierten Thesen. Wahrscheinlich sind es andere als die hier untersuchten Faktoren, welche dabei eine tragende Rolle spielen.

4.2 Interleukin-15

4.2.1 IL-15 Tag 6 24 h r-hCG

Die mRNA Expression nimmt von 100 Prozent mit steigender Konzentration an r-hCG kontinuierlich bis auf 60 Prozent ab. Dabei sind die Ergebnisse ab einer Konzentration von 1.000 mit $p < 0,01$ signifikant.

Hohe Konzentrationen von hCG vermindern somit die IL-15 Produktion, welche für die Rekrutierung von peripheren CD 16 (-) NK Zellen aus dem Blut ins menschliche Endometrium zuständig sind. (Kitaya et al., 2005) IL- 15 muss herunter reguliert werden um niedrige Zahlen von NK Zellen einzuschwemmen, welche den Embryo evtl. verdauen könnten. Allerdings sind NK Zellen nötig um dem Embryo die Invasion ins Endometrium zu ermöglichen und letztlich die korrekte Implantation zu gewährleisten. Allerdings ist die Invasion und Implantation ein ausschließlich lokales Ereignis, sodass dieses wahrscheinlich sehr interaktiv während des Hatchings reguliert wird und in unserer Studie nicht untersucht werden konnte.

4.2.2 IL-15 Tag 9 24 h r-hCG

Am Tag 9 beobachten wir ebenfalls eine mit $p < 0,01$ signifikante Abnahme der mRNA Transkription auf Werte um die 60 Prozent. Diese Abnahme erfolgt jedoch schon bei einer Konzentration von 10 mU/ml r-hCG und bleibt auch bei noch höheren Konzentrationen in diesem Bereich nahezu konstant. Diese Ergebnisse bestätigen unsere vorhergehende Ergebnisse und verfestigen die These, dass IL-15 die Einschwemmung von NK Zellen verhindern könnte.

4.2.3 IL-15 Tag 9 48h r-hCG

Die Probe S050426 wurde herausgenommen, da die Werte sehr stark von den restlichen Ergebnissen abweichen.

Die zur Auswertung am Tag 9 herangezogenen Werte nach 48-stündiger Inkubation mit r-hCG zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der mRNA-Expression auf unter 25 Prozent bei 100.000 mU/ml. Ab einer Konzentration von 100 mU/ml r-hCG sind die Ergebnisse mit $p < 0,01$ statistisch signifikant. Da auch dieses Ergebnis signifikant ist kann davon ausgegangen werden, dass hCG IL-15 reguliert.

4.2.4 Gesamtzusammenschau IL-15 mRNA Expression

Alle mRNA Werte von IL-15 zeigen eine signifikante Abnahme bei hohen Konzentrationen von hCG. In vorangegangenen Studien von Dunn et al. 2002, Kitaya et al. 2000 und Okada et al. 2000a wurde davon ausgegangen, dass die IL-15 mRNA Expression sich während der Dezidualisierung *in vitro* in endometrialen Stromazellkulturen steigert. Hierfür scheinen cAMP oder Progesteron als Stimulator zu dienen. HCG hingegen könnte der gesuchte Inhibitor der IL-15 mRNA Expression sein.

IL-15 kontrolliert die Funktion und Versorgung von Lymphozyten. (Kang et al., 2004) IL-15 ist somit an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen beteiligt. Im Falle einer Schwangerschaft sollte es allerdings nicht zur einer Abstoßung der Uterusschleimhaut kommen. Aus diesem Grund erscheint es schlüssig, dass IL-15 herunter reguliert werden muss, um eine regelrechte Implantation des Embryos zu gewährleisten. Makrophagen dürfen in diesem Fall den „Fremdkörper Embryo“ nicht als tumorales Gewebe ansehen und verdauen, sondern müssen in ihrer Funktion als phagozytierende Zellen gebremst werden.

IL-15 könnte in Abhängigkeit von hCG also zwei Funktionen in endometrialen Stromazellen haben. Zum einen die Dezidualisierung des Endometriums abzuschließen und zum anderen Makrophagen davon abzuhalten den Embryo als „pseudotumorales Gewebe“ zu verdauen.

4.2.5 IL-15 und ELISA

Zu Interleukin 15 konnte wie oben bereits erwähnt nur die mRNA gemessen werden, da Interleukin-15 im ELISA nicht messbar war. Dies liegt vermutlich daran, dass der IL-15 ELISA nicht ausreichend sensitiv ist und bei wahrscheinlich relativ niedrigen IL-15 Konzentrationen nicht in den messbaren bzw. vom ELISA erfassbaren Bereich kommt. Aus diesem Grund liegen keine Proteindaten von IL-15 vor.

4.3 Grundsätzliche Gründe für nicht signifikante Ergebnisse bzw. Unterschiede zwischen den Kulturreihen

Grundsätzlich bleibt zu erwähnen, dass die interindividuelle Unterschiede in verschiedenen Meßreihen oft zu sehr starken Abweichungen geführt haben und aus diesen Grund eine allgemeingültige Aussage zu den Ergebnisse sehr schwer fällt bzw. unmöglich ist. Es ist *in vitro* sehr schwierig *in vivo* Bedingungen nachzustellen und aus weniger als 5 Proben einen Rückschluss auf das Gesamtkollektiv der Frauen bzw. Menschen unterschiedlicher Entitäten zu ziehen. Ein entsprechendes Vorwissen über die Probandinnen in Bezug auf bereits geborene Kinder, Fehlgeburten oder ungewollter Kinderlosigkeit, Verhütungsmethoden etc. wäre sicher sinnvoll, jedoch in einer einzigen derartigen Studie nicht möglich.

Aus den oben genannten Gründen wären Metastudien welche ein größeres Patientenkollektiv erfassen erforderlich.

4.4 Verwendung von hCG als Stimulator der Dezidualisierung

Eines der ersten bekannten hormonellen Signale des Embryos ist das hCG. Seine Sekretion beginnt spätestens am Tag 7 der Befruchtung im Blastozystenstadium. (Lopata et al., 1989) Als sogenanntes Schwangerschaftshormon unterhält es endokrin das Progesteron bildende 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. (Licht et al., 2001) 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. (Tesarik et al., 2003) Daten der Arbeitsgruppe Licht et al. bestätigen, dass hCG einen direkten, die Implantation fördernden Effekt auf das Endometrium zu haben scheint. (Licht et al., 2001) 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. (Licht et al., 1998) 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. (Fazleabaset al., 1999; Filicoriet al., 2005; Strakovaet al., 2005) In der hier vorliegenden Studie wurde der Einfluss von hCG auf die Expression von IL-11 und -15 in endometrialen Stromazellen *in vitro* untersucht. Bisher existierten keine Daten zu einem möglichen Einfluss von hCG auf diese beiden Faktoren.

4.5 Beteiligung von IL-11 und 15 an der Fertilität und Regulation durch hCG

Die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren IL-11 und -15 spielen für die Proliferation und Differenzierung des Endometriums eine entscheidende Rolle. Da beide Interleukine Auswirkungen auf Epithel- und Stromazellen haben, gilt es diesen molekulargenetischen Zusammenhang in Bezug auf die Fertilität näher zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von IL-11 und -15 während der Dezidualisierung in humanen endometrialen Stromazellen *in vitro* und einen möglichen Einfluss von hCG auf diese Faktoren zu untersuchen. Für IL-11 konnte keine von hCG abhängige Regulierung nachgewiesen werden. IL-15 hingegen wird durch hohe hCG-Konzentrationen signifikant herunter reguliert.

4.6 Klinischer Ausblick

Da die Rezeptivität des Endometriums von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Implantation und Schwangerschaft ist, gilt es hier nähere molekulargenetische Zusammenhänge besser zu verstehen. Dabei müssen wir zwei Komponenten auseinanderhalten. Die Implantation selbst ist ein Prozess der das Zusammenspiel von Blastozyste und Endometrium erfordert. Die Vorbereitung des Endometriums während des Menstruationszyklus unter dem Einfluss von Steroidhormonen hingegen stellt eine maternale Aufgabe dar.

Da die Vorgänge im Endometrium weiterhin nicht vollständig geklärt sind scheint es hier noch genügend Arbeit für die Grundlagenforschung zu geben. Neben den klassischen Steroidhormonen 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 essentielle Bedingung. Die weitere Aufklärung dieses Vorganges 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 gezielter als bisher zu beeinflussen. Dies könnte zu höheren erfolgreich ausgetragenen Schwangerschaften führen. Insbesondere Frauen mit wiederholtem Versagen der Implantation (repeated implantation failure, RIF) unter Kinderwunsch-Behandlung könnte damit eine optimierte Therapie angeboten werden. Es wird angenommen, dass bei RIF-Frauen unter anderem verschiedene krankhafte Veränderungen des Uterus, wie ein gering aufgebautes Endometrium oder veränderte Expression von Faktoren zu einer verminderten Rezeptivität des Endometriums führen. (Margalioth et al., 2006)

Auch im Hinblick auf schwangerschaftsassozierte Erkrankungen sind weitergehende Kenntnisse über die molekularen Mechanismen während der Implantation von weitreichender Bedeutung. Wahrscheinlich haben Erkrankungen wie Präeklampsie oder Frühgeburtlichkeit ihren Ursprung zu Beginn der Schwangerschaft, zum Beispiel in anormaler Implantation oder Plazentaentwicklung. Ein besseres Verständnis der Vorgänge bei anormaler Implantation und Plazentation könnte die Behandlungsmöglichkeiten von Erkrankungen verbessern, die mit Infertilität, wiederholten Fehlgeburten oder Präeklampsie verknüpft sind. (Norwitz, 2006)

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von IL-11 und IL-15 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 rekombinatem hCG inkubiert. Die Messungen von IL-11 und -15 mRNA und Proteinen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR und ELISA durchgeführt. Während bei IL-11 keine Regulation durch hCG festgestellt wurde, konnte bei IL-15 eine signifikante Inhibition durch hohe hCG-Konzentrationen gezeigt werden. Dies unterstützt Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, die IL-11 als Schlüsselfaktor in der dezidualen Umwandlung sehen, welche zum Großteil vor der hCG-Produktion eines Embryos stattfindet. Da die IL-15 Sekretion von DSC im menschlichen Uterus die uNK zur Proliferation stimuliert, kann davon ausgegangen werden, dass hCG diese Proliferation über IL-15 Inhibition verhindert, um den Embryo nicht abzustößen. Da die Proteindaten von IL-15 im ELISA nicht gemessen werden konnten, sind dazu weiterführende Untersuchungen nötig.

6. Verzeichnisse

6.1 Abbildungen

1.	Anatomie des Uterus	13
2.	Aufbau des Endometriums	14
3.	Endometrium in der Menstruationsphase	15
4.	Endometrium in der frühe proliferativen Phase	16
5.	Endometrium in der mittleren sekretorischen Phase	17
6.	Die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse	19
7.	Das Zusammenwirken der Hormone im weiblichen Zyklus	21
8.	Dezidualisierte Stromazellen	24
9.	Hatching	28
10.	Adhäsion der Blastozyste	30
11.	Implantation 9. Tag	31
12.	Intrazelluläre Signaltransduktion von IL-11	40
13.	Ablauf der Polymerasekettenreaktion	72
14.	Amplifikationskurve	73
15.	Schmelzkurve	76
16.	Verdünnungsreihe	79
17.	Verdünnungsreihe	81

6.2 Tabellen

1.	Auswahl an Faktoren, die mit der embryonalen Implantation assoziiert werden	32
2.	Geräteliste	51
3.	Laborzubehör und Verbrauchsmaterial	53
4.	Chemikalien	55
5.	Reagenzien	57
6.	ELISAs	57
7.	Mediummengen und Zellzahl für bestimmte Kulturflaschen und –platten	63
8.	Reagenzien für RNA-Isolation	67
9.	Reagenzien für RT-Reaktion	70
10.	Master Mix für die PCR	75
11.	Rohdatenwerte: IL-11 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe mRNA-Expression	86
12.	Rohdatenwerte: IL-11 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe Proteinsekretion	87
13.	Rohdatenwerte: IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden mRNA-Expression	89
14.	Rohdatenwerte: IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden Proteinsekretion	90
15.	Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 24 Stunden mRNA-Expression	92
16.	Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 24 Stunden Proteinsekretion	93
17.	Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 48 h r-hCG m-RNA Expression	95
18.	Rohdatenwerte: IL-11 Tag 9 48 h r-hCG Proteinsekretion	96
19.	Rohdatenwerte: IL-15 Tag 6 24h Inkubation mit r-hCG m-RNA Expression	98
20.	Rohdatenwerte: IL-15 Tag 9 24 h hCG m-RNA Expression	100
21.	Rohdatenwerte: IL-15 Tag 9 48h hCG m-RNA Expression	102

6.3 Grafiken

1.	IL-11 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe mRNA-Expression	86
2.	IL-11 ESC ohne Dezidualisierung nach 24 Stunden / Kontrollgruppe Proteinsekretion	87
3.	IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden mRNA-Expression	88
4.	IL-11 Tag 6 nach 24 Stunden Proteinsekretion	90
5.	IL-11 Tag 9 24 Stunden mRNA-Expression	92
6.	IL-11 Tag 9 24 Stunden Proteinsekretion	93
7.	IL-11 Tag 9 48 h r-hCG m-RNA Expression	94
8.	IL-11 Tag 9 48 h r-hCG Proteinsekretion	96
9.	IL-15 Tag 6 24h Inkubation mit r-hCG m-RNA Expression	97
10.	IL-15 Tag 9 24 h hCG m-RNA Expression	99
11.	IL-15 Tag 9 48h hCG m-RNA Expression	101

6.4 Literaturverzeichnis

- Ain, R., Trinh, M. L., Soares, M. J. (2004). Interleukin-11 signalling is required for the differentiation of natural killer cells at the maternal-fetal interface. *Dev Dyn.* 231(4): 700-708.
- Baird, D. D., Weinberg, C. R., Wilcox, A. J. et al. (1991). Hormonal profiles of natural conception cycles ending in early, unrecognized pregnancy loss. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism* 72, 793-800.
- 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.
- Bilinski, P., Reepenian, D., Gossler, A. (1998). Maternal IL-11 Ralpha function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice. *Genes Dev* 12, 2234-2243.
- Bischof, P., Martelli, M., Campana, A., Itoh, Y., Ogata, Y., Nagase, H. (1995). Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy* 1, 263-269.
- Bonduelle, M. L., Dodd, R., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. (1988). Chorionic gonadotrophin- β mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Human Reproduction* 3, 909-914.
- 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.
- 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.
- Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., Waldmann, T. A. (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukaemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4935-4939.
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M. A. (1994). Interleukin 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180, 1395-1403.

- Carson, W. E., Ross, M. E., Baiocchi, R. A., Marien, M. J., Boiani, N., Grabstein, K., Caligiuri, M. A. (1995). Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest* 96, 2578-2582.
- Chegini, N., Ma, C., Roberts, M., Williams, R. S., Ripps, B. A. (2002). Differential expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 throughout the menstrual cycle in Endometrium of normal fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 56, 93-110.
- Chegini, N., Roberts, M., Ripps, B. (2003). Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic Endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. *Am J Reprod Immunol*. 49 (2), 75-83.
- Chen, H. F., Lin, C. Y., Chao, K. H., Wu, M. Y., Yang, Y. S., Ho, H. N. (2002). Defective production of interleukin-11 by decidua and chorionic villi in human anembryonic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2320-2328.
- Cork, B. A., Li, T. C., Warren, M. A., Laird, S. M. (2001). Interleukin-11 in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro. *J Reprod Immunol* 50, 3-17.
- Cork, B. A., Tuckerman, E. M., Li, T. C., Laird, S. M. (2002). Expression of interleukin-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 8, 841-848.
- Cullinan, E. B., Abbonadanzo, S. J., Anderson, P. S., Pollard, J. W., Lessey, B. A., Stewart, C. L. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human expression suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3115-3120.
- Cullinan, E. B., Abbondazo, S. J., Anderson, P. S., Pollard, J. W., Lessey, B. A., Stewart, C. L. (1996). Leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human Endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3115-3210.
- 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.
- Dietl, J. (2001). Implantation aus molekularer Sicht. *Der Gynäkologe*; 34: 485-493.

- Dimitriadis, E., Robb, L., Salamonsen, L. A. (2002). Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8, 636-643.
- Dimitriadis, E., Salamonsen, L. A., Robb, L. (2000). Expression of interleukin 11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod* 6, 907-914.
- Dimitriadis, E., Sharkaey, A. M., Tan, Y. L., Salamonsen, L. A., Sherwin, J. R. (2007). Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, Interleukin 11 and leukemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod Biol Endocrinol* 2007 Nov 29; 5:44.
- Dimitriadis, E., Stoikos, C., Baca, M., Fairlie, W. D., McCoubrie, J.E., Salamonsen, L. A. (2005). Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(6); 3458-3465.
- Dimitriadis, E., Stoikos, C., Stafford-Bell, M., Clark, I., Paiva, P., Kovacs, G., Salamonsen, L. A. (2005). Interleukin-11, IL-11 receptor alpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *Reprod Immunol.* 69(1): 53-64.
- Dimitriadis, E., Stoikos, C., Tan, Y. L., Salamonsen, L. A. (2006). Interleukin 11 signalling components signal transducer and activator of transcription 3 and suppressor of cytokine signalling 3 regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 147(8): 3809-3817.
- Dimitriadis, E., White, C. A., Jones, R. L., Salamonsen, L. A. (2005). Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 11(6), 613-630.
- Karpovich, N., Chobotova, K., Carver, J., Heath, J. K., Barlow, D. H., Mardon, H. J. (2003). Expression and function of interleukin-11 and its receptor alpha in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 9, 75-80.
- Du, X. X., Williams, D. A. (1994). Interleukin-11: a multifactorial growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood* 83, 2023-2030.
- Ducan, W. C. (2000). The human corpus luteum: remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Reviews of Reproduction* 5, 12-17.

- Dunn, C., Critchley, H. O., Kelly, R. W. (2002). IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87, 1898-1901.
- 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.
- Ejskjaer, K., Sorensen, B. S., Poulsen, S. S., Mogensen, O., Forman, A., Nexø, E. (2005). Expression of the epidermal growth factor system in human Endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 11, 543-551.
- 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.
- Ferry, B. L., Starkey, P. M., Sargent, I. L. (1990). Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD 56-positive large granular lymphocytes. *Immunology* 70, 446-452.
- 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.
- Fishel, S. B., Edwards, R. G., Evans, C. J. (1984). Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro. *Science* 223, 816-818.
- Fluhr, H., Bischof-Islami, D., Krenzer, S., Licht, P., Bischof, P., Zygmont, 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. *Fertile Steril* 90: 1390-1395.
- Fluhr, H., Carli, S., Deperschmidt, M., Wallwiener, D., Zygmont, M., Licht P. (2007). Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*; 2008; 90: 1384-9.
- 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.

- 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.
- Hearn, J. P., Hodges, J. K., Gems, S. (1988). early secretion of chorionic Gonadotrophin by marmoset embryos in vivo and in vitro. *Journal of Endocrinology* 119, 249-255.
- Herrler, A., von Rango, U., Beier, H. M. (2003). Embryo-maternal signalling: How the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, Volume 6, no. 2 .
- Hof, H., Dörries, R. (2005). *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Verlag Seite 39.
- Hurskainen, T., Hoyhtya, M., Tuuttila, A., Oikarinen, A., Autio-Harmainen, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Schiebler, T. H. (1996). *Histologie*. Springer Verlag.
- Kane, M. T., Morgan, P. M., Coonan, C. (1997). Peptide growth factors and preimplantation development. *Human Reproduction Update* 3, 137-157.
- Kang, J., Der, S.D. (2004). Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life. *Curr Opin Immunol* 16, 180-190.

- Karpovich, N., Klemmt, P., Hwang, J. H., Mcveigh, J. E., Heath, J. K., Barlow, D. H., Mordon, H. J. (2004). The production of IL-11 and decidualization are compromised in endometrial SC derived from patients with infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(3): 1607-1612.
- Kayisli, U. A., Aksu, C. A. H., Berkkanoglu, M., Arici, A. (2003). Estrogenicity of Isoflavones on Human Endometrial Stromal and Glandular Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 87, No. 12 5539-5544.
- Kim, J. J., Jaffe, R. C., Fazleybas, A.T. (1999). Blastocyst invasion and stromal response in primates. *Hum Reprod* 14 (Suppl 2), 45-55.
- King, A., Wheeler, R., Carter, N.P. (1992). The response of human decidual leukocytes to IL-2. *Cellular Immunology* 141, 409-421.
- Kitaya, K., Yamaguchi, T., Honjo, H. (2005). Central role of interleukin-15 in postovulatory recruitment of peripheral blood CD 16 (-) natural killer cells into human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (5), 2932-2940.
- Kitaya, K., Yasuda, J., Yagi, I., Tada, Y., Fushiki, S., Honjo, H. (2000). IL-15 expression at human endometrium and decidua [In Process Citation]. *Biology of Reproduction* 63, 683-687.
- Kojima, K., Kanzaki, H., Iwai, M., Hatayama, H., Fujimoto, M., Inoue, T., Horie, K., Nakayama, H., Fujita, J., Mori, T. (1994). Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 50, 882-887.
- 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.
- Laird, S. M., Tuckerman, E. M., Dalton, C. F., Dunphy, B. C., Li, T .C., Zhang, X. (1997). The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 12, 569-574.
- Lédée-Bataille, N., Bonnet-Chea, K., Hosny, G., Dubanchet, S., Frydman, R., Chaouat, G. (2005). Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15 and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertile Steril.* 83(3), 598-605.
- Lessey, B. A. (2000). Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*; 14: 775-788.

- Licht, P., Fluhr, H., Neuwinger, J., Wallwiener, D., Wildt, L. (2007). Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol.* 269: 85-92.
- Licht, P., Losch, A., Dittrich, R., Neuwinger, J., Siebzehnrubl, E., Wildt, L. (1998). Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. *Hum. Reprod. Update.*; 4: 532-538.
- Licht, P., Losch, A., Dittrich, R., Neuwinger, J., Siebzehnrubl, E., Wildt, L. (1998). Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. *Hum. Reprod. Update.*; 4: 532-538.
- Licht, P., Russu, V., Lehmeyer, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lopata, A., Oliva, K., Stanton, P.G., Robertson, D.M. (1997). Analysis of chorionic gonadotrophin secreted by cultured human blastocysts. *Molecular Human Reproduction*, Vol 3, 517-521.
- 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.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie. Verstehen - Lernen – Nachschlagen.* Thieme Verlag.
- 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.

- Miyazaki, S., Tanebe, K., Sakai, M. (2002). Interleukin-2 receptor gamma chain (gamma(c)) knockout mice show less regularity in estrous cycle but achieve normal pregnancy without fetal compromise. *American Journal of Reproductive Immunology* 47, 222-230.
- Murphy, L. J., Murphy, L. C., Friesen, H. G. (1987). Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Molecular Endocrinology* 1, 445-450.
- Norwitz, E. R. (2006). Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. *Reprod. Biomed. Online*; 13: 591-599.
- Okada, H., Nakajima, T., Sanezumi, M., Ikuta, A., Yasuda, K., Kanzaki, H. (2000a). Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4765-4770.
- Okada, H., Nakajima, T., Yasuda, K., Kanzaki, H. (2004). Interleukin-1 inhibits interleukin-15 production by progesterone during in vitro decidualization in human. *J Reprod Immunol* 61, 3-12.
- Okada, S., Okada, H., Sanezumi, M., Nakajima, T., Yasuda, K., Kanzaki, H. (2000b). Expression of interleukin-15 in human endometrium and deciduas. *Mol Hum Reprod* 6, 75-80.
- Pampfer, S., Tabibzadeh, S., Chuan, F. C., Pollard, J. W. (1991). Expression of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) messenger RNA in human endometrial glands during the menstrual cycle: molecular cloning of a novel transcript that predicts a cell surface form of CSF-1. *Mol Endocrinol* 5, 1931-1938.
- Piccinni, M. P., Scaletti, C., Mavilia, C., (2001a). Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *European Journal of Immunology* 31, 2431-2437.
- Piccinni, M. P., Scaletti, C., Vultaggio, A. (2001b). Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *Journal of Reproduction Immunology* 52, 35-43.
- Rhoton-Vlasak, A., Chegini, N., Hardt, N., Williams, R. S. (2005). Histological characteristics and altered expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 in endometria of levonorgestrel users with different uterine bleeding patterns. *Fertil Steril* 83(3), 659-665.

- Robb, L., Li, R., Hartley, L., Nandurkar, H. H., Koentgen, F., Gegley, C.G. (1998). Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med* 4, 303-308.
- Roberts, M., Luo, X., Chegini, N. (2005). Differential regulation of interleukins IL-13 and IL-15 by ovarian steroids, TNF-alpha and TGF-beta in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 11(10), 751-760.
- Rogers, P. A. (1995). Current studies on human implantation: a brief overview. *Reprod. Fertil. Dev.*; 7: 1395-1399.
- Sands, B. E., Bank, S., Sninsky, C. A., Robinson, M., Katz, S., Singleton, J. W., Miner, P. B., Safidi, M. A., Galandiuk, S., Hanauer, S. B. (1999). Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology* 117, 58-64.
- 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.
- Schatz, F., Aigner, S., Papp, C. (1995). Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80, 2504-2510.
- Schiebler, T. H., Schmidt, W. (2003). *Anatomie*. Springer Verlag
- Seder, R. A., Grabstein, K. H., Berzofsky, Mc Dyer, J. F. (1995). Cytokine interactions in human immunodeficiency virus individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL-12, and IL-15. *J Exp Med* 182, 1067-1077.
- Sharkey, A. M., Dellow, K., Blayney, M., (1995). Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biology of Reproduction* 53, 974-981.
- Simón, C., Moreno, C., Remohi, J., Pellicer, A. (1998a). Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Human Reproduction* 13, 219-232.
- Simón, C., Valbuena, D., Krussel, J. (1998b). Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertility and Sterility* 70, 896-906.
- Stauber, M., Weyerstahl, T. (2005). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Thieme Verlag Seite 78.

- Staun-Ram, E., Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol.*; 3: 56.
- Stewart, C. L. (1994). The role of leukaemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 734, 157-165.
- 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.
- 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.
- Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., von Wolff, M. (2006). The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reprod Update*, Vol.12, No.5 pp. 617-630.
- Tang, B., Guller, S., Gurdide, E. (1993). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology*; 133: 2197-2203.
- Tanka, T., Sakamoto, T., Miyama, M., Ogita, S., Umesaki, N. (2001). Interleukin-11 enhances cell survival of decidualized normal human endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol* 15: 272-278.
- Tesarik, J., Hazout, A., Mendoza, C. (2003). Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. *Reprod. Biomed. Online.*; 7: 59-64.
- Verma, S., Hiby, S. E., Loke, Y. W., King, A. (2000). Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 62, 959-968.
- von Rango, U., Alfer, J., Kertschanska, S., Kemp, B., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., Beier, H. M., Classen-Linke, I. (2004). Interleukin-11 expression: is significance in eutopic and ectopic human implantation. *Mol Hum Reprod* 10, 783-792.
- 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.
- 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.

Woodward, B. J., Lenton, E. A., Turner, K. (1993). Human chorionic gonadotrophin: embryonic secretion is a time-dependent phenomenon. *Human Reproduction* 8, 1463-1468.

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.

6.5 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro entspricht 10 ⁻⁶
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Basalis	Stratum basale des Endometriums
ca.	circa, ungefähr
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Corpus luteum	Gelbkörper
CSF	koloniestimulierender Faktor
Ct-Wert	Threshold-Cycle Wert
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	Ampuwa
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DSC	dezidualisierte Stromazellen
E ₂	Östrogen
EGF	Epidermal Growth Faktor
EGF-R	Epidermal Growth Faktor Rezeptor
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPF	Early Pregnancy Faktor
ESC	endometriale Stromazellen
EZM	extrazelluläre Matrix
FSH	follikel stimulierendes Hormon
Funktionalis	Stratum functionale des Endometriums
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin

IGFBP-1	Insulin Growth Faktor Binding Protein
IL	Interleukin
IVF	In vitro Fertilisation
l	Liter
LASH	lapraskopisch assistierte suprazervikale Hysterektomie
LATH	lapraskopisch assistierte totale Hysterektomie
LH	luteinisierendes Hormon
LIF	Leukämie Inhibitions Faktor
M	Meter
M	Molarität, molar
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Faktor
MIC-1	Activin A und Makrophagen hemmendes Protein-1
min	Minute (n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	matrizielle Metalloproteinasen
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
n	Nano entspricht 10^{-9}
PAF	Aktivierungsfaktor der Thrombozyten
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIF	Prolaktin Inhibiting Faktor
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PR	Prostaglandin
PRL	Prolaktin
pSTAT3	phosphorylation signalling transduced and activator of transcription 3
r-hCG	rekombinantes humanes Choriongonadotropin
RIF	repeated implantation failure
RLX	Relaxin
RNA	Ribonucleinsäure

RT	reverse Transkription
rt-PCR	realtime Polymerase Ketten Reaktion
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Taq	Thermus aquaticus
TF	Tissue faktor
TGF- β	Transforming growth faktor
TIMP	Tissure Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
uNK-Zellen	uterine natürliche Killerzellen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

7. Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Peter Licht ganz herzlich bedanken, dass ich unter seiner Leitung in der Laborabteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Universitätsfrauenklinik Tübingen meine ersten wissenschaftlichen Schritte im Zuge dieser Arbeit gehen durfte.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Diethelm Wallwiener für die Doktorandenstelle an der Universitätsfrauenklinik Tübingen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Herbert Fluhr für die kompetente Betreuung während dieser Zeit. Für alle Anregungen zum Thema dieser Arbeit, sowie für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen, bedanke ich mich ganz herzlich. Danke für die konstruktive, motivierende Unterstützung und Beratung in allen methodischen und thematischen Belangen.

Für die praktische Einarbeitung in die experimentellen Methoden bedanke ich mich bei Frau Margarita Deperschmidt, einer überaus kompetenten MTA. Ihre ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit haben mir sehr weitergeholfen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Werner und Elisabeth Sachs für die seelische, moralische und auch finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums und auch während dieser Arbeit.

Herzlichen Dank auch an meinen Bruder, Christoph Sachs, für die Tipps und Tricks zur Formatierung dieser Dissertation.

Last but not least möchte ich mich bei meinem Mann Hartmut Nill bedanken, der mich immer wieder neu während meines gesamten Studiums und der Zeit der wissenschaftlichen Arbeit motiviert und angespornt hat.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ellen Sachs-Nill geb. Sachs
Geburtsdatum	11.03.1980
Geburtsort	Schwäbisch Hall
Familienstand	verheiratet, ein Kind

Schul- und Berufsausbildung

1986 – 1990	Grundschule Kupferzell
1990 – 1996	Georg-Wagner-Realschule in Künzelsau Erlangung der mittleren Reife
1996 – 1999	Ausbildung zur Kauffrau in der Grundstücks- und Wohnungswirtschaft Schwäbisch Hall Immobilien GmbH
1999 – 2002	Wirtschaftsgymnasium Öhringen Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

10/2002 – 03/2003	Biologie und Mathematik Studium
10/2003 – 03/2005	Vorklinischer Studienabschnitt der Humanmedizin
Frühjahr 2005	Ärztliche Vorprüfung
ab 03/2005	Klinischer Studienabschnitt
02/2008 – 06/2008	Praktisches Jahr : 1. Terial: Innere Medizin am Klinikum Steinenberg in Reutlingen
06/2008 – 02/2009	Unterbrechung des Praktischen Jahres aufgrund Elternzeit
02/2009 – 10/2009	Praktisches Jahr 2. Terial: Chirurgie am Klinikum Steinenberg in Reutlingen
10/2009 – 01/2010	3. Terial: Dermatologie an der Universitäts- Hautklinik in Tübingen
26.11.2010	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)