

Aus der Frauenklinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. G. Bender

**In vitro-Einfluss von Zytokinen auf die Chorioncarcinom-
Zelllinien JEG-3, JAR und BeWo**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Sparenberg

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan
Referentin: Prof. Dr. rer. nat. U. Koldovsky
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. V. Küppers

... für

Dietke

Günter

Ursula

Michael

Umberto

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. U. Koldovsky, die diese Arbeit mit einem außergewöhnlichen Engagement betreut hat.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Chorioncarcinom	1
1.1.1 Der Trophoblast	1
1.1.1.1 Der Trophoblast als Ursprungsgewebe	1
1.1.1.2 Physiologie des Trophoblasten, Stellenwert in einer regulär verlaufenden Schwangerschaft	2
1.1.2 Chorioncarcinom, ein maligner, epithelialer Tumor	4
1.1.3 Vergleich der molekularbiologischen Mechanismen der physiologischen Trophoblasten- und der pathologischen Tumorinvasion – Parallelen und Unterschiede	5
1.1.4 Klinisch-pathologische Verlaufsformen des Chorioncarcinoms	8
1.1.5 Therapieoptionen und Prognose des Tumorleidens	8
1.2 MMP-TIMP-Systeme	10
1.2.1 Matrix-Metallo-Proteinasen	10
1.2.2 Tissue-Inhibitors-of-Matrixmetallo-Proteinases (TIMP)	11
1.2.3 Wechselwirkungen im MMP-TIMP-System und deren Regulation durch Zytokine	11
1.3 Zytokine	12
1.3.1 Struktur und allgemeine Funktionen von Zytokinen	12
1.3.2 Epidermal Growth Factor	12
1.3.3 Interleukin-1 β	14
1.3.4 Leucaemia Inhibitory Factor	15
1.3.5 Transforming Growth Factor- β_1	16
1.3.6 Interferon- γ	17

1.4 Chorioncarcinomzelllinien	19
1.4.1 JEG-3	19
1.4.2 JAR	20
1.4.3 BeWo	20
1.5 In vitro Systeme	21
1.5.1 Allgemeines	21
1.5.2 Aussagekraft und Wertigkeit der in-vitro-Ergebnisse als Modell für in-vivo-Verhältnisse	21
2. Fragestellung	22
3. Materialien	23
4. Methoden	
4.1 Zellkultur	25
4.2 Vorbereitung der Stimulationsversuche	25
4.3 Versuche	26
4.3.1 Stimulationsversuche	26
4.3.2 Durchführung der Stimulationsversuche	26
4.3.3 Zytokinkonzentrationen	27
4.4 ELISA und Photometrie	27
4.4.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay (ELISA), schematisierter ELISA-Aufbau	27
4.4.2 Photometrie, schematisierter Aufbau eines Photometers	28
4.5 Semiquantitativer Nachweis von MMP-2, -3, -9 und TIMP-1, -2	29
4.6 Histologie	30
4.6.1 Histologische Aufbereitung der Zellen aus den Stimulationsversuchen	30
4.6.2 HE-Färbung, Hämatoxilin-Eosin-Färbemethode	30
4.6.3 Morphologische Kriterien für Stimulation oder Inhibition des Zellwachstums	30

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse von ELISA und Photometrie	31
5.1.1 Standardkurven	31
5.1.1.1 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen der MMP-2	31
5.1.1.2 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen der MMP-3	31
5.1.1.3 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen der MMP-9	32
5.1.1.4 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen des TIMP-1	32
5.1.1.5 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen des TIMP-2	33
5.1.2 Ermittlung der MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 – Konzentrationen anhand der Standardkurven	33
5.1.2.1 Extinktions-Messwerte (OD) und Konzentrationen von MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 unter Zytokineinfluss der Zellreihe JEG-3	34
5.1.2.2 Extinktions-Messwerte (OD) und Konzentrationen von MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 unter Zytokineinfluss der Zellreihe JAR	35
5.1.2.3 Extinktions-Messwerte (OD) und Konzentrationen von MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 unter Zytokineinfluss der Zellreihe BeWo	36
5.2 Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Zellen aus den Stimulationsversuchen	37
5.2.1 Epidermal Growth Factor	37
5.2.2 Transforming Growth Factor β_1	38
5.2.3 Leucaemia Inhibitory Factor	38
5.2.4 Interleukin-1 β	39
5.2.5 Interferon- γ	40

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	41
5.3.1 Aus ELISA und Photometrie	41
5.3.1.1 Für JEG-3	41
5.3.1.2 Für JAR	42
5.3.1.3 Für BeWo	42
5.3.1.4 Übersichtstabelle	43
5.3.2 Aus der histologischen Aufbereitung der untersuchten Zellen JEG-3 und JAR	44
6. Diskussion	45
7. Zusammenfassung	49
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	50

Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
β -HCG	β - humanes Choriongonadotropin
C	Konzentration
E	Extinktion
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
FCS	Fetales Kälberserum
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
ICM	Interzelluläre Matrix
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin 1 β
LIF	Leucaemia Inhibitory Factor
MAF	Macrophag Activating Factor
Mi / GF	Mitosen pro Gesichtsfeld
Mi / 10 GF	Mitosen pro zehn Gesichtsfelder
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MPS	Mononukleäres Phagozytosesystem
MRP	Meerrettich Peroxidase
OD	Optic density
P / S	Penicillin / Streptomycin
T	Transmission
TGF- β_1	Transforming Growth Factor β_1
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetallo Proteinases
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinhydrogenperoxid

1. Einleitung

1.1 Chorioncarcinom

Das Chorioncarcinom ist in vielerlei Hinsicht ein ungewöhnlicher Tumor. Zum einen sind die malignen Zellen –im Gegensatz zu allen anderen Carcinomen- nicht ektodermaler Herkunft, wie durch die Klassifizierung als Carcinom suggeriert wird. Zum anderen stellt das Chorioncarcinom die maligne Entartung eines Ursprungsgewebes dar, das selbst in seiner normalen, physiologischen Form –temporär und streng lokal begrenzt- Malignitätskriterien erfüllt.¹ Es ist daher von besonderem Interesse, ein möglichst umfassendes Bild von diesem Tumor und seinem Ausgangsgewebe zu erlangen, um zwischen physiologischen und pathologischen Abläufen differenzieren zu können. Die Erkenntnisse sind sowohl für das bessere Verständnis der Vorgänge einer regulär verlaufenden Schwangerschaft, als auch für die Tumorphysiologie dieses ungewöhnlichen Carcinoms, insbesondere im Hinblick auf die Modifikation und Entwicklung zukünftiger Therapiekonzepte von Interesse.

1.1.1 Der Trophoblast

1.1.1.1 Der Trophoblast als Ursprungsgewebe

Zu Beginn einer Schwangerschaft kommt es zunächst lediglich zu einer Zunahme der Zellzahl und des Zellvolumens des sich entwickelnden Keims. Die bekannten Reifestadienbezeichnungen sind daher in dieser Phase ausschließlich an der Zellquantität orientiert und tragen z.T. deskriptive Namen wie die Morula (Maulbeere). Am vierten Tag nach der Befruchtung tritt die Morula in den ersten (qualitativen) Differenzierungsprozess ein. Sie entwickelt sich zur Blastozyste, was eine Differenzierung der Zellen in einen Embryoblast und einen Trophoblast zur Folge hat. In dieser frühen Phase der Schwangerschaft wird dem Trophoblasten eine Art zytologische Priorität eingeräumt. So haben Untersuchungen in vitro gezeigt, dass die Ratio zwischen Trophoblast und Embryoblast in der Blastozyste bei 99 : 8 Zellen (92.5 %) liegt.² Dieser Zusammenhang erklärt sich aus der biologischen Funktion der unterschiedlichen Zellen. Während sich aus dem Embryoblast der eigentliche Embryo entwickelt, kommt dem Trophoblasten eine kommunizierende und versorgende Aufgabe zu.

¹ Vgl. Bass KE et al. 1997: 61-7

² Vgl. Knörr K et al. 1989

1.1.1.2 Physiologie des Trophoblasten, Stellenwert in einer regulär verlaufenden Schwangerschaft

Der frühe Trophoblast muss zunächst eine Schwangerschaft im engeren Sinne ermöglichen. Vornehmliche Priorität hat dabei das Eindringen in den maternalen Organismus.

Hierzu muss unter sensibler Zell-Zell-Kommunikation über eine Vielzahl von parakrinen Mediatoren von Trophoblast und maternaler Decidua unter strenger zeitlicher Bindung die Nidation und Implantation um den sechsten bis siebten Schwangerschaftstag erfolgen.

Später, nach weiterer Differenzierung in Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast sowie in andere z. T. funktionell hochdifferenzierte Strukturen wie das extraembryonale Meso- und Entoderm, bildet der Trophoblast mit seinen Derivaten den embryonalen Teil der Placenta und stellt damit die Substratversorgung (Nährstoffe, Gasaustausch) für den sich entwickelnden Embryo sicher. Dass dem Trophoblasten aber nicht nur eine ernährende, sicherstellende und die Schwangerschaft ermöglichende Aufgabe zukommt, sondern auch eine Schwangerschaft erhaltende Funktion, zeigt seine endokrine Aktivität, vor allem als Hauptproduktionsort des β -HCG (β -humanes Choriongonadotropin)³ und anderer steroidaler Schwangerschaftshormone.

Um den o. g. biologischen Anforderungen Rechnung zu tragen, muss der Trophoblast gleich eine Vielzahl von molekularbiologischen, immunologischen und anderen Vorgängen, die die Zell-Zell- und die Zell-Interzellulärmatrix-Interaktionen betreffen, in Einklang bringen. Am wichtigsten scheint zunächst die Fähigkeit, in einem lokal und temporär sensibel gesteuerten Vorgang, den maternalen Organismus, die Decidua, zu penetrieren und als aggressiv-invasives Gewebe Interzellulärmatrix zu degenerieren und vaskuläre Strukturen zu arrodieren, um die nutritive Versorgung des Keims zu gewährleisten.⁴

Auf molekularbiologischer Ebene wird dieses durch eine Reihe bekannter Faktoren bewerkstelligt.

Aufgrund der Komplexität der Vorgänge wird im Folgenden auf einige ausgewählte, zentrale Prozesse fokussiert. Hierbei seien als einer der Hauptmechanismen die Aktivität von Enzymen, insbesondere von Proteasen genannt, deren Substrate Kollagene und andere Bestandteile der Interzellulärmatrix sind.⁵

³ Vgl. Licht P et al. 2001: 37-47

⁴ Vgl. Knörr K et al. 1989

⁵ Vgl. Hulboy DL et al. 1997 : 27-45

Morphologische Beobachtungen zeigten, dass die Enzyme an den basolateralen Zellseiten des Trophoblasten sezerniert werden.⁶ Eine Tatsache, der neben dem Wissen um die Polarität des Trophoblasten auch eine entscheidende funktionelle Bedeutung für das Mikromilieu beigemessen wird.

Durch ihre proteolytische Aktivität ermöglichen die Enzyme die Degeneration der Gewebetextur und damit das Eindringen des Embryos in die mütterliche Uterusschleimhaut. Als wichtige Vertreter gelten die Matrixmetalloproteinasen (MMP) (s. 1.2). Bei genauer Betrachtung der Vorgänge konnten direkte Abhängigkeiten von der Anwesenheit / Produktion bestimmter MMP und dem Grad oder der Fähigkeit zur Invasion des Trophoblasten herausgearbeitet werden.⁷

So ist der Grad der Invasivität des Trophoblasten unmittelbar von Anwesenheit und Konzentration der MMP-2 (Gelatinase-A) abhängig. Im frühen Trophoblasten (6. Gestationswoche) zeigt eine verstärkte Expression dieser Protease eine unmittelbar aggressivere Invasivität. Die Expression von MMP-2 ist in diesem Entwicklungsstadium noch sehr viel höher als etwa von MMP-9 (Gelatinase-B), die ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Keiminvasion spielt.⁸ Im späteren Trophoblasten (37. Gestationswoche) ist nur noch die Produktion von MMP-9, jedoch nicht der MMP-2, nachweisbar.

Durch Beobachtungen an Trophoblasten, die keine MMP-9 produzieren können, konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass zwar der Grad der Invasivität MMP-2 vermittelt ist, in Abwesenheit von MMP-9 jedoch keine Invasion stattfindet.⁹

Neueste Arbeiten sprechen dem Agonisten-Antagonisten-Verhältnis von MMP-26 und TIMP-4 eine weitere relevante, jedoch derzeit noch unscharf umrissene Aufgabe bei den Implantationsabläufen zu.¹⁰

⁶ Vgl. Sawicki G et al. 2000 : 1390-5

⁷ Vgl. Yodate T et al. 1996 : 191-8

⁸ Vgl. Librach CL et al. 1994 : 17125-31

⁹ Vgl. Morgan M et al. 1998 : 18-26

¹⁰ Vgl. Zhang J et al. 2002 : 659-66

1.1.2 Chorioncarcinom, ein maligner, epithelialer Tumor

Das Chorioncarcinom ist ein hoch maligner Tumor, der makroskopisch häufig knotig derb und aufgrund seiner hämorrhagischen Durchsetzung oft livide verfärbt imponiert. Histologisch handelt es sich um anaplastische Zellen (s. Abb. 3), die jedoch meist noch nach ihrer Abstammung vom Zytotrophoblast oder Synzytiotrophoblast differenziert werden können und im Zellverband epithelial wachsen.

Etwa 50 % der Chorioncarcinome entstehen aus kompletten Blasenmolen (s. Abb. 2), wobei die maligne Transformation sowohl primär im Uterus als auch in den beschriebenen, metastasenartigen, hämatogenen Zellverschleppungen (häufig pulmonal) stattfinden kann.

Das Entartungsrisiko einer Mola hydatiformis liegt zwischen 3 – 7 %.

Von den verbleibenden 50 % der gesamten Chorioncarcinome entwickeln sich ca. 20 % spontan aus einer bis zu diesem Zeitpunkt völlig unauffälligen Placenta meist nach der 20. Schwangerschaftswoche. Die restlichen 30 % sind auf Spontanaborte zurückzuführen, wobei das Risiko der Entartung mit der Anzahl der vorausgegangenen Aborte um ein Vielfaches steigt.¹¹

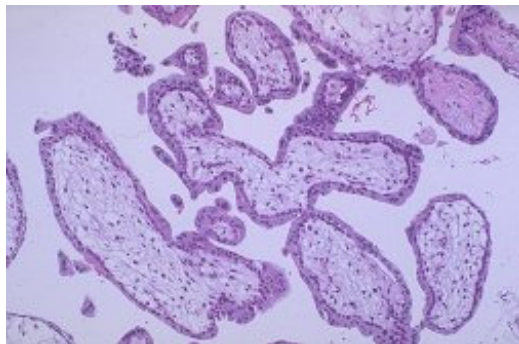


Abb. 1: Normale embryonale Placenta, 1. Trimester

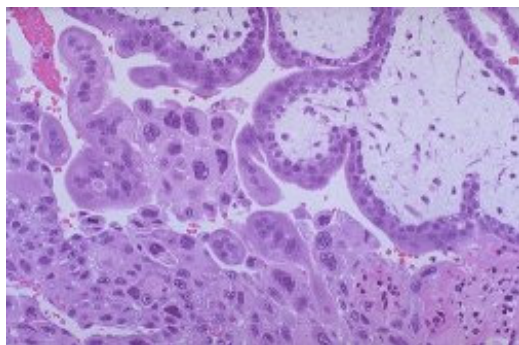


Abb. 2: Blasenmole

¹¹ Vgl. Knörr K et al. 1989

Abbildungen 1, 2 und 3 mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. E.C. Klatt, MD, USA

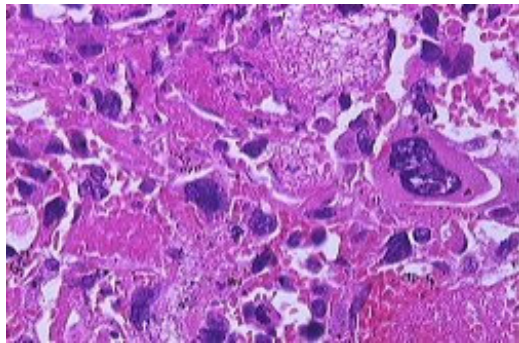


Abb. 3: Chorioncarcinom

1.1.3 Vergleich der molekularbiologischen Mechanismen der physiologischen

Trophoblasten- und der pathologischen Tumorinvasion – Parallelen und Unterschiede

Wie bereits erwähnt gibt es offensichtliche Ähnlichkeiten in den Vorgängen um Nidation und Implantation einerseits und maligner Invasion und Metastasierung andererseits.¹²

Auch bei genauerer Betrachtung scheint der einzige funktionelle Unterschied zwischen dem Trophoblasten des ersten Schwangerschaftstrimesters und der maligne transformierten Abart allein in der zeitlichen (1. Trimester) und lokalen Begrenzung (Endometrium und subepitheliales Myometrium) der Invasion zu liegen.

Viele Arbeiten haben nachgewiesen, dass bei malignen Tumoren,¹³ nicht nur bei Chorioncarcinomen, sondern auch nasopharyngealen Carcinomen,¹⁴ Ovarial-,¹⁵ Endometrium-¹⁶ und Cervixcarcinomen¹⁷ oder dem kleinzelligen Bronchialcarcinom,¹⁸ Gallengangs-,¹⁹ Magen-²⁰ und Mammacarcinomen²¹ den Matrixmetalloproteinasen, vornehmlich den Gelatinasen (MMP-2 und -9), eine Schlüsselrolle bei der Invasion und Metastasierung zukommt,²² ebenso wie bei der Invasion des Trophoblasten in die Gebärmutter Schleimhaut.²³

Hierdurch stellt sich zwangsläufig die Frage nach den Unterschieden zwischen Physiologie und Pathologie, die aus o. g. Gründen am evidentesten am Beispiel der Trophoblasten-Chorioncarcinom-Unterscheidung auszumachen ist.

¹² Vgl. Kawata R et al. 2002 : 101-6

¹³ Vgl. Liu G et al. 2001 : 216-8 und Kawata R et al. 2002 : 101-6

¹⁴ Vgl. Zhang X et al. 1999: 356-8

¹⁵ Vgl. Cai W et al. 2002 : 91-4

¹⁶ Vgl. Guo W et al. 2002 : 604-7 und Di Nezza LA et al. 2002: 1466-75

¹⁷ Vgl. Zhou CY et al. 2002 : 735-9 und Ueda M et al. 2000 : 176-83

¹⁸ Vgl. Schutz A et al. 2002 : 179-84 und Hrabec E et al. 2002 : 197-204

¹⁹ Vgl. Fan YZ et al. 2002 : 1138-43

²⁰ Vgl. Monig SP et al. 2001 : 597-602

²¹ Vgl. Djonov V et al. 2002 : 25-30

²² Vgl. Yudate T et al. 1996 : 191-8 und Monig SP et al. 2001 : 597-602

²³ Vgl. Bischof P et al. 1995 : 263-9

Die Herausstellung der Unterschiede, insbesondere auf der regulativen Ebene, ist Gegenstand großer wissenschaftlicher Anstrengung, die sich in der Vielzahl der internationalen Publikationen widerspiegelt.

Obwohl bislang eine Vielzahl von Ansätzen, die im Einzelnen untenstehend zusammengefasst werden, erarbeitet wurden, zeichnet sich derzeit jedoch noch keine verlässliche, einheitliche Lehrmeinung ab, die der Komplexität und Vielzahl der z.T. uneinheitlich interpretierten Beobachtungen gerecht würde.

Ein relativ früh aufgestelltes Erklärungsmodell fußt auf der Annahme einer endogenen Imbalance im MMP-TIMP-Verhältnis zugunsten der proinvasiven Faktoren (MMP)²⁴, die zu einer Entartung des Gewebes führt. So konnte eine vergleichende Studie eine höhere Produktion von MMP-2 und MMP-9 im Tumorgewebe als im Zytotrophoblasten bei relativ geringerer TIMP-1 und absolut geringerer TIMP-2 Konzentration feststellen.²⁵

Andere Konstrukte beziehen die Beobachtung mit ein, dass der Zytotrophoblast mit der Decidua und der interzellulären Matrix über parakrine Botenstoffe regelrecht kommuniziert und interagiert. In diesem Rahmen wird der Decidua eine Einflussnahme auf die Sekretion von MMP (insbesondere MMP-9) und TIMP (insbesondere TIMP-3) und damit der Invasivität zugesprochen. Im Endeffekt bewirkt das Endometrium eine Herunterregulation (downregulation) von MMP-2 und MMP-9 und eine Hochregulation (upregulation) von TIMP-1²⁶ und ist damit insgesamt invasionshemmend.²⁷

In anderer „Kommunikationsrichtung“ konnte während der Implantationsphase eine -vermutlich trophoblasteninduzierte- Produktion von MMP-9 und TIMP-3 durch die Decidua selbst gemessen werden.²⁸ Eine Störung der Trophoblasten-Decidua-Matrix-Kommunikation könnte ebenfalls eine Rolle bei der unregulierten Invasion des Chorioncarcinoms spielen.²⁹

²⁴ Vgl. Okamoto T et al. 2002 : 392-8

²⁵ Vgl. Vegh GL et al. 1999 : 248-53

²⁶ Vgl. Zhang XQ et al. 2002 : 588-91

²⁷ Vgl. Xu P et al. 2001 : 240-6 und Harvey MB et al. 1995 : 1005-14

²⁸ Vgl. Bass KE et al. 1997 : 61-7 und Harvey MB et al. 1995 : 712-8

²⁹ Vgl. Li L et al. 2000: 544-6 und Bischof P et al. 2003: 155-63

Es gibt aber auch Anhaltspunkte dafür, dass die Wechselwirkungen zwischen MMP-2 und MMP-9 als pro-Invasionsfaktoren und den TIMP-1 und TIMP-2 als Inhibitoren gegenüber dem Normalzustand unverändert zu sein scheint. Bei erhaltener Balance des Mikromilieus wird der entscheidende Unterschied hierbei in den unterschiedlichen Wirkungen von Zytokinen auf Zellen unterschiedlicher Dignität gesehen.

So kann unter Einfluss von TGF- β_1 (s. 1.3.5) bei Zytotrophoblasten und Chorioncarcinomzellen gleich hohe Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9 und damit zunächst ein gleich starkes Invasionspotential festgestellt werden, jedoch reagiert nur der Trophoblast mit einer verstärkten Expressierung von TIMP-1 und TIMP-2.³⁰ Überdies wirkt sich der allgemeine, antiproliferative Effekt des TGF- β_1 auf Epithelzellen nur bei dem Zytotrophoblasten aus, während die malignen Zellen hiervon unbeeinträchtigt bleiben und in der Konsequenz ein exazerbiertes Wachstum zeigen.³¹

Andererseits konnte festgestellt werden, dass einige Chorioncarcinomzelllinien auf IL-1 β Stimulus zwar mehr MMP-2 sezernierten, jedoch nicht mehr MMP-9 produzierten, während beim Trophoblasten eine Erhöhung der Sekretion beider Proteasen (MMP-9 > MMP-2) verzeichnet wurde.³²

Andere Zellreihen (s. 1.4.3 BeWo) waren schon primär nicht in der Lage, MMP-9 zu sezernieren.³³

Im Endeffekt entstanden benigne Zellen mit einer hohen Invasionspotenz und ein Carcinom, das nicht mehr zur Invasion befähigt zu sein scheint (s. 1.2.3), was im Hinblick auf unumstrittene funktionelle, pathologische und klinische Verläufe paradox anmutet.³⁴

Vergleichbare Unterschiede in der Wechselbeziehung zwischen verschiedenen Zytokinen und einer oder mehreren MMP (-2, -3, -9) sowie TIMP (-1, -2) in Abhängigkeit von der Dignität der untersuchten Zellen sind allerdings bislang noch unzureichend bekannt.

Mit einzubeziehen ist des weiteren die Tatsache, dass die Zytokine und andere parakrine Botenstoffe sowohl von dem Trophoblasten wie auch der Decidua selbst produziert werden.³⁵

³⁰ Vgl. Karmakar S et al. 2002 : 210-9

³¹ Vgl. Yudate T et al. 1996 : 191-8

³² Vgl. Karmakar S et al. 2002 : 210-9

³³ Vgl. Morgan M et al. 1998 : 18-26

³⁴ Vgl. Yudate T et al. 1996 : 191-8

³⁵ Vgl. Li L et al. 2000: 544-6

Eine Störung dieser Botenstoffsynthese kann auf höherer Steuerungsebene selbstverständlich analoge Auswirkungen haben, wie die primäre Imbalance zwischen fördernden und hemmenden Einflüssen (MMP-TIMP-Interaktionen).

1.1.4 Klinisch-pathologische Verlaufsformen des Chorioncarcinoms

Als hoch maligner Tumor hat das Chorioncarcinom eine hohe Tendenz zur Metastasierung. Es metastasiert ausschließlich hämatogen. Besonders häufig können pulmonale, hepatische oder cerebrale Filiae beobachtet werden, die oft lange vor dem Primarius klinisch apparent werden und zur Diagnosestellung führen. In der Anamnese besteht meist eine komplikationslose vorausgegangene Schwangerschaft und Geburt. Der Primärtumor selbst fällt, sofern er im Uterus lokalisiert ist, in der Regel durch Tumorblutung mit Tumoranämie auf.

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist im Einzelfall schwer vorhersehbar, da kurzen, fulminanten Verläufen Spontanremissionen, selbst ausgedehnter metastasierter Stadien gegenüber stehen.³⁶

1.1.5 Therapieoptionen und Prognose des Tumorleidens

Die Therapie der Wahl des Chorioncarcinoms ist die Chemotherapie. Radiatio und operative Interventionen spielen eine eher untergeordnete Rolle, kommen jedoch bei Therapieresistenz oder ausgedehnter Metastasierung adjuvant in Betracht.

Aufgrund des spezifischen Metabolismus embryonaler Zellen, konnten gute Ergebnisse unter der Therapie mit dem Folsäureantagonisten Methotrexat erzielt werden, so dass derzeit die Erkrankung im lokalisierten Stadium (keine Fernmetastasen, M₀) standardmäßig mit einer Monotherapie mit Methotrexat behandelt wird. Bei nachgewiesenen Filiae gilt eine Polychemotherapie nach verschiedenen Protokollen als aussichtsreichstes Therapiekonzept. Gegebenenfalls kann in einem ausgedehnten Stadium oder bei Tumorprogress unter der Chemotherapie eine chirurgische Intervention oder eine Radiatio ergänzend hinzutreten.

Die Prognose der gesamten therapierten Chorioncarcinomerkrankungen ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 80 – 90 % relativ günstig, wobei eine prognostische Differenzierung des Patientenkollektives in eine high-risk und eine low-risk Gruppe erfolgen muss.

³⁶ Vgl. Knörr K et al. 1989

Während in der low-risk Gruppe nahezu 100 % Heilungschance besteht, reduziert sich diese in der high-risk Gruppe auf 75 – 80 %. Die Kategorisierung in die genannten Gruppen erfolgt anhand standardisierter, empirischer Kriterien wie der Dauer der Erkrankung, dem Tumormarkerstatus, dem Vorhandensein von Metastasen und dem Ansprechen auf die Chemotherapie. Histologische Klassifizierungen wie das Grading (Einteilung nach dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen) haben sich als prognostisch nicht aussagekräftig herausgestellt.

Der größte Teil der Rezidive ereignet sich in den ersten 3 – 6 Monaten nach Beendigung der initialen Therapie. Eine engmaschige Nachsorge mit klinischem und radiologischem Re-Staging wird in jedem Falle zur Verlaufskontrolle empfohlen. Als wichtigster Parameter der Nachsorge gilt der Tumormarker β -HCG.³⁷

³⁷ Vgl. Schmitt G et al. 1999 und Knörr K et al. 1989

1.2 MMP-TIMP-Systeme

Die Invasion des Trophoblasten durch Destruktion der Extrazellulärmatrix ist ein Prozess, der starken Regulationsmechanismen unterliegt. Bei der Betrachtung der Vorgänge in situ muss die Invasivität des Trophoblasten von der Teilungs- und Differenzierungsaktivität unterschieden werden, da diese Vorgänge voneinander getrennt reguliert werden.

Die Invasivität des Trophoblasten wird durch das Mikromilieu gesteuert. Hieran sind maßgeblich die MMP-TIMP-Systeme beteiligt, bei denen die proteolytischen, proinvasiven MMP in äquimolarer Ratio von ihren antiinvasiv wirkenden Inhibitoren, den TIMP, neutralisiert werden.³⁸

Die sensible Regulation dieses antagonisierenden Systems wird vor allem von parakrinen Mediatoren, insbesondere Zytokinen, bewerkstelligt.

1.2.1 Matrix-Metallo-Proteinasen

Die Matrix-Metalloproteinasen gehören zu der Enzymgruppe der Metalloproteinasen, von denen bisher etwa 30 Unterformen klassifizierbar sind. Die Hälfte dieser Enzyme weist ein bestimmtes Motiv in der Aminosäuresequenz auf (HEXXH), die in der Sekundärstruktur eine helikale Anordnung aufweist. Der Metalligand ist in der Regel Zink.

Die Matrix-Metalloproteinasen sind Enzyme, deren Substrate Proteine der Extrazellulärmatrix sind. Sie führen damit zu einem Untergang derselben und zu einer Zerstörung der Textur, in die die Zellen eingebettet sind. Sie bewirken damit die Dysfunktion des betroffenen Gewebes.³⁹

An den bisher untersuchten Vorgängen während der Trophoblasteninvasion sind mehrere MMP zu unterschiedlichen Zeitpunkten beteiligt.

Auch sollen Serin-Proteasen (Plasminogen-Aktivatoren) eine Rolle spielen, insbesondere, da die Aktivierung der MMP plasminabhängig zu sein scheint.⁴⁰

³⁸ Vgl. Hulboy DL et al. 1997 : 27-45

³⁹ Vgl. Hulboy DL et al. 1997 : 27-45

⁴⁰ Vgl. Harvey MB et al. 1995: 712-8

1.2.2 Tissue-Inhibitors-of-Matrixmetallo-Proteinases (TIMP)

Die Tissue-Inhibitors-of-Matrix-Metalloproteinases, TIMP, sind Polypeptide, von denen bisher etwa vier Unterformen unterschieden werden.

Namensgebend für diese Polypeptide ist deren biologische Funktion, die proteolytische Wirkung der MMP in äquimolarem Verhältnis zu hemmen.

Eine spezifische funktionelle Zuordnung der TIMP-Unterformen zu den Unterformen der MMP im Sinne einer statischen Agonist-Antagonist-Beziehung gelingt nicht. Es ist aber eine biofunktionelle Spezifität anhand der Konzentrationen unterschiedlicher TIMP-Unterformen in Korrelation zu zeitlichen Abläufen physiologischer Prozesse, z.B. im Verlauf der Implantationsphase und der weiteren Schwangerschaft ableitbar.

Da sich während der Vorgänge die Konstellation der MMP ändert, kann anhand von Änderungen in der Ratio der TIMP-Subklassen eine Art Präferenz oder Effizienz eines Inhibitors zu einer oder mehreren MMP-Unterformen vermutet werden.⁴¹

1.2.3 Wechselwirkung im MMP-TIMP-System und deren Regulation durch Zytokine

Die unter 1.3 näher charakterisierten Zytokine stehen im Verdacht, an der Regulation der Trophoblasteninvasion bzw. der Invasivität und Metastasierung des Chorioncarcinoms, sofern man analoge Mechanismen voraussetzt, direkt oder indirekt beteiligt zu sein.

Gut untersucht ist bisher der Einfluss von TGF- β_1 (s. 1.3.5) und IL-1 β (s. 1.3.3), die die zellulären Prozesse antagonistisch beeinflussen.

TGF- β_1 gilt als wichtiger Inhibitor der Trophoblasteninvasion.⁴²

Ein aktivierender Einfluss wird dem IL-1 β zugesprochen.⁴³ Es ist u. a. für die Produktion von MMP-9 mit verantwortlich.⁴⁴

⁴¹ Vgl. Hulboy DL et al. 1997 : 27-45

⁴² Vgl. Karmakar S et al. 2002 : 210-9

⁴³ Vgl. Morgan M et al. 1998 : 18-26 und Karmakar S et al. 2002 : 210-9

⁴⁴ Vgl. Librach CL et al. 1994: 17125-31

1.3 Zytokine

1.3.1 Struktur und allgemeine Funktion der Zytokine

Zytokine sind körpereigene Peptide, die von einer Vielzahl von Zellen, insbesondere von Zellen des spezifischen Immunsystems (vor allem von aktivierten T-Lymphozyten) synthetisiert werden und als humorale Botenstoffe mit lokaler und systemischer Wirkung fungieren. Sie sind damit ein essentieller Bestandteil der Immunantwort.

Aber auch andere Zellarten und Gewebe verwenden das Zytokin als Kommunikationsmittel. Ihnen kommt damit eine ubiquitär vertretene und globale Steuerfunktion zu.

Die Zytokinwirkung in der Zielzelle ist größtenteils rezeptorvermittelt und kann diese in ihrer Funktion und Proliferation beeinflussen. In vielen Fällen lässt sich eine Erhöhung der Wirkung und der Komplexität durch die Aktivierung regelrechter Zytokinkaskaden beobachten.

Bei der enormen Vielzahl dieser Botenstoffe wurde eine Auswahl von fünf Zytokinen getroffen, die entweder bekanntermaßen im engen Kontext mit den physiologischen und / oder tumorphysiologischen Prozessen stehen, oder bei denen die Vermutung eines regulativen Einflusses auf o. g. Abläufe besteht.⁴⁵

In die Auswahl der Zytokine EGF, IFN- γ , IL-1 β , TGF- β_1 , und LIF flossen sowohl Erfahrungswerte aus dem eigenen Labor⁴⁶ als auch Erkenntnisse, die der aktuellen wissenschaftlichen Literatur entnommen wurden, ein.⁴⁷

1.3.2 Epidermal-Growth-Factor

Der Epidermal-Growth-Factor im eigentlichen Sinne ist ein 53 Aminosäuren langes Polypeptid mit drei Disulfidbrücken, die für die biologische Aktivität unabdingbar sind.

EGF gehört zu der großen Gruppe der “EGF-ähnlichen Faktoren”.

Überdies weist EGF in Struktur und biologischer Wirkung eine auffällige Homologie zu TGF- β_1 auf. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass TGF- β_1 der fetale Subtyp des EGF ist.

⁴⁵ Vgl. Harvey MB et al. 1995: 712-8

⁴⁶ Vgl. Özörnek MH et al. 1995 : 590-3

⁴⁷ Vgl. Bischof P 2001: 30-1

EGF kommt in großen Mengen in den meisten Körpersekreten wie Milch, Speichel, Urin oder Blutplasma sowie nahezu ubiquitär in allen Organen, insbesondere in Niere, Gehirn und den Speicheldrüsen vor. Seine Synthese wird durch Testosteron stimuliert, durch Östrogen inhibiert.⁴⁸

EGF und die Gruppe der “EGF-ähnlichen Faktoren” spielen eine große Rolle in den Protein-Protein- sowie den Zell-Protein-Wechselwirkungen, insbesondere die der extrazellulären Matrix.⁴⁹

Allgemein kommt dem EGF eine stark wachstumsfördernde Wirkung auf die meisten Zellen zu. So konnte bereits nach einer achtstündigen EGF Stimulation eine Erhöhung der Mitoserate und der hierfür unerlässlichen Proteinbiosynthese beobachtet werden. Überdies war eine verstärkte zelluläre Substrataufnahme (Glucose, Elektrolyte) und eine Veränderung der trophisch bedingten Zellmorphologie zu verzeichnen.

Zudem ist beschrieben, dass das invasive Wachstum einiger Tumoren durch eine Erhöhung der membranständigen, EGF-spezifischen Rezeptoren EGF-abhängig ist.⁵⁰ Hier sind bereits erste therapeutische Ansätze realisiert. Andere biologische Effekte sind u.a. eine positive Einflussnahme auf die Wundheilung sowie eine Sekretionshemmung von Magensalzsäure.

Chorioncarcinomzellen (s. 1.4) produzieren in Anwesenheit von EGF verstärkt Choriongonadotropin.

Zu den bislang bekannten Auswirkungen auf benigne und maligne Placentazellen zählt die Verstärkung der Ausdifferenzierung des Zytotrophoblasten zu weniger invasiven, synzytialen Gebilden im zweiten Schwangerschaftsdrittel.⁵¹ Der entstandene Synzytiotrophoblast bildet die epitheliale Auskleidung der Placentazotten und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Blut-Placenta-Schranke.

⁴⁸ Vgl. Ibelgauffs H 1992 : 77-80

⁴⁹ Vgl. Nuttall et al. 2000 : 629-36

⁵⁰ Vgl. Hoegy SE et al. 2001 : 3203-14 und Ueda M et al. 1997 : 1027-33

⁵¹ Vgl. Sawicki G et al. 2000 : 1390-5

1.3.3 Interleukin-1 β

Die Interleukine der Gruppe 1 sind Polypeptide mit einer Länge von 150 bis 160 Aminosäuren. Sie kommen in zwei Hauptformen vor, dem IL-1 α und dem IL-1 β .

Beide Subformen binden an den gleichen Rezeptoren und haben daher ähnliche biologische Wirkungen.

Man unterscheidet neben den spezifischen Rezeptoren des ZNS zwei Rezeptorunterformen, Typ I und Typ II, die sich in ihrem Vorkommen unterscheiden. Typ I befindet sich hauptsächlich auf mesenchymalen Zellen, insbesondere auf T-Lymphozyten, Typ II kann hauptsächlich auf B-Lymphozyten und myelomonozytären Zellen identifiziert werden. Beide Subtypen sind transmembranär und wirken über die gleichen second-messenger-Kaskaden (cAMP, G-Proteine). Einiges weist zudem darauf hin, dass IL-1 β auch biologische Aktivität entfalten kann, die nicht rezeptorvermittelt ist.

IL-1 β ist eigentlich ein nahezu ubiquitär vorkommendes Zytokin, das in erster Linie von den Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (MPS) synthetisiert wird, zu denen Monozyten, aktivierte Makrophagen und deren organspezifische Formen, wie Alveolarmakrophagen und Kupffersche Sternzellen gehören. IL-1 β wird aber ebenso von Fibroblasten und Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie zentralnervöser Glia produziert. Letzteres erklärt den relativ hohen Gehalt an IL-1 β im Liquor unter besonderen pathologischen Konstellationen.

IL-1 β ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin mit lokaler und systemischer biologischer Wirkung. Am besten untersucht ist bisher die Stimulanz von T-Helferzellen (T-Lymphozyten) und B-Lymphozyten. Bei den T-Helferzellen kommt es zu einer verstärkten Rezeptordichte für IL-2, über das die biologische Aktivität dieser T-Lymphozyten gefördert wird. Die B-Lymphozyten proliferieren unter IL-1 β -Einfluss und exprimieren vermehrt Immunglobuline, so dass insgesamt von einer verstärkten Immunantwort ausgegangen werden muss.

Überdies wurde eine Erhöhung der Zytotoxizität von Monozyten gegenüber Tumorzellen beobachtet sowie ein direkt antiproliferativer Einfluss des IL-1 β auf einige Tumorzellen. IL-1 β kann daher eine Tumorrogression bewirken oder unterstützen.⁵²

⁵² Vgl. Ibelgaufs H 1992: 134-7

In Bezug auf die uterinen Vorgänge, die Gegenstand dieser Arbeit sind, gibt es bereits einige Erkenntnisse. So berichten einige Autoren von einem fördernden Effekt des IL-1 β auf die MMP-9 Synthese während der Periimplantationsphase.⁵³

1.3.4 Leukaemia Inhibitory Factor

Der Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) ist ein Glykoprotein mit einer Primärstruktur, die 179 Aminosäuren beinhaltet. Er kommt sowohl in freier Form vor, als auch an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) gebunden, wobei diese die biologisch inaktive Form darstellt. LIF wird hauptsächlich von T-Lymphozyten und Fibroblasten synthetisiert. Man hat jedoch nachweisen können, dass auch die meisten Tumorzellen eine erhebliche LIF Synthese betreiben.

Als allgemeine biologische Wirkung wurde bisher eine Stimulierung des hämatopoetischen Systems beschrieben, insbesondere der Megakaryozyten-Thrombozyten-Reihe. Er stellt damit einen wichtigen Agonisten zum CSF (Colony Stimulating Factor) dar.⁵⁴

LIF wird vom frühen Embryo während der Periimplantationsphase (unter dem Einfluss von β -HCG) produziert. Der Faktor scheint für die erfolgreiche Entwicklung der Blastozyste zwingend notwendig zu sein, da er eine wichtige Aufgabe bei der zeitlichen Abfolge der physiologischen Prozesse während der Embryo-invasion und deren Beendigung spielt.

Zu Beginn der Schwangerschaft (Prä- und Periimplantationsphase) wirkt LIF synergistisch zum EGF (s. 1.3.2),⁵⁵ die Synthese von MMP-9 wird im invadierenden Trophoblasten maximal stimuliert. Simultan wird die uPA-Synthese angeregt,⁵⁶ die analog zur TIMP Wirkung zu einer Invasionsabnahme führt.

Nach der Implantation kann man eine erhöhte Produktion von TIMP-3 in der Decidua unter LIF Einfluss beobachten, die ebenfalls zu einem Invasionsstop führt.⁵⁷ Analog hierzu kann zu diesem Zeitpunkt im Trophoblasten eine Abnahme der MMP-9 Synthese nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sprechen für eine zentrale Rolle des LIF bei der Regulation der zeitlichen Abläufe während der Embryoimplantationsphase.⁵⁸

⁵³ Vgl. Librach CL et al. 1994: 17125-31 und Morgan M et al. 1998: 18-26 und Karmakar S et al. 2002: 210-9

⁵⁴ Vgl. Ibelgaufts H 1992: 168-170

⁵⁵ Vgl. Harvey MB et al. 1995: 712-8

⁵⁶ Vgl. Harvey MB et al. 1995: 1005-14

⁵⁷ Vgl. Harvey MB et al. 1995: 712-8

⁵⁸ Vgl. Harvey MB et al. 1995: 1005-14

1.3.5 Transforming-Growth-Factor- β_1

Der Transforming-Growth-Factor- β ist ein thermo- und säurestabiles Protein, das sich in fünf Isoformen β_{1-5} unterscheiden lässt.

Während TGF- β_1 nahezu ubiquitär vorkommt, insbesondere in seiner biologisch inaktiven Form als Proteoglykankomplex in der Extrazellulärmatrix (ECM), sind die Subtypen β_{2-5} spezifischer.

TGF- β_1 wird vor allem in relevanten Mengen aus Thrombozyten sowie aus Knochen und Milzpulpa isoliert. Die Expression wird u.a. durch EGF (s. 1.3.2) und IL-1 β (s. 1.3.3) stimuliert und durch FSH und sich selbst -im Sinne einer Selbstlimitierung- inhibiert. Die biologische Wirkung wird durch zellmembranständige Glykoproteinrezeptoren, von denen bisher drei Unterformen differenziert wurden, vermittelt.

Die Auswirkungen von TGF- β_1 , insbesondere auf die Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM) sind gut untersucht. Hier gilt TGF- β_1 als der stärkste bisher bekannte Wachstums- und Invasionsinhibitor vieler Zellen.

TGF- β_1 wirkt über verschiedene Effekte stabilisierend auf die extrazelluläre Matrix (ECM). Zum einen wird die Synthese der vorherrschenden Matrixproteine wie Kollagene und diverse Proteoglykane induziert, zum anderen wird die Expression von ECM-degradierenden MMP (s. 1.2.1), insbesondere der Gelatinasen-A und -B (MMP-2 und -9) limitiert.

Überdies ist unter Einfluss von TGF- β_1 eine erhöhte Aktivität der TIMP (s. 1.2.2) zu verzeichnen,⁵⁹ welches durch die Inaktivierung der MMP einen zusätzlich protektiven Effekt für die Proteine der ECM darstellt. Besonders diese Wirkung wird durch IL-1 β (s. 1.3.3) antagonisiert.⁶⁰

Als andere biologische Effekte von TGF- β_1 werden u.a. eine verstärkte Angiogenese, ein relativ immunsuppressiver Effekt über eine Proliferationshemmung von Lymphozyten und die Synthesehemmung von Immunglobulinen (IgG und IgM) sowie ein chemotaktischer Effekt auf neutrophile Granulozyten beschrieben.

In Bezug auf Regulationsmechanismen, an denen andere Zytokine beteiligt sind, scheint TGF- β_1 in verstärktem Maße den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in seiner biologischen Wirkung zu antagonisieren.

⁵⁹ Vgl. Karmakar S et al. 2002 : 210-9

⁶⁰ Vgl. Ibelgauf H 1992: 220-3

Im speziellen Kontext mit den physiologischen und pathologischen plazentaren Vorgängen wurde beobachtet, dass TGF- β_1 eine vergleichbare Wirkung auf die MMP-Expression des Zytotrophoblasten und des Chorioncarcinoms hat.

Unterschiede bestehen in der nur bei dem Trophoblasten beobachtbaren, erhöhten TIMP-Produktion sowie dem allgemein antiproliferativen Effekt auf Epithelzellen,⁶¹ der ebenfalls nur bei dem Trophoblasten nachzuweisen ist. Das Malignom zeigt keine derartige Beeinflussung (s. 1.1.3).⁶²

1.3.6 Interferon- γ

Interferon- γ ist ein Dimerprotein (ein Monomer besitzt 146 Aminosäuren), das an zwei Stellen glykosyliert ist.

Man unterscheidet insgesamt sechs strukturelle Subformen, die sich in ihrer biologischen Aktivität, Rezeptorbindung etc. nicht wesentlich unterscheiden.

IFN- γ besitzt in Struktur und Wirkung keine Homologie zu Interferonen- α und - β .

Es wird von aktivierten (T- und B-) Lymphozyten produziert und entfaltet seine biologische Wirkung über transmembranäre Rezeptoren, die über Endozytose des IFN- γ -Rezeptor-Komplexes ins Zellinnere gelangen. Überdies konnten lösliche Rezeptoren im Zytoplasma einiger Zellen isoliert werden.

Die wohl wichtigste systemische, biologische Wirkung ist ein allgemein antimitotischer und antiproliferativer Effekt sowie eine immunmodulatorische Wirkung. Insbesondere bei der Immunmodulation werden z. T. divergente oder gegensätzliche Effekte beschrieben.

IFN- γ wirkt stimulierend auf Makrophagen, weshalb ein Synonym MAF (Macrophag Activating Factor) ist. In diesem Zusammenhang führt es zu einer lokalen Ansammlung von Makrophagen und erhöht deren Zytotoxizität durch eine verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalen. Aus diesem Grund wird dem Zytokin eine antivirale und antiparasitäre Eigenschaft zugeschrieben.⁶³

In Bezug auf die Entwicklung des Embryo ist lediglich bekannt, dass sowohl die nicht befruchtete Oozyte, als auch der frühe Embryo IFN- γ in gleichem Maße synthetisieren.⁶⁴

⁶¹ Vgl. Graham CH et al. 1992 : 867-74 und Graham CH et al. 1994: 93-9

⁶² Vgl. Yodate T et al. 1996 : 191-8

⁶³ Vgl. Ibelgauf H 1992: 126-9

⁶⁴ Vgl. Özörnek MH et al. 1995: 590-3

Die höchsten Konzentrationen wurden am 3. – 4. Tag post conceptionem gemessen, also noch vor der eigentlichen Implantationsphase.⁶⁵ Danach kommt es zu einem deutlichen Rückgang der IFN- γ Synthese.

Die biologische Bedeutung für die uterinen und embryonalen Prozesse sind bislang noch ungeklärt.

⁶⁵ Vgl. Özörnek MH et al. 1997: 435-7

1.4 Chorioncarcinomzelllinien

Es wurden drei Zelllinien des Chorioncarcinoms verwendet, die untenstehend näher charakterisiert werden.

Sowohl in der herangezogenen Literatur, als auch bei der Auswertung der eigenen Versuchsergebnisse zeichnete sich ab, dass das Chorioncarcinom und seine Zellreihen weder morphologisch, noch im zytologischen Habitus oder im biochemischen Reaktionsmuster ein uniformer Tumor ist.⁶⁶

Vielmehr zeigten sich z. T. erhebliche Abweichungen der Zelllinien untereinander, auch in Bezug auf die Reaktionen auf die unterschiedlichen Zytokinstimuli.⁶⁷

Damit erwies sich die Auswahl von mehreren Zelllinien, die vergleichend gegenüber gestellt werden können, als zwingend notwendig, um eine grundsätzliche Aussage über die Tumorphysiologie des Chorioncarcinoms im Allgemeinen machen zu können.

1.4.1 JEG-3

Die humanen Chorioncarcinomzellen wurden von Kohler 1971 isoliert. Vom Ursprungsgewebe ausgehend existieren insgesamt 124 Subkulturen.

JEG-3 produziert humanes Choriongonadotropin (β -HCG), humanes Chorion-Somatomammotropin und Progesteron. Ferner können die Zellen aus steroidal Vorstufen Östron und Östradiol synthetisieren.

Die Tumorzellen haben eine epitheloide Morphologie und wachsen in vitro als Monolayer.

Die Zellen besitzen einen hypertriploiden Chromosomensatz, wobei die mittlere Chromosomenzahl bei 71 liegt (34% von $n = 50$ Zellen). Es können insgesamt 11 Chromosomenanomalien, wie bestimmte Translokationen, Deletionen, Inversionen etc. bei den meisten Zellen beobachtet werden. Neben einer Vielzahl seltener auftretenden Eigenschaften konnte unter insgesamt 50 Zellen ein Y-Chromosom nachgewiesen werden.⁶⁸

⁶⁶ Vgl. Mandl M et al. 2002 : 391-9

⁶⁷ Vgl. Graham CH et al. 1992 : 867-74

⁶⁸ Vgl. ATCC (American Type Culture Collection), 6th edition, 1988

1.4.2 JAR

Die humanen Chorioncarcinomzellen wurden 1971 von R.A. Patillo aus einem Trophoblastentumor der Plazenta einer 24jährigen Patientin kaukasischer Rasse isoliert.

Vom Ursprungsgewebe ausgehend existieren insgesamt 722 Subkulturen.

JAR produziert Östrogen, Progesteron, Gonadotropin und Lactogen.

Die Zellen haben eine epitheloide Morphologie und wachsen in vitro als Monolayer.⁶⁹

1.4.3 BeWo

Die humanen Chorioncarcinomzellen waren die ersten menschlichen, endokrin aktiven Tumorzellen, die in kontinuierliche Zellkultur gebracht werden konnten.

Sie wurden im Juni 1966 von R.A. Patillo und G.O. Gey aus einem Chorioncarcinom der fetalen Plazenta isoliert. Vom Ursprungsgewebe ausgehend existieren insgesamt 191 Subkulturen. Die Zellen besitzen eine epitheloide Morphologie.

BeWo produziert das gesamte Spektrum der Plazentahormone, wie humanes Choriongonadotropin (β -HCG), Lactogen, Östron, Östradiol, Progesteron, andere Gestagene steroidaler Struktur und Polypeptidhormone.

Man kann außerdem eine Differenzierung der BeWo-Stammzellen beobachten, wenn dem Medium Vorstufen steroidaler Hormone zugefügt werden. So lässt sich eine Umwandlung von 35-40 % der Östrogen-Vorstufen in Östrogen und Östradiol beobachten.

Die Zellen betreiben vorwiegend Glykolyse mit einer starken CO₂-Produktion, die zu einem raschen pH-Abfall führt, der sich auf das Zellwachstum negativ auswirkt.

Zudem müssen Glukosemangelzustände vermieden werden, weshalb das Medium nicht weniger als 300-340 mg/dl Glucose enthalten sollte.

Das Nährmedium darf überdies keine antibiotischen Zusätze (z.B. Penicillin und Streptomycin) enthalten, um ein Absterben der Zellen zu vermeiden.

BeWo-Tumorzellen besitzen einen hypertetraploiden Chromosomensatz mit einer mittleren Chromosomenzahl von 86 (22,6% von n = 75 Zellen).

BeWo ist anfällig auf eine virale Infektion mit Poliovirus Typ₃ und mit VSV (Vesikuläre-Stomatitis-Virus). Reverse Transkriptase konnte nicht isoliert werden.⁷⁰

Es konnte nachgewiesen werden, dass BeWo keine Gelatinase-B (MMP-9) produziert.⁷¹

⁶⁹ Vgl. ATCC (American Type Culture Collection), 6th edition, 1988

⁷⁰ Vgl. ATCC (American Type Culture Collection), 6th edition, 1988

⁷¹ Vgl. Morgan M et al. 1998 : 18-26

1.5 In vitro Systeme

1.5.1 Allgemeines

In vitro Systeme eignen sich zur Beobachtung von Prozessen, die für die physiologischen Abläufe in vivo einen mehr oder weniger guten Modellcharakter haben.

Untersuchungen in vitro sind aus vielerlei Gründen beliebt. Zum einen können Versuche unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, wobei die einflussgebenden Parameter selbst bestimmt werden. Unbekannte Einflüsse, wie sie z.B. unter in vivo-Verhältnissen nicht auszuschließen sind, werden dadurch eliminiert. Zum anderen stellen in vitro Versuche die häufig kostengünstigere und weniger aufwändige Nachweismöglichkeit dar.

1.5.2 Aussagekraft und Wertigkeit der in-vitro-Ergebnisse als Modell für in-vivo-Verhältnisse

Die Beurteilung von Erkenntnissen, die aus in vitro Versuchen gewonnen wurden, muss unter Berücksichtigung der Tatsache erfolgen, dass Relevanz und Übertragbarkeit auf in vivo-Verhältnisse nicht zwingend gegeben sind. Vielmehr hängt es von dem untersuchten Material selbst und dem Grad der Imitation der in vivo-Bedingungen durch den Versuchsaufbau ab, ob und in welchem Umfang das in vitro-System ein zuverlässiges Modell für die natürlich ablaufenden Prozesse darstellt.

In Bezug auf nachstehende Untersuchungen mit Chorioncarcinomzellen haben vergleichende Arbeiten gezeigt,⁷² dass sowohl in vitro-Versuche mit Trophoblasten eine hohe Aussagekraft für die natürlichen plazentaren Prozesse aufweisen, als auch Chorioncarcinomzellen in vitro ein gutes Modell für die klinische Tumorerkrankung darstellt.⁷³

So verhielten sich die in Kultur gebrachten Zytotrophoblasten morphologisch, biochemisch und immunhistochemisch äquivalent zu den in vivo beobachteten Zellen.

Auch die untersuchten Chorioncarcinomzellen, insbesondere die Zelllinie BeWo, verhielten sich biochemisch und immunhistochemisch sowie den Invasionshabitus betreffend im Matrigel-Invasionsassay wie der Tumor in vivo.

Somit scheint eine hohe Relevanz der nachfolgenden Ergebnisse unter in vitro Bedingungen für die natürlich ablaufenden Prozesse gewährleistet zu sein.

⁷² Vgl. Garbisa S et al. 1993 : 207-15

⁷³ Vgl. Morgan M et al. 1998 : 18-26

2. Fragestellung

Es existieren z. T. sehr detaillierte Vorstellungen darüber, welche Mechanismen an der Implantation des Embryos in die uterine Schleimhaut beteiligt sind.

Dabei gibt es nicht nur glaubhafte Hinweise für die direkten Prozesse über Proteasen und deren Inhibitoren, sondern auch über deren Steuermechanismen, größtenteils auf parakrinem Weg.

Des weiteren hat sich gezeigt, dass sich eine Vielzahl von Tumoren gleicher oder ähnlicher Mechanismen bedient, was allseits die Frage nach der Kontrolle der Vorgänge im physiologischen Rahmen einer Schwangerschaft versus dem unkontrollierten, metastasierenden Wachstum von Malignomen aufwirft.

Über die speziellen Prozesse beim Chorioncarcinom, der malignen Form des physiologisch invadierenden Trophoblasten, ist hingegen noch wenig bekannt.

Somit ist zu untersuchen, ob die MMP und TIMP sowie eine Auswahl der Steuer- und Kontrollinstanzen, die Zytokine, eine entsprechend zentrale Rolle für die Physiologie des Chorioncarcinoms spielen, wie für den normalen Trophoblasten und viele andere Carcinome angenommen wird.

Überdies wird ein Vergleich zwischen stimulierter und inhibierter Synthese von MMP und TIMP unter Zytokineinfluss in vitro einerseits mit einer zellmorphologischen Untersuchung der Chorioncarcinomzellen unter vorgenannten Bedingungen andererseits angestellt.

3. Materialien

Humane Chorioncarcinom-Zellreihe JEG-3

Humane Chorioncarcinom-Zellreihe JAR

Humane Chorioncarcinom-Zellreihe BeWo

EGF (Epidermal Growth Factor)

IL-1 β (rekombinantes humanes Interleukin-1 β) wurde von der Firma Diaclone Research, Besancon Cedex, Frankreich bezogen

LIF (rekombinanter humaner Leukaemia Inhibitory Factor) wurde von der Firma Diaclone Research, Besancon Cedex, Frankreich bezogen

TGF- β_1 (rekombinanter humaner Transforming Growth Factor- β_1) wurde von der Firma Diaclone Research, Besancon Cedex, Frankreich bezogen

IFN- γ (Interferon- γ) wurde freundlicherweise von der Firma Reuschler, Lauberheim, zur Verfügung gestellt

RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin)

Dulbecco's MEM (Biochrom KG, Berlin)

FCS (Fetales Kälberserum) (Cibco BRL, Deutschland für Life Technologies™, USA)

Natrium-Pyruvat (aus laboreigener Herstellung)

L-Glutamin (aus laboreigener Herstellung)

P / S (aus laboreigener Herstellung)

Nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom KG, Berlin)

EDTA-Trypsin (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria)

Petrischalen

24-Loch Mikrotiterplatten

Mikroobjektträger, Glas

Pasteurpipetten, Glas

Brutschrank mit CO₂-angereicherter Atmosphäre

Reagenzgläser, Kunststoff

Methanol, geeist

Objektträger, Glas

Hämalaun, saures, nach Meyer

Eosin

Azeton, in aufsteigender Konzentrationsreihe

Ethanol, in aufsteigender Konzentrationsreihe

Essigsäure

Natriumhydrogencarbonat

ELISA-Tests der Fa. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

- MMP-2, Human, Assay, Code-Nr.: RPN2617
- MMP-3, Human, Assay, Code-Nr.: RPN2613
- MMP-9, Human, Assay, Code-Nr.: RPN2614
- TIMP-1, Human, Assay, Code-Nr.: RPN2611
- TIMP-2, Human, Assay, Code-Nr.: RPN2618

Photometer mit 450 nm Filter

Mikroskop (Fa. Leitz)

4. Methoden

4.1 Zellkultur

JEG-3 und BeWo wurden mit dem Nährmedium RPMI 1640[®], JAR mit dem Nährmedium Dulbecco's MEM[®] nutritiv versorgt. Beiden Medien wurden pro 500 ml folgende Additive zugesetzt:

50ml FCS (Fetales Kälberserum)

5ml Natrium-Pyruvat

5ml L-Glutamin

5ml P / S

5ml nicht essentielle Aminosäuren

Bei dem Medium für BeWo wurde gemäß der Vorschrift der American Type Culture Collection auf den Zusatz von antibiotischen oder antimykotischen Zusätzen (z.B. P / S) verzichtet.

Alle Zellen wurden mit EDTA-Trypsin von den Böden der Zellkulturbehältnisse gelöst.

4.2 Vorbereitung der Stimulationsversuche

Als Vorbereitung der Stimulationsversuche wurde zunächst jede Vertiefung einer 24-Loch-Mikrotiterplatte mit jeweils 1 ml des entsprechenden Mediums befüllt. Anschließend wurde jede Vertiefung mit einem sterilen Mikroobjektträger aus Glas versehen. Die Stimulationsversuche der Zellreihe BeWo wurden ohne Mikroobjektträger durchgeführt, da sich trotz Zuhilfenahme von Poly-L-Lysin und FCS kein ausreichendes Wachstum auf Glas zeigte.

Anschließend wurden die Zellen von den Böden der Zellkulturbehältnisse mittels EDTA-Trypsin gelöst. Der Überstand mit den aufschwimmenden Zellen wurde in ein Reagenzglas gefüllt und 4 Minuten bei $1500 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellsediment in 4 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Hierfür wurde ebenfalls eine Pasteurpipette verwendet um ein mögliches Zelltrauma durch hohe Ansaugdrücke zu vermeiden.

Daraufhin wurden 50 µl der Suspension entnommen und in 450 µl Medium gegeben, so dass eine 1:10 Verdünnung entstand. Die so verdünnte Zell-Medium-Suspension wurde in eine

Neubauer-Zählkammer gebracht, die Zellen ausgezählt und die Anzahl der Zellen pro Milliliter in der unverdünnten Suspension errechnet.

Anschließend wurden jeweils 500.000 Zellen pro vorbereiteter Platte ($500.000 \text{ Zellen} \div 24 \text{ Löcher} = 20.833 \text{ Zellen/Loch}$) ausgebracht.

Nach 48 Stunden Bebrütung bei 35°C wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen herangewachsen waren.

Die Platten, die dieses Kriterium erfüllten, wurden für die Stimulationsversuche verwendet, die anderen Platten wurden verworfen.

Für die Stimulationsversuche wurde das verbrauchte, substratarme Medium mittels einer Pasteurpipette vorsichtig aus den einzelnen Löchern abgesaugt. Unmittelbar danach wurden die Vertiefungen wieder mit jeweils 1 ml Medium befüllt, das ein Zytokin in entsprechender Konzentration (s. 4.3.3) enthielt, außer den Ansätzen, die als Kontrollgruppe dienten.

4.3 Versuche

4.3.1 Stimulationsversuche

Um den Einfluss unterschiedlicher Zytokine unterschiedlicher Konzentrationen auf die Synthese von Matrixmetalloproteinase-2, -3, -9 und TIMP-1, -2 von Chorioncarcinomzellen sowie mögliche Veränderungen in deren Zellmorphologie untersuchen zu können, wurden alle beschriebenen Zellreihen (s. 1.4) mit Zytokinen (s. 1.3) in gleichen Konzentrationsabstufungen unter standardisierten Bedingungen stimuliert. Zur Beurteilung der MMP- / TIMP-Produktion wurde eine semiquantitative Nachweismethode gewählt (s. 5.2).

4.3.2 Durchführung der Stimulationsversuche

Nach der oben stehend beschriebenen, standardisierten Vorbereitung wurden die auf den 24-Loch-Mikrotiterplatten gleichmäßig verteilten Zellen mit jeweils einem Zytokin einer definierten Konzentration (s. 4.3.3) in getrennten Versuchsansätzen angesetzt und 24 Stunden unter gleichen, standardisierten Bedingungen kultiviert, bevor der Überstand abpipettiert und bei -80°C konserviert wurde. Insgesamt wurden für jede Zellreihe pro Konzentration eines bestimmten Zytokins zwei voneinander getrennte Versuche und Messungen durchgeführt.

Für jeden einzelnen Versuchsansatz wurden insgesamt vier Kontrollen angelegt, die nur Nährmedium (1 ml) enthielten und bei der Auswertung als Kontrollgruppe dienten.

4.3.3 Zytokinkonzentrationen

Die Zellen wurden mit folgenden Zytokinen der unten genannten Konzentrationen jeweils 24 Stunden stimuliert. Zur Vereinfachung der tabellarischen Darstellung wurden die Zytokinkonzentrationen nach untenstehendem Muster von A – E unterteilt.

Zytokin ^{\C}	A	B	C	D	E	
EGF	5	10	20	40	-----	ng/ml
IL-1 β	5	10	20	40	-----	ng/ml
LIF	5	10	20	100	200	ng/ml
TGF- β_1	100	500	1.000	2.000	-----	pg/ml
IFN- γ	0,5	1	5	10	-----	ng/ml

Tab. 1: Konzentrationen der Zytokine

4.4 ELISA und Photometrie

4.4.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine weit verbreitete und beliebte Methode zum relativ selektiven Nachweis verschiedener Substanzen. Er basiert auf der selektiven Bindung von Antikörpern an dem nachzuweisenden Stoff. Die untenstehende Grafik verdeutlicht das Grundprinzip eines ELISA in schematisierter Form.

Einer der polaren Antikörper (AK-1) geht eine Verbindung mit dem vorbereiteten Boden der Mikrotiterplatte ein und bildet damit die solide oder stationäre Phase. Mit dem anderen Ende (Ab-Fragment) bindet er selektiv die zu untersuchende Substanz, in diesem Fall MMP-2, MMP-3, MMP-9 sowie TIMP-1 und TIMP-2 in jeweils getrennten Versuchsansätzen. Ein zweiter, ebenfalls selektiv bindender Antikörper (AK-2) ist mit einem Enzym konjugiert, in dem Fall mit Meerrettich-Peroxidase (MRP). Nach Zugabe eines entsprechenden Substrates dieses Enzyms, hier TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinhydrogenperoxid), kann durch eine Farbreaktion im Rahmen des Substratumsatzes bei standardisierter Reaktionszeit, eine photometrische Quantifizierung erfolgen und der semiquantitative Nachweis der zu untersuchenden Substanz erbracht werden.

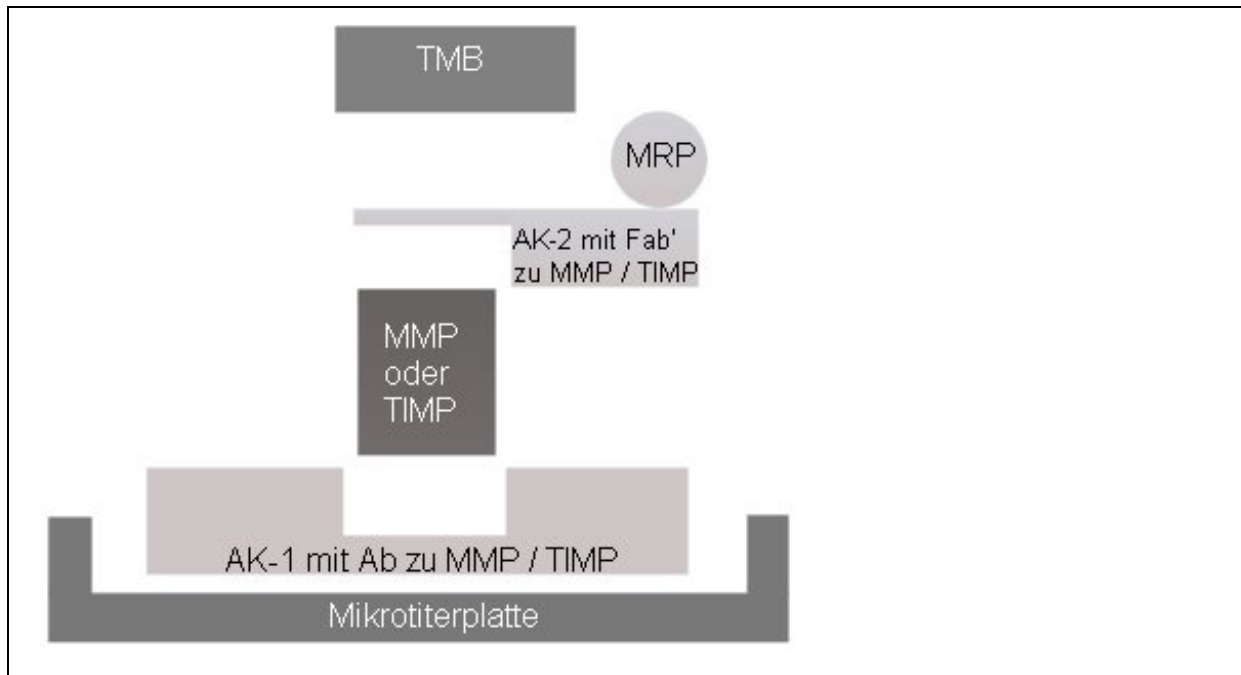


Abb. 4: Schematisierter ELISA-Aufbau

4.4.2 Photometrie

Die Photometrie ist eine früh etablierte und häufig angewandte Methode, gerade in Kombination mit ELISA. Sie beruht auf dem Prinzip, dass eine farbige Substanz, die in einer flüssigen Phase gelöst ist, Licht einer definierten Wellenlänge in seiner Passage durch die Flüssigkeit absorbiert. Hierbei stehen die Transmission, die dem luminanztechnisch messbaren, passierten Licht entspricht und die Extinktion, die dem absorbierten Licht entspricht, zueinander in einer logarithmischen Abhängigkeit ($E = -\log T$). Der Grad der Lichtabsorption lässt unter Zuhilfenahme empirischer Hilfsparameter Rückschlüsse auf die Konzentration der farbigen Substanz zu. Somit gelingt eine indirekte Konzentrationsermittlung der Farbsubstanz.

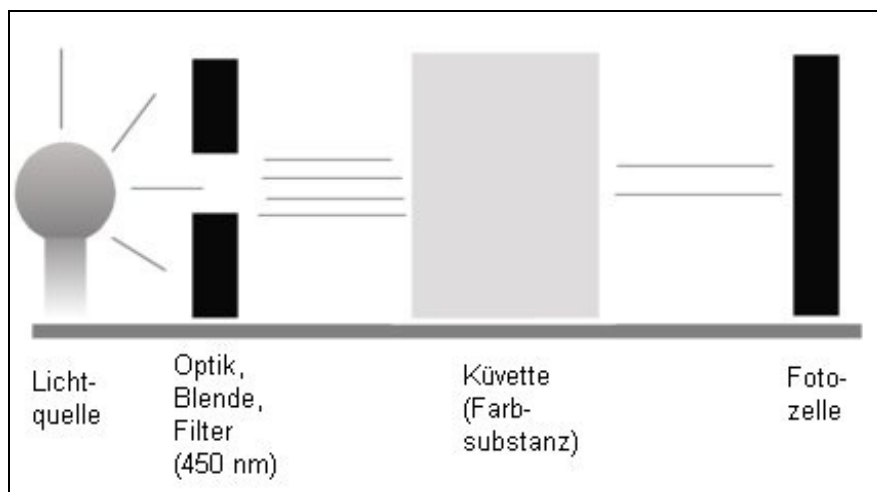


Abb. 5: Schematisierter Aufbau eines Photometers

4.5 Semiquantitativer Nachweis von MMP-2, -3, -9 und TIMP-1, -2

Im konkreten Fall wird gemäß oben stehender, schematisierter Abbildung nicht die Konzentration der zu ermittelnden Substanzen (MMP und TIMP) gemessen, sondern die Konzentration der Farbsubstanz, die aus dem Substratumsatz der Peroxidase über einen definierten Zeitraum entsteht. Diese indirekte Methode erlaubt trotz standardisierter Bedingungen nur eine eingeschränkte Aussage über die tatsächliche Konzentration der MMP und TIMP in den Proben. Es handelt sich vielmehr um einen semiquantitativen Nachweis der zu untersuchenden Enzyme und Inhibitoren, der jedoch eine vergleichende Beurteilung der Messergebnisse zulässt.

4.6 Histologie

4.6.1 Histologische Aufbereitung der Zellen aus den Stimulationsversuchen

Um Unterschiede in der Zellmorphologie sowie des Zellwachstums unter Zytokineinfluss untersuchen zu können, wurde eine histologische Aufbereitung der Zellen aus den Stimulationsversuchen vorgenommen.

Hierzu wurden die gläsernen Mikroobjektträger mit dem Zellrasen aus den Stimulationsversuchen nach dem Abpipettieren des Überstandes mit geeistem Methanol fixiert und gekühlt gelagert.

4.6.2 HE-Färbung, Hämatoxylin (hier: saures Hämalaun) – Eosin - Färbemethode

Zur histologischen Begutachtung wurden die Zellen in typischer Weise einer HE-Färbung unterzogen. Hierzu wurden die Objektträger zunächst ca. 10 sek. in saures Hämalaun getaucht, nach Spülung mit handwarmem Wassers für weitere 10 sek. in Eosin getaucht und nochmals gespült. Hiernach erfolgte die Entwässerung der gefärbten Zellen durch Ethanol in aufsteigender Konzentrationsreihe, sowie die Proteinfällung mittels Azeton, ebenfalls in aufsteigender Konzentrationsreihe.

Nach Lufttrocknung konnten die Mikroobjektträger mittels eines speziellen Kunstharzes auf gläsernen Objektträgern fixiert werden.

4.6.3 Morphologische Kriterien für Stimulation oder Inhibition des Zellwachstums

Als morphologische Unterscheidungskriterien wurden bei der Mikroskopie unter Berücksichtigung der Zellart, des jeweiligen Zytokins und im Vergleich mit den Kontrollgruppen, die nicht unter Zytokineinfluss standen, die Dichte des Zellrasens, sowie dessen Wachstumsmuster im Sinne eines Mono- oder Polylayers beurteilt. Neben allgemeinen Vitalitätskriterien und einer Veränderung der Zellmorphologie im weitesten Sinne, wurde insbesondere die mitotische Aktivität als Parameter für eine Stimulation bzw. Inhibition durch die angebotenen Zytokine herangezogen. Hierzu wurde bei den relevanten Objektträgern jeweils die Anzahl der Mitosen pro zehn Gesichtsfeldern ausgezählt und verglichen. Die Auswertung erfolgte subjektiv und unter vergleichenden Maßstäben von drei Untersuchern.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse von ELISA und Photometrie

5.1.1 Standardkurven

5.1.1.1 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen der MMP-2

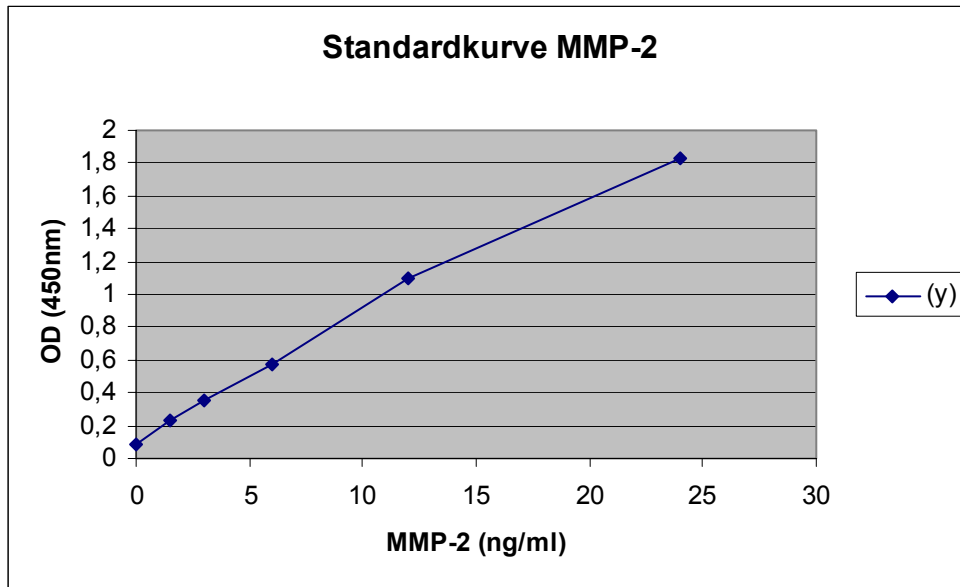


Abb. 6: Standardkurve MMP-2

5.1.1.2 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen der MMP-3

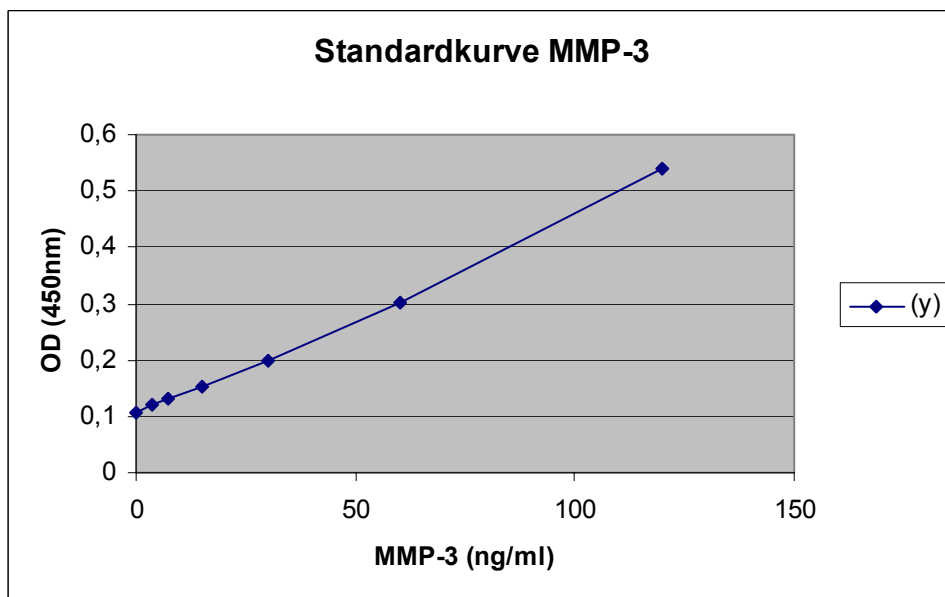


Abb. 7: Standardkurve MMP-3

5.1.1.3 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen der MMP-9

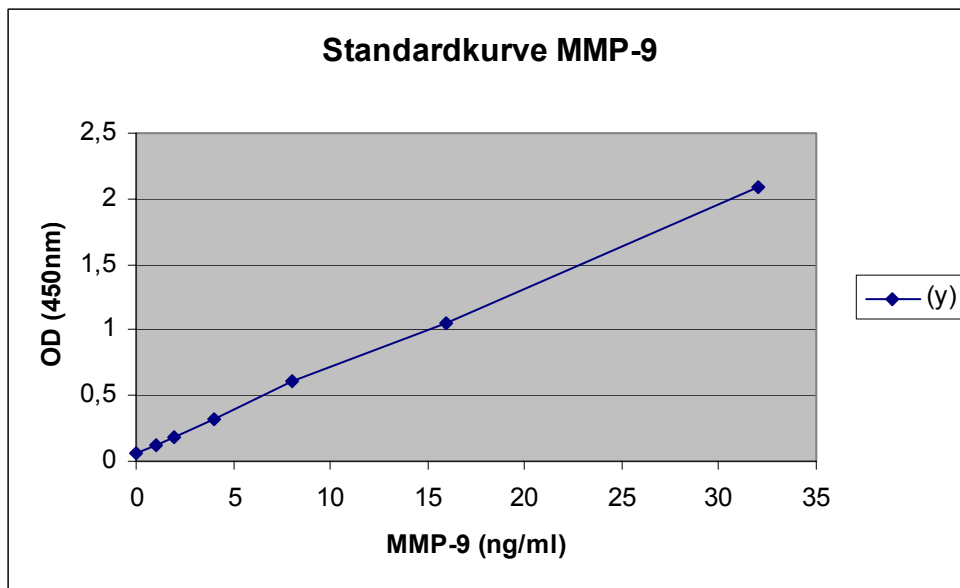


Abb. 8: Standardkurve MMP-9

5.1.1.4 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen des TIMP-1

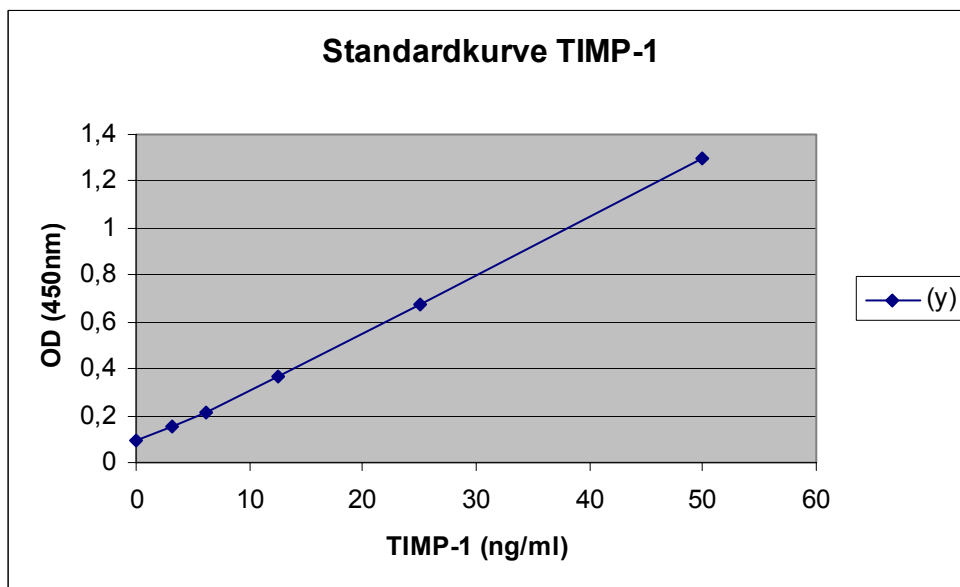


Abb. 9: Standardkurve TIMP-1

5.1.1.5 Standardkurve, nach ermittelten Extinktions-Messwerten (OD) und Standardkonzentrationen des TIMP-2

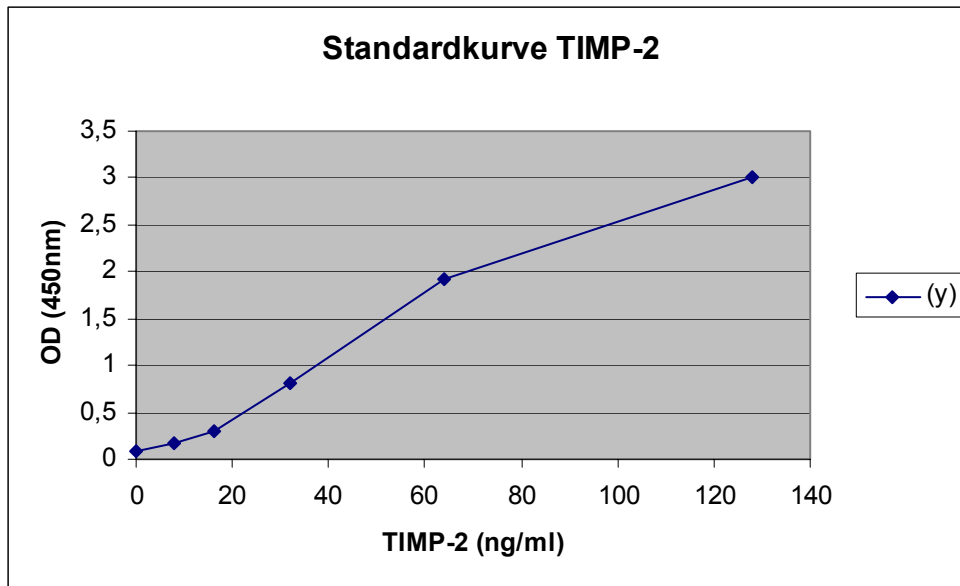


Abb. 10: Standardkurve TIMP-2

5.1.2 Ermittlung der MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 – Konzentrationen anhand der Standardkurven

Die Konzentrationen der zu messenden MMP bzw. TIMP wurden anhand der oben abgebildeten Standardkurven ermittelt. So wurden die photometrischen Extinktionswerte unter Annahme der Tatsache, dass die Kurve zwischen zwei Messwerten in der Standardkurve annähernd linear verläuft, interpoliert und auf der konzentrationsbezeichnenden Achse (x) abgetragen.

Die Darstellung der Ergebnisse erscheint in Gliederung und Auflistung nach Zelllinien getrennt.

OD = Optic Density / Extinktion bei 450 nm. Die Einheit der Konzentrationen ($C_{MMP/TIMP}$) der MMP und TIMP ist ng/ml. Zur Vereinfachung der tabellarischen Darstellung wurden die Zytokinkonzentrationen nach untenstehendem Muster von A – E unterteilt.

Zytokin ^c	A	B	C	D	E	
EGF	5	10	20	40	-----	ng/ml
IL-1 β	5	10	20	40	-----	ng/ml
LIF	5	10	20	100	200	ng/ml
TGF- β_1	100	500	1.000	2.000	-----	pg/ml
IFN- γ	0,5	1	5	10	-----	ng/ml

Tab. 2: Konzentrationen der Zytokine

5.1.2.1 Extinktions-Messwerte (OD) und Konzentrationen von MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 unter Zytokineinfluss der Zellreihe JEG-3

MMP-2:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}
EGF		0,097	0,093	0,098	0,103	0,092	0,041	0,100	0,124	-	-
IL-1 β		0,090	0,020	0,095	0,072	0,093	0,051	0,093	0,051	-	-
LIF		0,095	0,072	0,093	0,051	0,093	0,051	0,096	0,082	0,098	0,103
TGF- β_1		0,091	0,031	0,096	0,082	0,093	0,051	0,095	0,072	-	-
IFN- γ		0,097	0,093	0,093	0,051	0,112	0,248	0,095	0,072	-	-

Tab. 3: Ergebnisse der MMP-2 von JEG-3

MMP-3:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}
EGF		0,105	0	0,108	0,468	0,099	0	0,109	0,703	-	-
IL-1 β		0,111	1,171	0,107	0,234	0,107	0,234	0,106	0	-	-
LIF		0,110	0,937	0,103	0	0,103	0	0,112	1,406	0,110	0,937
TGF- β_1		0,106	0	0,105	0	0,108	0,468	0,106	0	-	-
IFN- γ		0,105	0	0,109	0,703	0,111	1,171	0,116	2,343	-	-

Tab. 4: Ergebnisse der MMP-3 von JEG-3

MMP-9:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}
EGF		0,051	0	0,051	0	0,053	0	0,056	0,031	-	-
IL-1 β		0,055	0,015	0,055	0,015	0,054	0	0,053	0	-	-
LIF		0,056	0,031	0,051	0	0,054	0	0,056	0,031	0,056	0,031
TGF- β_1		0,054	0	0,053	0	0,053	0	0,053	0	-	-
IFN- γ		0,050	0	0,053	0	0,056	0,031	0,055	0,015	-	-

Tab. 5: Ergebnisse der MMP-9 von JEG-3

TIMP-1:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}
EGF		0,098	0,153	0,091	0	0,099	0,205	0,099	0,205	-	-
IL-1 β		0,099	0,205	0,100	0,256	0,099	0,205	0,103	0,410	-	-
LIF		0,103	0,410	0,105	0,513	0,099	0,205	0,103	0,410	0,100	0,256
TGF- β_1		0,099	0,205	0,103	0,410	0,109	0,718	0,103	0,410	-	-
IFN- γ		0,094	0	0,098	0,153	0,104	0,461	0,102	0,359	-	-

Tab. 6: Ergebnisse des TIMP-1 von JEG-3

TIMP-2:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}
EGF		1,415	49,325	1,278	45,421	1,326	46,789	1,596	54,482	-	-
IL-1 β		0,863	33,595	0,827	32,569	0,881	34,108	0,570	24,665	-	-
LIF		0,920	35,219	0,880	34,080	0,966	36,530	1,017	37,984	1,116	40,805
TGF- β_1		0,950	36,074	0,901	34,678	0,696	28,564	0,660	27,450	-	-
IFN- γ		0,176	8,930	0,175	8,868	0,153	7,179	0,194	10,046	-	-

Tab. 7: Ergebnisse des TIMP-2 von JEG-3

5.1.2.2 Extinktions-Messwerte (OD) und Konzentrationen von MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2

unter Zytokineinfluss der Zellreihe JAR

MMP-2:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}
EGF		0,092	0,041	0,095	0,072	0,091	0,031	0,095	0,072	-	-
IL-1 β		0,094	0,062	0,088	0	0,093	0,051	0,089	0,010	-	-
LIF		0,088	0	0,090	0,020	0,094	0,062	0,092	0,041	0,090	0,020
TGF- β_1		0,089	0,010	0,089	0,010	0,087	0	0,096	0,082	-	-
IFN- γ		0,093	0,051	0,090	0,020	0,095	0,072	0,094	0,062	-	-

Tab. 8: Ergebnisse der MMP-2 von JAR

MMP-3:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}
EGF		0,107	0,234	0,106	0	0,102	0	0,107	0,234	-	-
IL-1 β		0,105	0	0,106	0	0,108	0,468	0,108	0,468	-	-
LIF		0,108	0,468	0,109	0,703	0,109	0,703	0,106	0	0,104	0
TGF- β_1		0,104	0	0,113	1,640	0,112	1,406	0,110	0,937	-	-
IFN- γ		0,109	0,703	0,106	0	0,107	0,234	0,104	0	-	-

Tab. 9: Ergebnisse der MMP-3 von JAR

MMP-9:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}
EGF		0,054	0	0,055	0,015	0,054	0	0,052	0	-	-
IL-1 β		0,050	0	0,053	0	0,055	0,015	0,054	0	-	-
LIF		0,053	0	0,054	0	0,051	0	0,052	0	0,050	0
TGF- β_1		0,052	0	0,056	0,031	0,054	0	0,053	0	-	-
IFN- γ		0,054	0	0,053	0	0,053	0	0,050	0	-	-

Tab. 10: Ergebnisse der MMP-9 von JAR

TIMP-1:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}
EGF		0,108	0,667	0,103	0,410	0,107	0,615	0,108	0,667	-	-
IL-1 β		0,096	0,051	0,096	0,051	0,100	0,256	0,102	0,359	-	-
LIF		0,097	0,102	0,100	0,256	0,105	0,513	0,104	0,461	0,091	0
TGF- β_1		0,099	0,205	0,106	0,564	0,100	0,256	0,102	0,359	-	-
IFN- γ		0,105	0,513	0,111	0,820	0,108	0,667	0,096	0,051	-	-

Tab. 11: Ergebnisse des TIMP-1 von JAR

TIMP-2:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}
EGF		2,026	64,002	2,029	64,002	1,960	64,000	1,890	62,860	-	-
IL-1 β		1,189	42,885	0,974	36,758	1,652	56,078	0,948	36,017	-	-
LIF		1,126	41,089	1,065	39,351	1,062	39,266	1,050	38,924	1,134	41,317
TGF- β_1		1,140	41,448	0,945	35,932	0,781	31,195	0,613	25,996	-	-
IFN- γ		0,213	11,224	0,255	13,829	0,219	11,596	0,153	7,179	-	-

Tab. 12: Ergebnisse des TIMP-2 von JAR

5.1.2.3 Extinktions-Messwerte (OD) und Konzentrationen von MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 unter Zytokineinfluss der Zellreihe BeWo

MMP-2:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}	OD	C _{MMP-2}
EGF		0,133	0,465	0,143	0,568	0,153	0,672	0,161	0,755	-	-
IL-1 β		0,132	0,455	0,129	0,424	0,133	0,465	0,148	0,620	-	-
LIF		0,146	0,600	0,159	0,734	0,156	0,703	0,147	0,610	0,145	0,589
TGF- β_1		0,144	0,579	0,146	0,600	0,149	0,631	0,147	0,610	-	-
IFN- γ		0,146	0,600	0,126	0,393	0,116	0,289	0,119	0,320	-	-

Tab. 13: Ergebnisse der MMP-2 von BeWo

MMP-3:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}	OD	C _{MMP-3}
EGF		0,103	0	0,105	0	0,109	0,703	0,113	1,640	-	-
IL-1 β		0,106	0	0,110	0,937	0,110	0,937	0,108	0,468	-	-
LIF		0,103	0	0,116	2,343	0,111	1,171	0,108	0,468	0,114	1,875
TGF- β_1		0,108	0,468	0,109	0,703	0,110	0,937	0,105	0	-	-
IFN- γ		0,113	1,640	0,110	0,937	0,111	1,171	0,107	0,234	-	-

Tab. 14: Ergebnisse der MMP-3 von BeWo

MMP-9:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}	OD	C _{MMP-9}
EGF		0,051	0	0,054	0	0,053	0	0,052	0	-	-
IL-1 β		0,053	0	0,054	0	0,054	0	0,053	0	-	-
LIF		0,049	0	0,055	0,015	0,054	0	0,052	0	0,054	0
TGF- β_1		0,054	0	0,056	0,031	0,054	0	0,056	0,031	-	-
IFN- γ		0,054	0	0,057	0,047	0,057	0,047	0,058	0,063	-	-

Tab. 15: Ergebnisse der MMP-9 von BeWo

TIMP-1:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}	OD	C _{TIMP1}
EGF		0,156	3,130	0,156	3,130	0,160	3,338	0,170	3,858	-	-
IL-1 β		0,138	2,206	0,144	2,514	0,149	2,770	0,137	2,155	-	-
LIF		0,154	3,027	0,153	2,976	0,140	2,309	0,142	2,411	0,153	2,976
TGF- β_1		0,147	2,668	0,151	2,873	0,137	2,155	0,123	1,436	-	-
IFN- γ		0,120	1,282	0,104	0,461	0,118	1,180	0,131	1,847	-	-

Tab. 16: Ergebnisse des TIMP-1 von BeWo

TIMP-2:

Zytokin	C _{Zytokin}	A		B		C		D		E	
		OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}	OD	C _{TIMP2}
EGF		0,183	9,364	0,159	7,794	0,162	8,062	0,143	6,153	-	-
IL-1 β		0,103	2,051	0,128	4,615	0,093	1,025	0,114	3,179	-	-
LIF		0,139	5,743	0,148	6,666	0,149	6,769	0,129	4,717	0,137	5,538
TGF- β_1		0,099	1,641	0,134	5,230	0,137	5,538	0,169	8,496	-	-
IFN- γ		0,157	7,589	0,145	6,358	0,149	6,769	0,154	7,282	-	-

Tab. 17: Ergebnisse des TIMP-2 von BeWo

5.2 Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Zellen aus den Stimulationsversuchen

Signifikante Änderungen bezüglich der Zellmorphologie und des -wachstums, insbesondere jedoch bezüglich der Zellteilungsaktivität –gemessen an den ausgezählten Mitosen- sowohl mit als auch ohne Konzentrationsabhängigkeit, zeigten sich nur bei einigen der durchgeführten Ansätze. So waren sämtliche BeWo Ansätze aus technischen Gründen nicht durchführbar (s. 4.2). Im Folgenden werden die morphologischen Veränderungen nebst Auszählungsergebnissen nach Zelltyp und Zytokin geordnet aufgeführt, wobei die Mitosen jedes einzelnen Ansatzes (Zelltyp z mit Zytokin x in c_y) in jeweils zehn zufällig gewählten Gesichtsfeldern einzeln ausgezählt wurden sowie -zur besseren Vergleichbarkeit- eine Summe der Mitosen / 10 Gesichtsfeldern errechnet wurde.

(Abkürzungen: Mi.: Mitosen, GF: Gesichtsfeld).

5.2.1 EGF-Effekt auf das Zellwachstum von JEG-3 und JAR

JEG-3:

c\Anzahl	Mi/GF1	Mi/GF2	Mi/GF3	Mi/GF4	Mi/GF5	Mi/GF6	Mi/GF7	Mi/GF8	Mi/GF9	Mi/GF10	Mi / 10GF
40ng/ml	12	11	14	11	13	12	12	10	14	14	123
20ng/ml	10	11	9	12	11	11	10	11	9	9	103
10ng/ml	9	9	9	10	8	7	8	8	9	8	85
5ng/ml	9	8	7	7	8	8	6	8	9	9	79
Kontrolle1	6	5	4	6	5	4	5	7	5	7	54
Kontrolle2	5	6	5	4	7	7	5	6	7	6	58
Kontrolle3	5	6	5	6	6	6	5	6	7	6	55

Tab. 18: Mitosenauszählung JEG-3, EGF

JAR:

c\Anzahl	Mi/GF1	Mi/GF2	Mi/GF3	Mi/GF4	Mi/GF5	Mi/GF6	Mi/GF7	Mi/GF8	Mi/GF9	Mi/GF10	Mi / 10GF
40ng/ml	11	10	11	13	13	13	12	11	13	13	120
20ng/ml	11	10	12	10	9	9	10	11	11	9	102
10ng/ml	7	8	10	9	10	8	9	8	8	8	85
5ng/ml	6	7	9	6	8	8	7	7	6	8	68
Kontrolle1	5	4	4	4	6	5	5	6	4	5	48
Kontrolle2	4	5	4	5	5	4	5	4	4	4	44
Kontrolle3	4	5	4	4	4	5	6	4	5	4	45

Tab. 19: Mitosenauszählung JAR, EGF

5.2.2 TGF- β_1 -Effekt auf das Zellwachstum von JEG-3 und JAR:

JEG-3:

c\Anzahl	Mi/GF1	Mi/GF2	Mi/GF3	Mi/GF4	Mi/GF5	Mi/GF6	Mi/GF7	Mi/GF8	Mi/GF9	Mi/GF10	Mi / 10GF
2000pg/ml	10	11	9	10	10	11	9	9	11	11	101
1000pg/ml	6	7	6	7	7	8	7	7	8	8	72
500pg/ml	6	6	7	8	6	7	6	6	7	8	67
100pg/ml	5	6	5	5	6	5	5	6	5	5	53
Kontrolle1	6	5	4	6	5	4	5	7	5	7	54
Kontrolle2	5	6	5	4	7	7	5	6	7	6	58
Kontrolle3	5	6	5	6	6	6	5	6	7	6	55

Tab. 20: Mitosenausählung JEG-3, TGF- β_1

JAR:

c\Anzahl	Mi/GF1	Mi/GF2	Mi/GF3	Mi/GF4	Mi/GF5	Mi/GF6	Mi/GF7	Mi/GF8	Mi/GF9	Mi/GF10	Mi / 10GF
2000pg/ml	11	9	9	9	10	11	9	10	10	11	99
1000pg/ml	8	7	7	6	7	7	6	7	8	7	70
500pg/ml	6	6	7	6	8	7	7	6	6	5	63
100pg/ml	5	4	5	5	6	5	4	4	6	6	50
Kontrolle1	5	4	4	4	6	5	5	6	4	5	48
Kontrolle2	4	5	4	5	5	4	5	4	4	4	44
Kontrolle3	4	5	4	4	4	5	6	4	5	4	45

Tab. 21: Mitosenausählung JAR, TGF- β_1

5.2.3 LIF-Effekt auf das Zellwachstum von JEG-3 und JAR:

Da unter LIF-Stimulus keine signifikanten Veränderungen der Mitoserate beobachtet werden konnte, wurde keine Auszählung vorgenommen, sondern andere zytologische Auffälligkeiten bei einer bestimmten, vorangestellten Zytokinkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe beschrieben.

JEG-3:

200 ng/ml: Zellkerne granulär, keine erhöhte Mitoserate und Gesamtzellzahl im Vergleich zu den Kontrollansätzen eher verringert.

100 ng/ml: Zellkerne granulär, keine erhöhte Mitoserate und Gesamtzellzahl im Vergleich zu den Kontrollansätzen eher verringert.

20 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

10 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

5 ng/ml: Mitoserate im Vergleich zu den Kontrollansätzen leicht erhöht.

JAR:

200 ng/ml: Zellkerne granulär, keine erhöhte Mitoserate und Gesamtzellzahl eher weniger im Vergleich zu den Kontrollansätzen.

100 ng/ml: Zellkerne granulär, keine erhöhte Mitoserate und Gesamtzellzahl eher weniger im Vergleich zu den Kontrollansätzen.

20 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

10 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

5 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

5.2.4 IL-1 β -Effekt auf das Zellwachstum von JEG-3 und JAR:

Da unter IL-1 β -Stimulus keine signifikanten Veränderungen der Mitoserate beobachtet werden konnte, wurde keine Auszählung vorgenommen, sondern andere zytologische Auffälligkeiten bei einer bestimmten, vorangestellten Zytokinkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe beschrieben.

JEG-3:

40 ng/ml: Die Gesamtzelldichte / -anzahl sowie die Mitoserate sind im Vergleich zu den Kontrollen vermindert. Morphologisch sind ballonierte Zellen mit verschobener Kern-Plasma-Ratio zu Gunsten des Zytoplasmas auffällig. Des weiteren ist eine deutliche Abnahme der Chromozentren festzustellen.

20 ng/ml: Die Gesamtzelldichte / -anzahl sowie die Mitoserate sind im Vergleich zu den Kontrollen vermindert. Morphologisch sind ballonierte Zellen mit verschobener Kern-Plasma-Ratio zu Gunsten des Zytoplasmas auffällig. Ferner ist eine deutliche Abnahme der Chromozentren festzustellen.

10 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

5 ng/ml: keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

JAR:

In allen Konzentrationsstufen konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollansätzen ausgemacht werden.

5.2.5 IFN- γ -Effekt auf das Zellwachstum von JEG-3 und JAR:

Aus morphologischer Sicht konnten keine signifikanten Unterschiede in Zellwachstum und -aktivität gegenüber den Ansätzen, die nicht durch ein Zytokin stimuliert wurden (Kontrollen) festgestellt werden.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

5.3.1 Aus ELISA und Photometrie

Im Folgenden werden die signifikanten Ergebnisse der oben aufgeführten Analysen noch einmal herausgestellt. Dieses geschieht aus Gründen der Übersicht für die einzelnen Zelllinien getrennt.

Eine statistische Auswertung der Ergebnisse war aufgrund der Tatsache, dass jeweils nur zwei äquivalente Versuchsansätze durchgeführt wurden, nicht sinnvoll.

Die Ergebnisauswertung ist daher deskriptiv und vergleichend.

5.3.1.1 Für JEG-3

Unter EGF-Stimulation war eine moderate Erhöhung der MMP-2 und eine starke Erhöhung des TIMP-2 zu verzeichnen. Eine Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration konnte nicht festgestellt werden.

IL-1 β hatte einen inhibitorischen Einfluss auf die MMP-3 Produktion und einen insgesamt stimulierenden Effekt auf die Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2.

Unter LIF wurde eine milde Erhöhung der MMP-3 registriert, während die Werte von TIMP-1 und TIMP-2 deutlich erhöht waren. Bezüglich TIMP-2 bestand eine konzentrationsabhängige Stimulierung durch LIF.

TGF- β_1 zeigte lediglich einen konzentrationsabhängigen Rückgang der TIMP-2 Sekretion von einem insgesamt mittleren quantitativen TIMP-Niveau im Vergleich zu den anderen Zytokinen.

IFN- γ bewirkte mit steigender Konzentration eine deutliche Zunahme der MMP-3 Produktion. Ein ebenfalls deutlicher Effekt zeigte sich im quantitativen Gesamtniveau der Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2). Die gemessenen Werte lagen stark unterhalb der Konzentrationsmittelwerte der anderen Zytokine.

Herauszuheben ist u. a. die Beobachtung, dass kein Zytokin einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die MMP-9 Expression von JEG-3 hatte.

5.3.1.2 Für JAR

In den mit EGF stimulierten Ansätzen konnten z. T. erhebliche Erhöhungen der Inhibitorkonzentrationen gemessen werden, wobei TIMP-1 moderat und TIMP-2 stark erhöht waren. Auf die untersuchten Matrixmetalloproteinasen hatte EGF keinen Einfluss.

Eine fast analoge, wenn auch schwächere Wirkung hatte IL-1 β . Auch hier lagen die TIMP-2 Werte auf einem hohen quantitativen Gesamtniveau, während bei TIMP-1 eine Abhängigkeit von der IL-1 β Konzentration zu beobachten war. Auch IL-1 β hatte keinen Effekt auf die Matrixmetalloproteinasen.

Unter LIF kam es zu einer milden Erhöhung der MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2 Werte.

TGF- β_1 führte zu einer Stimulation der MMP-3 Produktion und zu einer Abnahme der TIMP-2 Sekretion. Die Inhibition von TIMP-2 stieg mit erhöhter Zytokinkonzentration.

Die mit IFN- γ stimulierten Ansätze zeigten ein erhöhtes quantitatives Gesamtniveau von TIMP-1 und ein stark erniedrigtes für TIMP-2.

Herauszuheben ist u. a. die Beobachtung, dass kein Zytokin einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die MMP-9 Expression von JAR hatte.

5.3.1.3 Für BeWo

EGF hatte eine durchweg stimulierende Wirkung auf die Produktion von MMP-2, MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2. Dieser Effekt war in Bezug auf MMP-2 und MMP-3 sowie auf TIMP-1 mit steigender EGF Konzentration zunehmend, während die TIMP-2 Produktion mit steigender Zytokinkonzentration von einem vergleichsweise hohen Gesamtniveau tendenziell abnahm.

Die Stimulation mit IL-1 β führte zu einer konzentrationsabhängigen Mehrproduktion von MMP-2. Ebenfalls höhere Werte konnten von TIMP-1 ermittelt werden, während die TIMP-2 Synthese erniedrigt war.

LIF zeigte ein hohes quantitatives Gesamtniveau von MMP-2 und MMP-3 sowie von TIMP-2 ohne eine signifikante Abhängigkeit von der LIF Konzentration.

TGF- β_1 bewirkte relativ hohe Werte von MMP-2 und MMP-3 sowie eine stark von der TGF- β_1 Konzentration abhängige Zunahme der TIMP-2 Produktion.

In den mit IFN- γ stimulierten Ansätzen konnten erhöhte Syntheseraten von MMP-3 und TIMP-2 gemessen werden, während TIMP-1 eher inhibiert wurde.

Herauszuheben ist u. a. die Beobachtung, dass kein Zytokin einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die MMP-9 Expression von BeWo hatte.

5.3.1.4 Übersichtstabelle

Aufgrund der Datenfülle werden nachfolgend sich abzeichnende Tendenzen in den Ergebnissen in Form einer Tabelle wiedergegeben.

	Matrixmetalloproteinasen (MMP)									Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases (TIMP)					
	-2			-3			-9			-1			-2		
	JEG	JAR	BeWo	JEG	JAR	BeWo	JEG	JAR	BeWo	JEG	JAR	BeWo	JEG	JAR	BeWo
EGF	↑	Ø	↑↑	Ø	Ø	↑↑	Ø	Ø	Ø	Ø	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑/↓
IL-1β	Ø	Ø	↑↑	↓	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	↑	↑↑	↑	↑	↑↑	↓
LIF	Ø	Ø	↑	↑	↑	↑	Ø	Ø	Ø	↑	↑	Ø	↑↑	↑	↑
TGF-β ₁	Ø	Ø	↑↑	Ø	↑	↑↑	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	↓	↓↓	↑↑
IFN-γ	Ø	Ø	Ø	↑↑	Ø	↑	Ø	Ø	Ø	↓↓	↑	↓	↓↓	↓↓	↑

Tab. 22: Übersichtstabelle

- ↑: Erhöhte Konzentration gegenüber dem 0-Wert / Medium-Messwert oder dem durchschnittlichen quantitativen Niveau
- ↑↑: Starke Erhöhung der Konzentrationen oder eine Konzentrationsabhängigkeit von dem stimulierenden Zytokin
- ↓: Abnehmende Konzentration gegenüber dem 0-Wert / Medium-Messwert oder dem durchschnittlichen quantitativen Niveau
- ↓↓: Starke Abnahme der Konzentrationen oder eine Konzentrationsabhängigkeit von dem stimulierenden Zytokin
- Ø: Kein Effekt nachweisbar

5.3.2 Aus der histologischen Aufbereitung der untersuchten Zellen JEG-3 und JAR

Bei JEG-3 konnte unter IL-1 β und LIF Stimulation deutliche Effekte in Bezug auf die Kontrollgruppe beobachtet werden. Unter EGF und TGF- β_1 Einfluss wurden sogar konzentrationsabhängige Veränderungen beobachtet.

Auch die Zelllinie JAR zeigte nach EGF und TGF- β_1 Stimulierung signifikante, konzentrationsabhängige, histomorphologische Unterschiede gegenüber den Kontrollansätzen. Ein deutlicher Effekt wurde auch unter LIF Einfluss beobachtet, jedoch konnte anhand des zytologischen Bildes keine Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration abgeleitet werden. Alle anderen Ansätze zeigten keine Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Die Zelllinie BeWo konnte aus o.g. Gründen (s. 4.2) nicht histomorphologisch untersucht werden.

Zusammenfassend konnte unter EGF und TGF- β_1 durchweg ein starker pro-proliferativer Einfluss verzeichnet werden, währendes es unter LIF und IL-1 β eher zu einer Abnahme der Mitoseraten kam. IFN- γ hatte keinerlei Veränderungen an der Zellproliferation oder der Zellmorphologie zur Folge.

6. Diskussion

Die Beurteilung der Ergebnisse in Bezug auf eine Relevanz für die Tumorphysiologie des Chorioncarcinoms fällt in vielen Punkten nicht leicht und bedarf einer differenzierten Betrachtungsweise.

So stellt die offensichtliche Inhomogenität der Chorioncarcinom-Zelllinien bereits im Vorfeld eine erhebliche Hürde in Bezug auf die Aussagekraft der Einzelergebnisse für das Chorioncarcinom im Allgemeinen dar.⁷⁴

Analog zu anderen Studien präsentiert sich auch in dieser Arbeit beim Abgleich der Messwerte ein buntes Bild in Abhängigkeit von der untersuchten Zellreihe unter sonst gleichen Bedingungen.⁷⁵

Häufig zeigte eine Zelllinie eine Inhibition oder Stimulation bezüglich der Synthese einer MMP oder TIMP, während eine andere Zellreihe diese Reaktion nicht oder sogar ein gegensätzliches Verhalten aufwies.

Trotzdem zeichnen sich Gleichheiten, „kleinste gemeinsame Nenner“ oder auch nur Kontinuitäten in den Reaktionsmustern der unterschiedlichen Zelllinien ab.

So reagierten -mit einer Ausnahme- JEG-3 und JAR durchweg gleich- und BeWo hierzu gegensinnig. Abweichungen von dieser Grundtendenz ergaben sich ausschließlich bei einigen Messwerten des TIMP-1 und TIMP-2.

Die Interpretation der Messdaten muss daher unter besonderer Berücksichtigung der Tatsache erfolgen, dass die Zelllinien JEG-3, JAR und BeWo primär kein uniformes, homogenes Bild als Modell für das Chorioncarcinom im Allgemeinen liefern, jedoch die Zellreihen untereinander nativ und auf Zytokinstimuli in einer Art biofunktionell konsistentem Muster reagieren, aus dem sich Schlussfolgerungen ableiten lassen, die bedingt durchaus Allgemeingültigkeiten für das Chorioncarcinom im Allgemeinen beinhalten können.

Diese werden insbesondere unter Zytokinstimulation offensichtlich.

Korreliert man die vermehrte oder verminderte Produktion der Metalloproteinasen und deren Inhibitoren mit den Erkenntnissen aus der histomorphologischen Begutachtung, so ergeben sich für einige Zytokine Konstellationen, die klare Rückschlüsse auf die biologische Funktion und die Tumorphysiologie zulassen.

⁷⁴ Vgl. ATCC (American Type Culture Collection), 6th edition, 1988

⁷⁵ Vgl. Mandl M et al. 2002: 391-9

So kann man nach Stimulation mit IL-1 β und LIF gegenüber einer sehr milden MMP-Produktion (hauptsächlich MMP-3) eine sehr starke Sekretion der Inhibitoren (TIMP-2 > TIMP-1) bei einem gleichzeitig antiproliferativen Einfluss der genannten Zytokine auf das Zellwachstum feststellen.

Durch TGF- β_1 werden die MMP (MMP-3 > MMP-2) stimuliert, die TIMP (-2) hauptsächlich inhibiert bei pro-proliferativem Effekt auf das Zellwachstum.

An dieser Stelle sei bemerkt, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere die Zytokine IL-1 β und TGF- β_1 betreffend, mit den Ausführungen anderer Autoren z. T. nicht decken und denen bisweilen sogar widersprechen (s. 1.3.3 und 1.3.5).⁷⁶ Ein Grund hierfür ist nicht erkennbar.

Unter EGF kam es zu einer gleichförmigen Stimulierung der MMP- und TIMP-Expression bei starkem Anstieg der Zellteilung und des Zellwachstums.

Die mit IFN- γ stimulierten Zellen zeigten eine isolierte Mehrproduktion an MMP-3 bei gleichzeitiger erheblicher Abnahme der TIMP Produktion und histomorphologisch unverändertem Bild gegenüber den nicht mit IFN- γ stimulierten Zellen.

Zusammenfassend muss den Zytokinen IL-1 β und LIF ein größtenteils hemmender Einfluss auf die Chorioncarcinomzellen und deren Invasivität und damit der Metastasierungstendenz unterstellt werden.

TGF- β_1 hat im Gegensatz hierzu eine hauptsächlich fördernde Wirkung auf das Malignom. Auch dem IFN- γ muss ein solcher proinfiltrativer Einfluss zugeschrieben werden, da es durchweg eine Erhöhung der Proteasen bei gleichzeitiger maximaler Suppression der Inhibitoren bewirkt, auch, wenn sich hierfür kein morphologisches Korrelat in der Histologie findet.

EGF ist aufgrund seiner komplexen, uniform stimulierenden Wirkung schwierig zu beurteilen. Es kann aber vermutet werden, dass die malignitätssteigernden Einflüsse überwiegen.⁷⁷

⁷⁶ Vgl. Ibelgauffs H 1992: 220-3 und Librach CL et al. 1994: 17125-31 und Morgan M et al. 1998: 18-26 und Karmakar S et al. 2002: 210-9

⁷⁷ Vgl. Ueda M et al. 2000 : 176-83

Die vorausgegangenen Einschätzungen, insbesondere die direkten Rückschlüsse einer verstärkten oder verminderten Expression von MMP oder TIMP auf das Invasionsverhalten bzw. die Metastasierungstendenz und damit den Malignitätsgrad des Chorioncarcinoms haben nur unter der Annahme Bestand, dass die Tumordinfiltration intakter Gewebe und vaskulärer Strukturen ausschließlich oder hauptsächlich durch die MMP-TIMP-Systeme und deren Regulationsmechanismen, z.B. durch Zytokine, bedingt ist.

Es gibt viele Gründe, diese Grundvoraussetzung anzuzweifeln.

Ein wesentlicher Aspekt, der aus oben stehenden Ergebnissen hervorgeht, ist die auffallende Mindersynthese von MMP-9. Bei allseitiger Überbetonung der MMP-9 (s. 1.1.1.2) für die Bedeutung der Embryoimplantation⁷⁸ und zumindest einer Mitbeteiligung der Invasion vieler Malignome,⁷⁹ fällt auf, dass keine Chorioncarcinom-Zelllinien, weder nativ noch unter Stimulation bekannter Zytokine, eine relevante Synthese der Protease aufwies. Dieses Erkenntnis wird durch andere Studien –zumindest in Bezug auf die Zelllinie BeWo- bestätigt.⁸⁰

Librach et al., Morgan et al. und Karmakar et al.,⁸¹ die sich ebenfalls mit Unterschieden und Gemeinsamkeiten von normalem Trophoblast und Chorioncarcinom beschäftigten, zeigten, dass unter IL-1 β eine absolute Suppression der MMP-9 Produktion beim Malignom bestand, während der normale Trophoblast eine erhöhte Sekretion dieses Enzyms aufwies.

Wenn die Metalloproteinasen tatsächlich einziger oder zentraler Faktor für Invasion und Infiltration wären, entstünde damit ein „maligner Trophoblast“ und ein „benignes Carcinom“ – ein Paradoxon.

⁷⁸ Vgl. Librach CL et al. 1994 : 17125-31

⁷⁹ Vgl. Yudate T et al. 1996: 191-8

⁸⁰ Vgl. Morgan M et al. 1998: 18-26

⁸¹ Vgl. Karmakar S et al. 2002: 210-9 und Librach CL et al. 1994: 17125-31 und Morgan M et al. 1998: 18-26

Ein anderer Aspekt, an oben genannter Grundannahme zu zweifeln, wird bei der Betrachtung der absoluten Zahlen der sezernierten MMP und TIMP nativ und unter sämtlichen Stimulationsversuchen deutlich.

Es fällt auf, dass die Carcinomzellen mehr Inhibitoren als Metalloproteinasen produzieren. Da der Inhibitionsmechanismus in äquimolarer Ratio erfolgt (s. 1.2), kann auch aus den Ergebnissen einer lediglich semiquantitativen Nachweismethode geschlossen werden, dass absolut gesehen mehr antiinvasive Inhibitoren als proinvasive Proteasen synthetisiert werden. Eine Beobachtung, die man bei einem Carcinom, das in seiner klinischen Verlaufsform als hoch aggressiv gilt, nicht vermuten würde.⁸²

Des weiteren fällt auf, dass unter IFN- γ eine offensichtliche Stimulation der MMP Synthese bei gleichzeitiger Inhibition der TIMP Produktion stattfindet. Man würde einen insgesamt proinvasiven Effekt annehmen. Gemeinsam mit dem histomorphologischen Bild, in dem sich die Zellen keineswegs stärker proliferierend zeigen, überrascht, warum ein stark infiltrierender Tumor nicht auch synergistisch ein stärkeres Wachstum zeigen sollte.

Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass dem antagonisierenden System um die Matrixmetalloproteinasen-2, -3, -9 und TIMP-1, -2 mit ihren Regulationsmechanismen u.a. durch die Zytokine EGF, IL-1 β , LIF, TGF- β_1 und IFN- γ zwar berechtigterweise eine Mitbeteiligung an der Tumordinfiltration und dem Metastasierungsmechanismus des Chorioncarcinoms eingeräumt wird, jedoch als alleiniges Erklärungsmodell der speziellen tumorphysiologischen Prozesse des Chorioncarcinoms nicht ausreicht.

Am ehesten ist ein komplexes, multifaktorielles Geschehen anzunehmen, bei dem sowohl die Matrixmetalloproteinasen als auch deren Inhibitoren und die Zytokine als steuernde Botenstoffe eine mehr oder weniger tragende Funktion haben.

⁸² Vgl. Knörr et al. 1989

7. Zusammenfassung

Folgende in vitro-Einflüsse von Zytokinen auf Chorioncarcinomzellen werden zusammengefasst.

Nach vergleichender Aufsummierung der Ergebnisse aus der Messung der Produktion von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und TIMP-1, TIMP-2 sowie der Beurteilung zellmorphologischer Unterschiede unter Einfluss der Zytokine EGF, IL-1 β , LIF, TGF- β_1 und IFN- γ der Chorioncarcinomzelllinien JEG-3, JAR und BeWo können folgende Effekte als sicher angenommen werden.

IL-1 β und LIF haben eine hemmende Wirkung auf die MMP Synthese und die Tumorzellproliferation sowie einen fördernden Effekt auf die TIMP Synthese.

EGF, TGF- β_1 und IFN- γ haben eine stimulierende Wirkung auf die MMP Produktion und z.T. auch auf die Proliferation der Carcinomzellen. Die TIMP Synthese wird durch diese Zytokine größtenteils gehemmt.

Theoretisch leitet sich hieraus ein malignitätssteigernder Einfluss von EGF, TGF- β_1 und IFN- γ sowie ein malignitätssenkender Effekt von IL-1 β und LIF ab.

Welche Relevanz diese in vitro - Auswirkungen auf das Malignomverhalten des Chorioncarcinoms in vivo sowie den klinischen Verlauf des Tumorleidens haben, bleibt weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Abbildungen 1, 2 und 3 mit freundlicher Genehmigung von Prof. Edward C. Klatt, MD, USA

Alvarez Rodriguez C, Hernandez Padilla M, Baiza Gutman LA (1999) *Cytokines and growth factors as autocrine and paracrine modulators in the peri-implantation period. Ginecol. Obstet. Mex. 1999 Feb.; 67:85-93*

Aplin JD (2000) *The cell biological basis of human implantation. Baillieres Best Practical Research, Clin. Obstet. Gynaecology 2000 Oct.; 14(5):757-64*

Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F (2002) *Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulates human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent sysem. Biol. Reproduction 2002 Dec.; 67(6):1952-8*

ATCC (American Type Culture Collection) - *Catalogue of Cell lines and Hybridomas, 6th edition, 1988*

Bass KE, Li H, Hawkes SP, Howard E, Bullen E, Vu TK, McMaster M, Janatpour M, Fisher SJ (1997) *Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion in vitro. Dev. Genet. 1997; 21(1):61-7*

Beier HM (2000) *The dscovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000; 923: 9-24*

Bischof, P (2001) *Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases. Early Pregnancy 2001, Jan.; 5(1): 30-1*

Bischof P, Campana A (2000) *Molecular mediators of implantation. Baillieres Best Pract. Research, Clin. Obstet. Gynaecology 2000 Oct.; 14(5):801-14*

Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H (1995) *Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. Early Pregnancy 1995 Dec.; 1(4):263-9*

Bischof P, Truong K, Campana A (2003) *Regulation of Trophoblastic Gelatinases by Proto-oncogenes. Placenta 2003 Feb.; 24(2-3):155-63*

Cai W, Song JD (2002) *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in ovarian tumors. Ai Zheng 2002 Jan.; 21(1):91-4*

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL (2000) *Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. Endocrinology 2000 Dec.; 141(12):4365-72*

Cross JC, Anson-Cartwright L, Scott IC (2002) *Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. Recent Prog. Horm. Res. 2002; 57:221-34*

Danielsson KG (2000) *The interplay between embryo and endometrium is important for successful implantation. Increased knowledge can result in new contraceptive methods and better treatment of infertility. Lakartidningen 2000 Apr.; 97(14):1660-2, 1665-6*

Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S (2002) *Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. Journal of Reprod. Immunology 2002 Jan.; 53(1-2):257-68*

Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG, Nie G, Lopata A, Salamonsen LA (2002) *Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. Cancer 2002 Mär.1; 94(5):1466-75*

Djonov V, Cresto N, Aebersold DM, Burri PH, Altermatt HJ, Hristic M, Berclaz G, Ziemiecki A, Andres AC (2002) *Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. Int. J. Oncol. 2002 Jul.; 21(1):25-30*

Ertzeit G, Tanbo T, Dale PO, Storeng R, Morkrid L, Abyholm T (2000) *Human chorionic gonadotropin levels in successful implantation after assisted reproduction techniques. Gynecol. Endocrinology* 2000 Aug.; 14(4):258-63

Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, Yang YQ (2002) *Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2 / TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance. World J. Gastroenterology* 2002 Dec.; 8(6):1138-43

Fazleabas AT, Kim JJ, Srinivasan S, Donnelly KM, Brudney A, Jaffe RC (1999) *Implantation in the baboon; endometrial responses. Semin. Reprod. Endocrinology* 1999; 17(3):257-65

Garbisa S, Onsto M, Mazzanti L, Tranquilli AL, Pugnali A, Biagini G, Cester N, Romainini C (1993) *Cultured human trophoblast cells reproduce the initial events of placental biology. Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 1993; 20(4):207-15

Glasser SR, Julian J, Munir ML, Soares MJ (1987) *Biological markers during early pregnancy: trophoblastic signals of the peri-implantation period. Environ. Health Perspective* 1987 Oct.; 74:129-47

Graham, C.H. and Lala, P.K. (1992) Mechanism of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem. Cell Biol.* 1992 Oct-Nov; 70(10-11): 867-74

Graham, C.H., Connelly, I., MacDougall, J.R., Kerbel, R.S., Stetler-Stevenson, W.G., Lala, P.K. (1994) Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor- β . *Exp. Cell Res.* 1994 Sep.; 214(1):93-9

Guo W, Chen G, Zhu C, Wang H (2002) *Expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and its tissue inhibitor-1, -2 in endometrial carcinoma. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002 Oct.; 37(10):604-7

Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zang X, Edwards DR, Schulz GA (1995) *Roles of growth factors during peri-implantation development. Human Reproduction* 1995, March; 10(3): 712-8

Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zang X, Edwards DR, Schulz GA (1995) *Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. Development* 1995, April; 121(4): 1005-14

Hambartsoumian E (1998) *Leukemia inhibitory factor (LIF) production by human decidua and its relationship with pregnancy hormones. Gynecol. Endocrinology* 1998 Feb.; 12(1):17-22

Henson MC, Castracane VD (2002) *Leptin: roles and regulation in primate pregnancy. Semin. Reprod. Medicine* 2002 May; 20(2):113-22

Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG (2001) *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. 2001, Journal of Biol. Chem., 276(5): 3203-14*

Hrabec E, Strek M, Nowak D, Greger J, Suwalski M, Hrabec Z (2002) *Activity of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in primary pulmonary carcinomas: a quantitative analysis. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002 Apr.; 128(4):197-204

Hulboy, D.L., Rudolph, L.A., Matrisian, L.M. (1997) *Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Molecular Human Reproduction* 1997, vol.3, no.1 pp. 27-45

Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P (1998) *Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. Cell Tissue Research* 1998 Jan.; 291(1):133-48

Ibelgaufts H (1992) *Lexikon Zytokine. Medikon Verlag, München, 1992*

Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK (2002) *Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. Trends Endocrinol. Metabolism* 2002 May-Jun.; 13(4):144-50

Karmakar S, Das C (2002) *Regulation of trophoblast invasion by IL-1 beta and TGF- beta 1. Am. J. Reprod. Immunol. 2002 Oct.; 48(4):210-9*

Kawata R, Shimada T, Maruyama S, Hisa Y, Takenaka H, Murakam Y (2002) *Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. Acta Otolaryngology 2002 Jan.; 122(1):101-6*

Klentzeris LD (1997) *The role of endometrium in implantation. Human Reproduction 1997 Nov.; 12(11 Suppl.):170-5*

Knörr K, Knörr-Gärtner H, Beller FK, Lauritzen C (1989) *Geburtshilfe und Gynäkologie – Physiologie und Pathologie der Reproduktion. Lehrbuch, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg / New York / Paris / Tokyo / Hong Kong*

Langmann J (1999) *Medizinische Embryologie – Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Lehrbuch, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*

Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E (2001) *Leukemia inhibitory factor in human reproduction. Fertil Steril 2001 Dec.; 76(6):1091-6*

Li L, Chen S, Xing F (2000) *Expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 protein in the implantation window phase of endometrium. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2000 Sep.; 35(9):544-6*

Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsk Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ (1994) *Interleucin-1 beta regulates cytotrophoblast metalloproteinases activity and invasion I vitro. J. Biol. Chem. 1994 Jun. 24; 269(25):17125-31*

Licht P, Losch A, Dittrich R, Neuwinger J, Siebzehnruhl E, Wildt L (1998) *Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. Human Reproduction Update 1998 Sep-Oct.; 4(5):532-8*

- 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 Reproduction Medicine* 2001; 19(1): 37-47
- Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, Islin H, Hviid T, Rex S, Bangsbo S, Sorensen S (2002) *Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. Fertil Steril* 2002 Aug.; 78(2):221-33
- Liu G, Li J, Li Z (2001) *The effects of MMPs and TIMPs on the metastasis of oral squamous cell carcinoma to neck lymph nodes. Hua Xi Qiang Yi Xue Za Zhi* 2001 Aug.; 19(4):216-8
- Liu CQ, Yuan Y, Wang ZX (2001) *Effects of leukemia inhibitory factor on endometrial receptivity and its hormonal regulations in rabbits. Cell Biology Int.* 2001; 25(10):1029-32
- Merviel P, Evain-Brion D, Challier JC, Salat-Baroux J, Uzan S (2001) *The molecular basis of embryo implantation in humans. Zentralblatt Gynäkologie* 2001 Jun.; 123(6):328-39
- Mandl M, Haas J, Bischof P, Nohammer G, Desoye G (2002) *Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human trimester trophoblast cell models. Histochem. Cell Biol.* 2002 Mai; 117(5):391-9
- Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH (2001) *Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. Histopathology* 2001 Dec.; 39(6):597-602
- Morgan, M., Kniss, D., MacDonnell, S. (1998) *Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. Exp. Cell Res.* 1998 Jul.; 242(1): 18-26
- Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A (1996) *The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. Journal of Clin. Endocrinol. Metabolism* 1996 Feb.; 81 (2):801-6
- Neil, D., Rawlings, Barrett, A. J. (1995) *Evolutionary families of metalloproteinases. Methods in enzymology* 1995, vol.248 pp183-85

Nutall RK, Kennedy TG (2000) *Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor increase the production of matrix metalloproteinases during in vitro decidualisation of rat endometrial stroma cells. Endocrinology 2000, 141(2): 629-36*

Oezoernek MH, Bielfeld P, Krussel JS, Moustafa M, Mikat-Drozdzyński B, Koldovsky U, Kuhn U (1995) *Interferon gamma and interleucine 10 levels in periimplantation embryo culture media. Assist. Reproduction Genet. 1995, October; 12(9): 590-3*

Oezoernek MH, Bielfeld P, Krussel JS, Cupisti S, Jeyendran RS, Koldovsky U (1997) *Interferon-gamma production by the human preimplantation embryo. American Journal of Reproduction Immunology. 1997, June; 37(6): 435-7*

Okamoto T, Niu R, Yamada S, Osawa M (2002) *Reduced expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) – 2 in gestational trophoblastic diseases. Mol. Human Reproduction 2002 Apr.; 8(4):392-8*

Pepe GJ, Albecht ED (1999) *Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. Steroids 1999 Sep.; 64(9):624-7*

Polan ML, Simon C, Frances A, Lee BY, Prichard LE (1995) *Role of embryonic factors in human implantation. Human Reproduction 1995 Dec.; 10 Suppl. 2: 22-9*

Qu J, Thomas K (1998) *Advance in the study of inhibin, activin and follistatin production in pregnant women. European Journal of Obstet., Gynecology, Reproduction Biology 1998 Dec.; 81(2):141-8*

Ren SG, Melmed S, Braunstein GD (1997) *Decidual leukemia inhibitory factor production and action on human chorionic gonadotropin secretion at different stages of gestation in vitro. Early Pregnancy 1997 Jun.; 3(2):102-8*

Rick W (1989) *Klinische Chemie und Mikroskopie. Lehrbuch, 6. Auflage, 1989, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong*

Rose NR, Friedman H, Fahey JL (1986) *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd edition, 1986, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Sawai K, Matsuzaki N, Kameda T, Hashimoto K, Okada T, Shimoya K, Nobunaga T, Taga T, Kishimoto T, Saji F (1995) *Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period*. *Clin. Endocrinol. Metabolism* 1995 Apr.; 80(4):1449-56

Sawicki G, Radomski MW, Winkler-Lowen B, Krzymien A, Guilbert LJ (2000) *Polarized release of matrix metalloproteinase-2 and -9 from cultured human placental syncytiotrophoblasts*. *Biological Reproduction*. 2000, 63(5): 1390-2000

Schmitt G (1999) *Onkologie systematisch – Diagnostik und interdisziplinäre Therapie maligner Tumoren*. Lehrbuch, Uni-Med Verlag AG, Bremen

Schutz A, Schneidenbach D, Aust G, Tannapfel A, Steinert M, Wittekind C (2002) *Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinoma of the lung*. *Tumor Biol*. 2002 Mai-Jun.; 23(3):179-84

Seki H, Zosmer A, Elder MG, Sullivan MH (1997) *The regulation of progesterone and hCG production from placental cells by interleukin-1 beta*. *Biochem. Biophys. Acta* 1997 Aug.; 1336(2):342-8

Senturk LM, Arici A (1998) *Leukemia inhibitory factor in human reproduction*. *American Journal of Reprod. Immunology* 1998 Feb.; 39(2):144-51

Singer CF, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy PJ, Eeckhout Y (1999) *Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts*. *European Journal of Biochem.*, 1999, 259(1-2): 40-5

Simon C, Martin JC, Pellicer A (2000) *Paracrine regulators of implantation*. *Baillieres Best Pract. Research, Clin. Obstet. Gynaecology* 2000 Oct.; 14(5):815-26

Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y (1997) *Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilisation, embryogenesis and implantation. Fertil Steril* 1997 May; 67(5):799-811

Sunder S, Lenton EA (2000) *Endocrinology of the peri-implantation period. Baillieres Best Pract. Research, Clin. Obstet. Gynaecology* 2000 Oct.; 14(5):789-800

Ueda M, Fujii H, Yoshizawa K, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Ueki M (2000) *Effects of EGF and TGF-alpha on invasion and proteinase expression of uterine cervical adenocarcinoma OMC-4 cells. Invasion Metastasis* 2000, 18(4): 176-83

Ueda M, Ueki M, Terai Y, Morimoto A, Fujii H, Yoshizawa K, Yanagihara T (1997) *Simulatory effects of EGF and TGF-alpha on invasive cavity and 5'-desoxy-5-fluorouridine sensitivity in uterine cervical-carcinoma SKG-Iib cells. International Journal of Cancer* 1997, 72(6): 1027-33

Uzumcu M, Coskun S, Jaroudi K, Hollanders JM (1998) *Effects of human chorionic gonadotropin on cytokine production from human endometrial cells in vitro. American Journal Reprod. Immunology* 1998 Aug.; 40(2):83-8

Van der Zee E, Jansen I, Hoeben K, Beertsen W, Everts V (1998) *EGF and IL-1 alpha modulate the release of collagenase, gelatinase and TIMP-1 as well as the release of calcium by rabbit calvarial bone explants. Journal of Periodontal Research*, 1998, 33(1): 65-72

Van der Zee E, Everts V, Beertsen W (1996) *Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation. Journal of Periodontal Research*, 1996, 31(7):483-8

Vegh GL, Selcuk Tuncer Z, Fulop V, Genest DR, Mok SC, Berkowitz RS (1999) *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. Gynecol. Oncol.* 1999 Nov.; 75(2):248-53

Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, Luo S, Zhuang L (2001) *Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. Bio. Reprod. 2001 Jul.; 65(1):240-6*

Yudate, T., Isaka, K., Kosugi, M., Shiraishi, K., Hosaka, M., Takayama, M. (1996) Analysis of the mechanism of trophoblast infiltration. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 1996 Mar.; 48(3): 191-8*

Zhang J, Cao YJ, Zhao YG, Sang QX, Duan EK (2002) *Expression of matrix metalloproeinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproeinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a chorioncarcinoma cell line, JEG-3. Mol. Human Reproduction 2002 Jul.; 8(7):659-66*

Zhang X, Guo Y, Ye Q (1999) *Study of the relation between MMP-2, MMP-9 and nasopharyngeal carcinoma. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 1999 Aug.; 13*

Zhang XQ, Pang ZJ, Chen SL, Xing FQ (2002) *Effect of conditioned media from decidual cell culture on the expression of genes regulating the invasion of trophoblastic cells. Di Yi Jun Yi Da Xue Bao 2002 Jul.; 22(7):588-91*

Zhou CY, Yao JF, Chen XD (2002) *Expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and their inhibitor – TIMP-1, -2- in human squamous cell carcinoma of uterine cervix. Ai Zheng 2002 Jul.; 21(7):735-9*

Zygmunt, M., Hahn, D., Kiesenbauer, N., Munstedt, K., Lang, U. (1998) Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro. *American J. Reprod. Immunol. 1998 Nov.; 40(5): 326-31*

Lebenslauf

Name: Christian Sparenberg

Geburtsdatum: 31. Oktober 1971

Geburtsort: Ratingen

Anschrift: Ringstrasse 33, 42489 Wülfrath

Familienstand: seit 1997 verheiratet mit
Dietke Sparenberg, geb. Jousen,
Kindergarten-Fachwirtin (KA)

Eltern: Günter Sparenberg, Dipl.-Ing.
Ursula Sparenberg, geb. Görtz,
Expedientin

Geschwister: Michael Sparenberg, Dipl. rer. oek.

Schule: 1978 – 1982 Minoriten-Grundschule,
Ratingen
1982 – 1991 Geschwister-Scholl-
Gymnasium, Ratingen
Abitur 1991

Tätigkeit: 1991 – 1993 Pflegehelfer der
geschlossenen, akutpsychiatrischen
Abteilung der Rheinischen Landes-
Kliniken, Düsseldorf

Studium: 1993 – 1999 Studium der Human-
Medizin an der Heinrich-Heine-
Universität, Düsseldorf

Berufstätigkeit: seit dem 1. Dezember 1999
Assistenzarzt der Klinik für Chirurgie,
Schwerpunkte Viszeral- und Gefäß-
Chirurgie (Direktor: Herr Prof. Dr. H.
Zirngibl), Helios Kliniken Wuppertal,
Heusnerstr. 40, 42289 Wuppertal

Zusammenfassung:

Zielsetzung:

Das Chorioncarcinom ist ein ungewöhnlicher Tumor, da es sich von einem Ursprungsgewebe, dem Trophoblasten, ableitet, der in seiner physiologischen, benignen Form zumindest zeitweise Kriterien der Malignität aufzeigt. Diese Prozesse sind selbstverständlich streng örtlich und zeitlich begrenzt und unterliegen genauen Steuerungsmechanismen.

Das Chorioncarcinom ist hingegen, wie jedes Malignom, ungerichtet und ungesteuert infiltrierend und destruierend.

Es ist bekannt, dass Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) eine wichtige Rolle, sowohl bei der Implantation des Embryo, als auch bei der Tumordinfektion und Metastasierung spielen. Ebenso wichtig ist die Steuerungsinstanz dieses Antagonisten-paares auf parakrinem Weg, hauptsächlich über Zytokine.

Die Herausarbeitung der Gemeinsamkeiten und vor allem der entscheidenden Unterschiede zwischen Physiologie und Pathologie war Ziel dieser Arbeit.

Material und Methoden:

Das Chorioncarcinom wurde repräsentiert durch die Zelllinien JEG-3, JAR und BeWo. Die Zellen wurden mit verschiedenen Zytokinen (EGF, IL-1 β , LIF, TGF- β_1 , IFN- γ) unterschiedlicher Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurde in den Überständen mittels ELISA und Photometrie ein semiquantitativer Nachweis von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 sowie von TIMP-1 und TIMP-2 geführt. Zusätzlich wurde eine lichtmikroskopische Auswertung des Zellwachstums durchgeführt, wobei sowohl Veränderungen der Mitoserate als auch zell-morphologische Besonderheiten beschrieben wurden. Beide Untersuchungen, der MMP- / TIMP-Nachweis und die zytologische Begutachtung erfolgten im direkten Vergleich zu Versuchsansätzen, die ohne Zytokinstimulus kultiviert wurden (Kontrollgruppe).

Ergebnisse:

Auffällig war zunächst die Tatsache, dass die Chorioncarcinom-Zelllinien kein einheitliches Reaktionsmuster aufwiesen, sondern z. T. entgegengesetztes Verhalten nativ und auf (gleiche) Zytokinstimuli zeigten. Hierbei zeichnete sich eine weitgehende Übereinstimmung der Zellreihen JEG-3 und JAR ab, bei meist gegensätzlicher Reaktion von BeWo. Trotzdem sind richtungsweisende Tendenzen in den Ergebnissen erkennbar.

So konnte auf TGF- β_1 Stimulation eine erhöhte Expression der MMP (MMP-3 > MMP-2) bei gleichzeitiger Inhibition vor allem des TIMP-2 und pro-proliferativer Wirkung auf die Carcinomzellen beobachtet werden. IFN- γ stimulierte die MMP-3 Sekretion bei erheblicher Suppression der Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 ohne Auswirkungen auf die Zellproliferation. EGF hatte eine allgemein stimulierende Wirkung, sowohl auf die MMP-2 und MMP-3 und auf die Mitoserate als auch auf die Produktion von TIMP-1 und TIMP-2. Unter LIF und IL-1 β wurden mäßige bis keine signifikanten MMP Synthesen beobachtet, bei gleichzeitiger Erhöhung der Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2 und einem insgesamt hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum der Chorioncarcinomzellen.

Auffällig war weiterhin, dass keine Zelllinie weder nativ noch unter Zytokinstimulation MMP-9 produzierte.

Schlussfolgerung:

Theoretisch leitet sich aus den Ergebnissen ein malignitätssteigernder Effekt von TGF- β_1 , IFN- γ und EGF sowie ein malignitätssenkender Einfluss von IL-1 β und LIF ab. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Gründen, an der Annahme zu zweifeln, dass die Tumordinvasion und Metastasierung allein durch Effekte im MMP-TIMP-System und dessen Steuerungsmechanismen über Zytokine erklärt ist. Welche Relevanz und tatsächlichen Auswirkungen die in vitro-Beobachtungen in vivo haben, muss weiter untersucht werden.