Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitäres interdisziplinäres Kinderwunschzentrum (UniKiD) Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Das Zytokin Interleukin-1ß beeinflusst die Interleukin-6 Sekretion von humanen endometrialen Stromazellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Gabriele Hampel Henriques 2018

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

gez.:

Dekan:	Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin:	Prof. Dr. med. Alexandra Bielfeld
Zweitgutachterin:	PrivDoz. Dr. med. Julia Reifenberger

1 Zusammenfassung

Die Blastozyste sendet kurzwirksame Botenstoffe an die rezeptive uterine Schleimhaut. Es handelt sich unter anderem um Zytokine, als eine zentrale Stoffklasse in der Vermittlung der lokalen Immunmodulation. Im Fokus dieser Arbeit standen die Zytokine IL-1ß als embryonales Signal und IL-6 als konsekutives endometriales Produkt. Der Dezidualisierungsprozeß bedeutet eine Modulation der Rezeptivität endometrialer Stromazellen (ES) auf Signale der IL-1 Familie. Diese Versuchsreihe wurde an nicht-dezidualisierten ES untersucht, um zu ermitteln, welche Sensibilität sie dem IL-1ß Stimulus gegenüber, als eines der ersten Sekretionsprodukte der Blastozyste, zeigen und über welche Signalwege dieser Stimulus die IL-6 Expression reguliert. Die nötige Konzentration für eine deutlich gesteigerte IL-6 Expression und Sekretion im Zellkulturmedium lag mit 10 ng/ml wesentlich höher als bei dezidualisierten Zellen. Dies zeigt, dass das nicht-dezidualisierte Endometrium eine geringere Sensibilität auf den IL-1ß Stimulus im Vergleich zum dezidualisierten hat, was ein Schutzmechanismus vor einer Implantation zu einem unerwünschten Zeitpunkt oder in ein nicht adäquat verändertes Endometrium darstellen könnte.

In den Western blot-Analysen wurden des Weiteren Signalmoleküle, welche am Transduktionsweg des IL-1ß Einfluss auf die mögliche IL-6 Expression und Synthese nehmen, untersucht. Eine signifikante Phosphorylierung des JNK konnte nach IL-1ß Kurzzeit-Stimulation in nicht-dezidualisierten ES nachgewiesen werden. Hingegen zeigte ERK nur eine tendenzielle und AKT keine maßgebliche Aktivierung, sodass vermutet werden muss, dass der JNK Weg hier entscheidend ist.

Auch wenn unter *in vitro* Modell Bedingungen nur ein isolierter Bruchteil der mannigfaltigen biochemischen Zellkommunikation zwischen dem mütterlichen und kindlichen Gewebe zu untersuchen ist, zeigte unser Studienaufbau, dass der Differenzierungsgrad der Zelle spezifisch die Antwort auf einen Stimulus wie IL-1ß modifiziert und nicht-dezidualisierte ES nicht in der Lage sind, ad-äquat auf den embryonalen Stimulus hinsichtlich einer regelrechten Implantation zu reagieren.

Abstract

The blastocyst sends short acting substances to the receptive endometrium. They are among others, cytokines, as a central substance class in the mediation of the local immunomodulation. The focus of this work was the cytokine IL-1ß as an early embryonic signal and IL-6 as a consecutive endometrial product. The decidualization process is a modulation of the receptivity of endometrial stromal cells (ES) to signals from the IL-1 family. These series of experiments has been investigated in non-decidual ES to determine the sensitivity to the IL-ß stimulus, one of the first secretion products of the blastocyst, and the signaling pathways that regulate IL-6 expression. The concentration required for a significantly increased IL-6 expression and secretion in to the cell culture medium was significantly higher with 10 ng/ml compared to decidualized cells. This shows that the non-decidualized endometrium has a lower sensitivity to the IL-1ß stimulus compared to the decidualized, which could represent a protective mechanism for implantation at an undesirable time or into a not adequately altered endometrium.

Furthermore, in the Western blot-analysis, signaling molecules influencing the possible IL-6 expression and synthesis on the transduction pathway of IL-1ß were investigated. A significant phosphorylation of JNK could be detected after IL-1ß short-terme stimulation in non-decidual ES. On the other hand, ERK showed only a tendencial and AKT no activation at all, so it must be assumed that the JNK path is crucial here.

Even if under *in vitro* model conditions only an isolated fraction of the diverse biochemical cell communication between the maternal and the child's tissue is investigated, our data show that the differentiation degree of the cell specifically modifies the response to a stimulus such as IL-1ß and non-decidualized ES are not able to answer sufficiently to this embryo signal.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
3	EINLEITUNG	10
3.1	Sterilität – Inzidenz und Ursachen	10
3.2	Der Menstruationszyklus	11
3.3	Das Endometrium – ein adaptives Gewebe	12
3.3.1	Dezidualisierung	13
3.4	Präimplantationsphase und Implantation	13
3.5	Der immunologische Implantationsdialog	15
3.5.1	Zytokine	15
3.5.2	Interleukin-1 System und embryonale Implantation	17
3.5.3	IL-6 im Implantationsdialog	19
3.5.4	Interleukin-1 induzierte Signalwege	20
3.5.4.1	MAP-Kinase-Weg	22
3.5.4.2	PI3-K/AKT Signalweg	23
3.6	Zielsetzung	24
4	MATERIAL UND METHODEN	25
4.1	Materialien	25
4.1.1	Geräte	25
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
4.1.3	Zelllinie	26
4.1.4	Kits	26
4.1.5	Primer	26
4.1.6	Zytokine und Inhibitoren	26
4.1.7	Reagenzien und Chemikalien	27
4.1.8	Puffer und Medien	28
4.1.9	Computerprogramme	29
4.1.10		
	Datenbank	
4.2	Datenbank Methoden	30 30

4.2.2	Molekularbiologische Methoden	32
4.2.2.1	RNA Isolation	32
4.2.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	33
4.2.2.3	DNAse-Verdau	33
4.2.2.4	Reverse Transkription	33
4.2.2.5	PCR	34
4.2.3	Proteinbiochemische Verfahren	36
4.2.3.1	Isolation	36
4.2.3.2	ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay von IL-6	36
4.2.3.3	Western Blot-Analyse von ß-Aktin, JNK, AKT, ERK	37
5	ERGEBNISSE	38
5.1	Versuchsmodell der humanen endometrialen Stromazellen	38
5.2	Versuchsaufbau	39
5.2.1	Expression und Sekretion von IL-6: Konzentrations- und Inkubationso optima von IL-1ß	dauer- 39
5.2.2	Inhibition der IL-1ß vermittelten Expression von IL-6 durch IL-1ra	39
5.2.3	Signalproteine des IL-1ß induzierten Signalweges	39
5.3	IL-1ß induzierte IL-6-mRNA Expression und IL-6 Sekretion	40
5.3.1	PCR – IL-6-mRNA Expression nach IL-1ß Inkubation	40
5.3.2	ELISA - IL-6 Protein im Zellüberstand nach IL-1ß Inkubation	40
5.4	Signalkaskaden von IL-1ß modulieren die IL-6 Expression in nicht-de lisierten ES	zidua- 41
5.4.1	IL-1ß induzierte Signalvermittlung und Inhibition in nicht-dezidualisier	ten ES 41
5.4.1.1	IL-6-mRNA Expression nach Inhibition des IL-1-Rezeptors	41
5.4.2	Western blot-Analyse der phosphorylierten Proteine des MAP-Kinase) -
	Signalweges in nicht-dezidualisierten ES	42
6	DISKUSSION	46
6.1	IL-1ß induzierte IL-6-mRNA Expression und IL-6 Sekretion in nicht de	ezidua-
	lisierten ES	48
6.1.1	IL-6-mRNA Expression nach IL-1ß Inkubation	50
6.1.2	IL-6 Protein im Zellkulturüberstand nach IL-1ß Inkubation	51
6.2	Signalwege des IL-1ß in nicht-dezidualisierten Stromazellen	53

6.2.1	IL-1ß induzierte Signalvermittlung und Inhibition in nicht-dezidualisierten	ES
		. 54
6.2.1.1	IL-6-mRNA Expression nach Inhibition des IL-1-Rezeptors	.54
6.2.2	Western blot-Analyse der phosphorylierten Proteine des MAP-Kinasen-	
	Signalweges in nicht-dezidualisierten ES	.55
6.3	Limitation des <i>in vitro</i> Modells	.57
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	.59
8	TABELLENVERZEICHNIS	.60
9	LITERATURVERZEICHNIS	.61
10	DANKSAGUNG	.74

2 Abkürzungsverzeichnis

Α	
Abb.	Abbildung
AKT	aktivierte Proteinkinase-B
AP-1	Aktivatorprotein 1
AS	Aminosäuren
В	
bp / kb	Basenpaare / Kilobasenpaare
С	
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
c-JUN	c-Jun N-terminale Kinase
D	
Da	Dalton
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonate
dH₂O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
E	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzymgekoppelter Immunad- sorptionstest)
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
ES	endometriale Stromazellen
et al.	<i>et alii</i> (und andere)

F	
FBS	fetales Rinderserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
н	
hu	<i>human</i> (menschlich)
HVL	Hypophysenvorderlappen
I	
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGFBP-1	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1
IL-1α, -ß, -ra, -RAcp	Interleukin-1 alpha, -1 beta, Rezeptorantagonist, <i>receptor accessory protein</i> (Akzessorisches Rezeptorprotein)
IL-1 RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1 RII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IVF	In vitro-Fertilisation
J	
JNK	c-jun N-terminale Kinase
JAK	Janus Kinase
к	

KCI	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	
LH	Luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
Μ	
MAP-K	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCDB105	MCDB105-Zellkulturmedium
MEK1	Meiosespezifische Serin-/Threonin-Proteinkinase
MGSA-α	Melanoma Growth Stimulating Activity alpha
mRNA	Messanger Ribonucleid Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
Ν	
NaCl	
Naci	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat
Na₂HPO₄ NAP-3	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Neutrophile-Activating Protein 3
Na₂HPO₄ NAP-3 NEAS	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren
Na₂HPO₄ NAP-3 NEAS NF-ĸB	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B
Na₂HPO₄ NAP-3 NEAS NF-ĸB P	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B
Na ₂ HPO ₄ NAP-3 NEAS NF-ĸB P P ₄	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B Progesteron
Na ₂ HPO ₄ NAP-3 NEAS NF-ĸB P P ₄ PI3-K	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B Progesteron Phosphoinositid-3-Kinase
Na ₂ HPO ₄ NAP-3 NEAS NF-κB P P ₄ PI3-K PBS	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B Progesteron Phosphoinositid-3-Kinase Phosphatgepufferte Salzlösung
Na2HPO4 NAP-3 NEAS NF-кВ P Р4 PI3-К PBS PCR	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B Progesteron Phosphoinositid-3-Kinase Phosphatgepufferte Salzlösung <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Na ₂ HPO ₄ NAP-3 NEAS NF-κB P P4 PI3-K PBS PCR PDGF	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat <i>Neutrophile-Activating Protein 3</i> Nicht-essentielle Aminosäuren Nuklearfaktor Kappa-B Progesteron Phosphoinositid-3-Kinase Phosphatgepufferte Salzlösung <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) <i>Platelet-derived Growth Factor</i>

Ras	Rat sarcoma protein	
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma protein	
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)	
RNAse	Ribonuklease	
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)	
RT	Reverse Transkriptase	
S		
SDS	Sodiumdodecylsulfat	
SH-2 Domäne	Src-homology-2 Domäne	
SOCS-Proteine	Suppressor of Cytokine Signalling-Proteine	
SOS	Son Of Sevenless Protein	
STAT 3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3	
т		
Tab.	Tabelle	
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer	
TE	Tris-EDTA-Puffer	
TNF	Tumornekrosefaktor	
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	
U		
U	Einheit für Enzymaktivität	
v		
v/v	Volumen pro Volumen	
w		
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)	

3 Einleitung

3.1 Sterilität – Inzidenz und Ursachen

Der Beginn neuen menschlichen Lebens wird als selbstverständlicher physiologischer Vorgang der Reproduktion betrachtet. Der erhoffte Kinderwunsch wird sich jedoch nicht für alle Paare mit dieser Selbstverständlichkeit erfüllen. Nach der WHO-Definition spricht man von einer Sterilität bzw. Infertilität, wenn bei einem Paar trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr über einen Zeitraum von 12 Monaten eine Schwangerschaft ausbleibt. Nach einer Umfrage des Instituts für Demoskopie Allensbach hätten 1,4 Millionen Menschen in Deutschland im Alter zwischen 25 und 59 Jahren gerne Nachwuchs (gehabt), sind aber auch nach einem Jahr mit einem entsprechenden Partner ungewollt kinderlos geblieben (Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2007).

In die Abklärung der ungewollten Kinderlosigkeit sind beide Partner miteinzubeziehen. Pathologien und Grunderkrankungen sind abzuklären. Es folgen die Untersuchung des Spermiogramms und der Funktion der hormonellen Regulationskreisläufe auf weiblicher und männlicher Seite. Sind die Ursachen nicht konservativ oder operativ zu behandeln oder bleiben ungeklärt, kann die moderne Reproduktionsmedizin mittels verschiedener Methoden der assistierten Reproduktion helfen. Über 230.000 Kinder sind allein in Deutschland mit den Mitteln der Reproduktionsmedizin entstanden, über fünf Millionen sind es weltweit (DIR; 2015). Mit zunehmendem Alter der Frau steigt die Wahrscheinlichkeit einer Fehlgeburt, während sich die Eizellreserve und -qualität stark verringert. Bereits ab dem 36. Lebensjahr nimmt die Erfolgswahrscheinlichkeit selbst bei künstlicher Befruchtung deutlich ab, die kumulative Geburtenrate liegt nach 6 Therapiezyklen bei 72%. Bei Frauen unter 35 Jahren betrug die kumulative Wahrscheinlichkeit auf eine Lebendgeburt nach 6 Zyklen 86% (DIR 2015). Das Durchschnittsalter der Frauen, die in Deutschland eine extrakorporale Befruchtung durchführen ließen lag bei 35,2 Jahren, das der Männer bei 38,6. 2015 war weltweit mehr als die Hälfte aller behandelten Frauen 35 Jahre und älter, wo hingegen 1996 nur jede dritte Frau älter als 35 Jahre war (DIR 2015).

Auch nach einer künstlichen Befruchtung ist das Fortschreiten der Schwangerschaft nicht gesichert. Trotz steigender Erfolge in der medizinischen Technologie ist die Inzidenz der Aborte hoch (Haouzi *et al.*, 2009). Die Fehlgeburtenrate steigt altersabhängig an, bei Frauen unter 35 Jahren liegt sie bei 17%, nach dem 40. Lebensjahr ist sie bereits doppelt so hoch (DIR 2015). Bleibt trotz einer erfolgreichen *in vitro* Fertilisation (IVF) oder intrazy-toplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) die Weiterentwicklung der Schwangerschaft aus und sind beeinflussende Störfaktoren in der Präimplantationsphase abgeklärt, so ist ätio-

logisch ein Implantationsversagen zu diskutieren. Dieses kann aus einer Dysregulation mit nachfolgender unzureichender Rezeptivität des Endometriums resultieren (Salamonsen *et al.*, 2002). Störungen der Implantation liegen in bis zu 75% der klinisch nicht erkannten Frühaborte vor (Norwitz *et al.*, 2001).

Die Qualität der Kommunikationsfähigkeit zwischen mütterlichem Gewebe und Embryo ist für den Erfolg der Implantation maßgebend. Die Komplexität dieser Schnittstelle des Zellkontaktes ist der Fokus vieler Arbeitsgruppen. Es gibt Hinweise, dass das Endometrium den Prozess der Implantation nicht nur passiv, sondern von Beginn an durch zelluläre Reaktionen aktiv beeinflusst (Heneweer et al., 2005). Der Embryo entspricht genetisch dem mütterlichen und väterlichen Erbgut. Somit ist er für das mütterliche Endometrium, beziehungsweise dessen Immunsystem, ein Semi-Allogen. Um nicht als Fremdgewebe abgestoßen zu werden, bedarf es von Anfang an Signalen, die dieses verhindern und die Schwangerschaft erhalten und fortsetzen können. Das Phänomen der immunologischen Toleranz wurde zuerst von Medawar als das Paradoxon der Schwangerschaft beschrieben (Medawar, 1953). Durch Wegmann et al. wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Schwangerschaft ein durch Th2-Zytokine geprägtes Phänomen ist und eine pathologische Veränderung des Zytokinprofils über eine inflammatorische Immunreaktion zum Abort führen kann (Wegmann et al., 1993). Die immunologische Kommunikation und Kompetenz ist also ein entscheidendes Kriterium bei der Implantation. Sie findet auf autokrinem und parakrinem Niveau im Bereich des mütterlichen und embryonalen Zellkontaktes statt. Endometriale Stromazellen (ES), Immunzellen, vaskuläre Endothelzellen und später auch Myometriumzellen werden in Kontakt mit dem Embryo stehen (Popovici et al., 2003).

3.2 Der Menstruationszyklus

Mit dem Eintritt der Geschlechtsreife unterliegt der Regelkreis der weiblichen Sexualhormone einem zyklischen Ablauf, welcher der Vorbereitung einer möglichen Schwangerschaft dient. Die Zyklusdauer beträgt bei interindividuellen Unterschieden im Mittel 28 Tage und ist in drei Phasen einzuteilen: Desquamations-, Proliferations- und Follikelphase (1.-12.Tag), Ovulationsphase (13.-15. Tag) und Luteal- und Sekretionsphase (16.-28. Tag).

Das Endometrium gliedert sich in ein Stratum functionale, welches den Zyklusveränderungen unterliegt und in der Desquamationsphase abgestoßen wird, sowie einem Stratum basale, von dem die Schleimhautregeneration zyklisch ausgeht (Schiebler 1999). Mit dem 1. Tag der Menstruationsblutung beginnt die Abstoßung des Stratum functionale (*Desquamation*). Unter dem Einfluss des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) werden zu Beginn jedes Zyklus bis zu 400 Primordialfollikel in einem Eierstock rekrutiert. Ein Primordialfollikel entwickelt sich weiter zum Graaf'schen-Follikel. Unter FSH schreitet die Eireife voran (Follikelphase) und in den Granulosazellen wird Östrogen für den weiteren Aufbau der Gebärmutterschleimhaut (Proliferationsphase) gebildet. Die steigende Östrogenkonzentration im Blut verhindert dann über die Unterdrückung der FSH-Sekretion das Heranreifen weiterer Follikel (negatives Feedback), zum anderen fördert sie den LH-Anstieg kurz vor der Ovulation (positives Feedback). Die übrigen Primordialfollikel gehen in diesem Zyklus in die Atresie.

Es folgt mit der Ovulation die fruchtbare Phase, welche die Mitte des weiblichen Zyklus und den Wechsel zwischen der Follikel- und Gelbkörperphase bezeichnet. Unter dem Anstieg von Progesteron (P₄) kommt es zum Eisprung und eine Eizelle, die viele Jahre im Dictyotänstadium ruhte, wird nun die erste Reifeteilung beenden und aus dem *Ovar* über die Peritonealhöhle vom Fimbrientrichter der ipsilateralen Tube aufgenommen um im Verlauf das *Cavum uteri* zu erreichen (Abb. 1). Im verbliebenen Gelbkörper wird durch dessen wichtigstes Produkt, das P₄, das Endometrium aus der östrogenabhängigen Proliferationsphase in die Sekretionsphase überführt (Dezidualisierung der ES). Diese empfangsbereite Phase des Endometriums dauert ca. 4 Tage (20.-23.Tag), 6-7 Tage nach dem LH-Peak erreicht die P₄-Sekretion ihren Höhepunkt, diese Phase wird Implantationsfenster genannt (Harper, 1992; Jabbour *et al.*, 2006). Das Endometrium ist jetzt auf die Implantation eines Embryos vorbereitet.

Erfolgt keine Schwangerschaft geht der Gelbkörper zugrunde und verbleibt als narbiger Weißkörper (*Corpus albicans*), die Progesteronproduktion versiegt. Die Schleimhaut wird unter dem Hormonentzug abgestoßen (*Desquamation*) und ein neuer Zyklus beginnt.

3.3 Das Endometrium – ein adaptives Gewebe

Das Endometrium ist die innerste Schleimhautschicht der Gebärmutter. Es ist am Beginn und Erhalt der Schwangerschaft maßgeblich beteiligt. Sowohl an der luminalen Zelloberfläche, als auch innerhalb des Zellverbandes erfolgt die Interaktion mit dem Embryo und der Plazenta.

Auf das aus Epithel und ES bestehende Endometrium folgt das Myometrium als muskulärer Teil und breiteste Schicht des Organs, und dann das Perimetrium als Fixier- und Verschiebegewebe (Schiebler, 1999). Das Endometrium besteht aus einem einschichtigem hochprismatischem Oberflächenepithel, tubulären Drüsen (*Glandulae uterinae*) und einem als Stroma uteri bezeichnetem Bindegewebe mit progesteronempfindlichen interstitiellen Zellen, die ES.

3.3.1 Dezidualisierung

Die Dezidualisierung ist der Differenzierungsprozess, in der sich das Endometrium morphologisch und funktional auf die Nidation des Embryos in der mittleren bis späten Sekretionsphase vorbereitet. Im Gegensatz zu vielen anderen Spezies ist im menschlichen Gewebe dieser Prozess unabhängig von der Anwesenheit eines Embryos (Brenner *et al.*, 1988). Unter dem Einfluss von P₄ erfolgt die Umwandlung der ES in die rezeptive, versorgende Dezidua. Neben der veränderten Morphologie in eine charakteristische epitheloide Form und der Einlagerung von Glykogen und Lipiden produzieren und sezernieren die dezidualisierten ES verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen (Salamonsen *et al.*, 2003). Die Notwendigkeit der Dezidualisierung besteht im Erwerb besonderer Zellfunktionen im Rahmen der regulierten Trophoblasteninvasion, wie zum Beispiel einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Stress und Schutz des kindlichen Gewebes gegenüber der mütterlichen Immunantwort. Nach erfolgreicher Implantation wird der Dezidualisierungsprozess abgeschlossen. Die Dezidualisierung findet bei allen Spezies statt, bei denen im Rahmen der Implantation das luminale Epithel durch den Embryo durchdrungen wird (Gellersen *et al.*, 2007; Gellersen und Brosens, 2008).

3.4 Präimplantationsphase und Implantation

Mit der Ovulation beginnt die zweite Hälfte des weiblichen Zyklus. Nach einer jahrelangen Ruhephase wird die erste meiotische Reifeteilung der Eizelle beendet und die zweite meiotische Teilung bis zur Metaphase II vollzogen. Die Fertilisation der Eizelle erfolgt in der Tuba uteri. Bereits auf ihrem Weg durch die Tube in Richtung Uterus sendet der Embryo erste humorale Signale aus (Schanz *et al.*, 2004; Krüssel *et al.*, 1998; 2006). Als Blastozyste gelangt er schließlich in das *Cavum uteri*.

Während ihrer Wanderung beginnt die befruchtete Eizelle als Zygote bereits mit der ersten Furchungsteilung. Es folgt ab dem 4. Tag *post conceptionem* das Stadium der Morula (8-16 Zellen). Bereits in diesem frühen Stadium setzt eine beginnende Genaktivität mit Sezernierung früher embryonaler Signale ein (Martin, 2000). Gerichtete Fimbrienschläge des Tubarepithels führen den zukünftigen Embryo in Richtung Uterus. Währenddessen schreitet die Zellteilung voran. Von der Zona pellucida umgeben entsteht im sogenannten Blastomerenstadium im Inneren der Blastozyste der Embryoblast, die Blastozystenhöhle



und der Trophoblast. Trotz weiterer Zellteilung kommt es bis zum Hatching, dem Schlüpfen, zu keinem weiteren Größenwachstum der Blastomere.

Abb. 1: Von der Befruchtung bis zur Implantation der menschlichen Eizelle

Am Ende des 5. Tages befreit sich der Embryo durch Ausdehnungskontraktionen und Sezernieren proteolytischer Enzyme aus der Zona pellucida (hatching) und nimmt direkten Zellkontakt mit dem Endometrium auf. Die freie Blastozyste ist für die Implantation bereit und steht in Apposition zur vorbereiteten endometrialen Schleimhaut. Als semi-allogenes Gewebe muss der Embryo die mütterliche Immunreaktion dahingehend beeinflussen, ihn nicht als fremd erkanntes Gewebe abzustoßen, sondern zu tolerieren. Es besteht ein empfindliches Gleichgewicht zwischen der Trophoblast-Invasion und der Abstoßung durch verschiedene Mechanismen, wie der immunsuppressiven Wirkung von Progesteron oder einem veränderten Zytokinprofil (Thellin et al., 2003). Ab dem Zeitpunkt der Befruchtung beginnt die bidirektionale Kommunikation auf Zytokinebene zwischen Endometrium und Trophoblast. Das mütterliche Immunsystem muss den semi-allogenen Embryo als eigenständig erkennen ihn aber immunologisch tolerieren. Auf dem Weg zum Ort der Implantation sendet der Embryo bereits biochemische Signale an das mütterliche endometriale Gewebe, welches das Signal interpretiert und entsprechende Antworten auf Zytokinebene zurücksendet (Hess et al., 2006). Diese Signale sind für den positiven Verlauf der Schwangerschaft entscheidend. Durch kontinuierliche Ausschüttung parakriner Zytokine sorgt der Embryo während und nach erfolgreicher Implantation für den Erhalt der Immuntoleranz. Das embryonale Zytokin IL-1 hat dabei eine entscheidende Rolle für die bevorstehende embryonale Einnistung (de los Santos et al., 1996; Krüssel et al., 1997 und 1998; von Wolff et al., 2002).

Die Implantation beginnt ab dem Zeitpunkt des *Hatching* der Blastozyste, sechs Tage nach der Befruchtung, bis zum Beginn des ersten plazentaren Kreislaufes in der zweiten Entwicklungswoche ca. neuneinhalb Tage nach der Ovulation (Jones *et al.*, 1992). Es werden zahlreiche Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle auf der embryonalen Außenseite exprimiert, so dass es zur Ausbildung von Verbindungskomplexen beider Zellsysteme kommt (van Mourik *et al.*, 2008). Bevor der Trophoblast in Kontakt mit dem Endometrium tritt, differenziert er sich in zwei verschiedene Zellmassen, einen äußeren Synzytiotrophoblast und einen inneren Zytotrophoblast.

Die Vorbereitung der Implantation beginnt mit der Apposition der Blastozyste während des Implantationsfensters, ihr folgt die Adhäsion an das Endometrium. Der Synzytiotrophoblast besitzt lytische Aktivität, bewirkt dadurch die Apoptose endometrialer Schleimhaut, durchdringt invasiv das Uterusepithel und invadiert die Dezidua bis hin zu den mütterlichen Arterien (Böddeker 2015; Cross *et al.*, 1994). Ein zu expansives Eindringen der Blastozyste in die Dezidua wird durch von Metalloproteinasen gebildete Gewebsinhibitoren verhindert (Lala und Graham, 1990). Die weitere embryonale Versorgung wird bei fortschreitender Schwangerschaft und wachsendem Bedarf durch die Aufnahme essentieller Nährstoffe aus dem mütterlichen Blut gewährleistet.

3.5 Der immunologische Implantationsdialog

Die Sezernierung von Zytokinen ist Teil des embryo-maternalen Dialogs. Zytokine sind Schlüsselmediatoren für die Initiierung und den Erhalt der Schwangerschaft und wirken über die Bindung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren. Sie sind Teil eines komplexen Kommunikationsnetzwerkes zwischen den Zellsystemen und Organen. Ihre Wirkung wird zunächst extrazellulär rezeptorvermittelt und kann autokrin, parakrin oder juxtakrin erfolgen. Über intrazelluläre Signalkaskaden wird das Signal weitergeleitet. Hierbei können verschiedene Signalwege genutzt und dabei das Signal auch potenziert werden (Löffler und Petrides, 2002).

3.5.1 Zytokine

Die Zytokine sind eine große Familie von niedermolekularen, hochpotenten Glykoproteinen. Sie sind regulatorische Proteine, die an der Immunabwehr und einer Vielzahl anderer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt sein können.

Der Begriff Zytokin wurde Mitte der 70er Jahre für Mediatoren eingeführt, die von vielen verschiedenen Zellen sezerniert, eine Vielzahl von Funktionen an anderen Zellen verursachen können (Loppnow, 2007). Zu den Zytokinen zählen unter anderem Chemokine, Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren. Ihre biologische Funktion liegt in der Vermittlung von Zellteilung, Entzündung, Immunität, Differenzierung, Migration und Reparatur. Zu unterscheiden sind anti- von pro-inflammatorischen Zytokinen. Proinflammatorische Zytokine sind z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und TNFα, anti-inflammatorische z.B. IL-4, IL-10 und Insulin-like-Growth-Factor-1. Zwischen diesen beiden Gruppen besteht eine empfindliche Balance (Szelenyi, 2001). Eine wichtige Aufgabe der Zytokine ist die Regulation des Ausmaßes der immun-inflammatorischen Antworten und damit die Kontrolle des Immunsystems (Arai *et al.*, 1990). Auch die Synthese anderer Zytokine wird beeinflusst. Ihr vermittelndes Signal kann autokrin, parakrin oder juxtakrin wirken.

Im Endometrium beeinflussten Zytokine die Rezeptivität bezüglich des Embryos und die zyklische Abstoßung des Endometriums, wenn keine Schwangerschaft eingetreten war (Tabibzadeh *et al.*, 1995, 1999; Sherwin *et al.*, 2004). Dysregulationen proinflammtorischer Zytokine des Endometriums wurden in Zusammenhang mit einer reduzierten Fertilität und erhöhter Abortrate gebracht (von Wolff *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2003).

Alle in der Implantation involvierten Gewebe (Embryo, Trophoblast, Endometrium) können nahezu jedes bekannte Zytokin produzieren (Chard, 1996; Clark, 1993; Polan *et al.*, 1995; Tazuke und Guidice, 1996; Zolti *et al.*, 1991; Krüssel *et al.*, 2000).

Meistens kommen Zytokine in löslicher Form vor, es gibt aber auch membranständige Formen wie z.B. bei IL-1 und TNF (Janeway und Travers, 2002). Die Affinität zu den korrespondierenden Rezeptoren ist hoch und ihre Wirkung meistens lokal begrenzt.

Nach einem extrazellulären Stimulus erfolgt die kurzfristige Produktion und Sekretion der Zytokine. Indem sie als Liganden an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche binden, induzieren sie in ihren Zielzellen Antworten, die auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Das Resultat eines solchen Signaltransduktionsweges, der über schnell aktivierbare Signalwege in den Zellkern führt, ist die gesteigerte oder verminderte Transkription von Zielgenen und der entsprechenden Proteinexpression (Janeway und Travers, 2002; Löffler und Petrides, 2002). Zytokine spielen somit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression der Zielzellen. Sie vermitteln ihre pleiotropen Funktionen je nach Zelltyp, wobei es zur Überschneidung und Redundanz in Bezug auf die individuellen Funktionen in verschiedenen Gewebearten kommen kann (Janeway und Travers, 2002).

3.5.2 Interleukin-1 System und embryonale Implantation

Das IL-1 System modelliert im immunologischen Kontext auch die embryonale Implantation. Hierbei handelt es sich um hochinflammatorische Zytokine, welche auf fast jeden Zelltyp und oft im Zusammenhang mit anderen Zytokinen oder kleinen Mediatormolekülen wirken (Dinarello 1996). Die IL-1 Familie beeinflusst eine große Zahl parakriner und endokriner Reaktionen und ist Teil der IL-1ß / TLR Superfamilie.

Aktiviertes IL-1ß wird von einer Vielzahl von Zelltypen sekretiert. Die Hauptaufgabe ist die Vermittlung der inflammatorischen Reaktion (Feldmann, 1993). Unter anderem tritt es in die Zirkulation ein, triggert IL-1 Rezeptoren im Bereich des hypothalamischen Gefäßnetzwerkes und bewirkt die Synthese der Cyclooxygenase-2, welche die zerebralen Prostaglandinmengen erhöht und so das Thermoregulationszentrum für die Fieberinduktion stimuliert. In der Peripherie aktiviert IL-1ß die epithelialen Rezeptoren, was unter anderem auch die IL-6 Produktion steigert. Studien ergaben Hinweise, die IL-1 eine potentielle Rolle während der Implantation einräumen (Krüssel *et al.*, 2006). Zudem ist bekannt, dass IL-1 dosisabhängig die IL-6 Synthese stimuliert (Laird *et al.*, 1994; Vandermolen, Gu, 1996; Bersinger *et al.*, 2010).

Zur IL-1 Familie gehören die Agonisten IL-1α und IL-1ß und IL-1Ra als spezifischer Rezeptorantagonist. Der natürlich vorkommende IL-1Ra stellt in der Biologie der Zytokine eine Besonderheit dar (Dinarello 1996).

IL-1 α und IL-1 β sind pleiotrope pro-inflammatorische Zytokine mit gleicher biologischer Aktivität und binden an die gleichen Rezeptoren (Dower *et al.*, 1986). IL-1 α ist die membrangebundene und IL-1 β die sezernierte Form. Beide Formen werden von vielen Zellen als inaktives 33kDa Vorläuferpeptid synthetisiert und anschließend als aktiviertes 17kDa reifes Protein sezerniert (Dimitriadis *et al.*, 2005; Krüssel *et al.*, 2003). Während IL-1 α auch in beiden Formen aktiv ist, ist IL-1 β nur als 17kDa Protein aktiv. Es gibt Hinweise, dass die IL-1 Produktion ein streng regulierter Prozess ist, welcher durch von der Natur errichteten natürlichen "Blockaden" in seiner hochpotenten Wirkung eng begrenzt kontrolliert wird. Ergänzend zur kontrollierten Genexpression, Synthese und Sekretion ist diese Regulation auch auf die Oberflächenrezeptoren, die löslichen Rezeptoren und den Rezeptorantagonisten bezogen.

Sowohl IL-1α als auch IL-1ß und der IL-1ra binden mit hoher Affinität an zwei Rezeptortypen (Dower *et al.*, 1986), den Typ I Rezeptor (IL-1RI) (Sims *et al.*, 1988), der das Signal weitervermittelt, wohingegen der Typ II Rezeptor (IL-1RII) (Horuk und McCubrey, 1989) das Signal nicht weiterleitet und vielmehr in eine Sackgasse führt. Auch diese Situation ist einzig in der Zytokinbiologie (Dinarello, 1996). Der IL-1RII ist nur auf Leukozyten exprimiert, IL-1RI auch auf anderen Zellen. Außerdem gibt es noch das Rezeptor-assoziierte Protein (IL-IR-AcP), welches das Signal triggert. Die Inhibition der Signaltransduktion durch IL-1ra erfolgt durch die Bindung an beiden Rezeptortypen (Hannum *et al.*, 1990).

Die IL-1 Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Ig-Domäne und einem zytoplasmatischen so genannten Toll-like-Rezeptor. Nach Dinarello werden nur wenige IL-1RI auf den Primärzellen exprimiert und weil nur eine so geringe Anzahl von Rezeptoren getriggert werden muss, um eine biologische Antwort auf das IL-1 Signal zu erreichen, ist davon auszugehen, dass der Signalmechanismus hoch effizient und stark amplifiziert ist. Die Dimerisation der zytosolischen Domäne des IL-1RI mit IL-1RAcP initiiert dann das Signal. Eine Erklärung für die Potenz des IL-1 vermittelten Signals ist die dem Rezeptor folgende Amplifikation durch multiple Phosphorylierungen der Proteinkinasen. Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ermöglichen der Zelle Gene zu transkribieren, die durch IL-1-aktivierte Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden. Die multiplen postrezeptorisch erfolgten Phosphorylierungen können so möglicherweise erklären, warum IL-1 zur gleichen Zeit verschiedene Gene in derselben Zelle induzieren kann (Dinarello, 1996). Die intrazelluläre IL-1ß vermittelte Signaltransduktion erfolgt unter anderem über MAP-Kinasen assoziierten Signalwege, welche über die Enzyme JNK, p38 und ERK vermittelt werden und über den P13-K/AKT-Signalweg. Als intranukleärer Transkriptionsfaktor vermittelt der Nuklearfaktor kB (NF-kB) (Kracht et al., 2002 Neumann et al., 2002).

Im Rahmen der IVF zeigten sich bereits 1991 erste Hinweise auf die Anwesenheit von IL-1α und IL-1ß in den Kulturmedien von Embryonen (Sheth *et al.*, 1991; Zolti *et al.*, 1991; Krüssel *et al.*, 2003).

Im zyklusspezifischen Verlauf der Zytokinexpression ließ sich vor allem ein Anstieg der mRNA Sekretion von IL-1ß zum Zeitpunkt der Implantation nachweisen (von Wolff *et al.*, 2000). Neben T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen war es im Oberflächenepithel des Endometriums lokalisiert und wurde dort mittsekretorisch am stärksten exprimiert (Bi-gonesse *et al.*, 2001; Lindhard *et al.*, 2002).

Auch die endometriale Expression des IL-1RI war zum Zeitpunkt der Implantation am höchsten. Hierbei lag die Hauptlokalisation des Rezeptors in den endometrialen Epithelzellen (Simón *et al.*, 1993a und b). Das IL-1ß während der Implantation von Bedeutung ist, zeigte sich auch in der Tatsache, dass bei Mäusen die mit IL-1ra behandelt wurden eine Implantation verhindert werden konnte (Simón *et al.*, 1994). Bestätigt wurde dies durch die Korrelation von Implantationsstörungen mit einer supprimierten Expression des Zytokins (Simón *et al.*, 1998). Als Reaktion auf die IL-1ß Stimulation erfolgte unter anderem auch die Induktion der IL-6 Produktion.

3.5.3 IL-6 im Implantationsdialog

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es ist Teil der IL-6 Familie, der neben IL-6 auch die Zytokine IL-11, LIF (leukaemia inhibitory factor), OSM (oncostatin M), Ciliary neurotrophicfactor, Cardiotrophin-1 und Cardiotrophin-like cytokine zuzuordnen sind (Chevalier *et al.*, 1996). Es handelt sich um Mediatoren, die von T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet werden. Sie induzieren Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen und wirken neben B- und T-Zellen, Thymozyten auch auf weitere Zellarten. Neben ihrer Funktion als Akute-Phase-Proteine in der Vermittlung von Inflammation und Immunreaktion, spielen diese Zytokine auch eine wichtige Rolle in der Hämatopoese, der Leber, der neuronalen Regeneration, der Fertilität und Embryonalentwicklung (Heinrich *et al.*, 2003). IL-6 nimmt auch eine Rolle in der Angiogenese und Tumorinvasion der Tumorentstehung ein, ebenso beeinflusst es die Wundheilung und die Entwicklung der Hirngefäße (Fisher *et al.*, 2014; van Snick, 1990; Hirano *et al.*, 1990; Sehgal, 1992). Auch im Zusammenhang mit der Vaskularisation im reproduktiven Gewebe der Maus konnte IL-6-mRNA nachgewiesen werden (Motro *et al.*, 1990).

Während der embryonalen Implantation wird IL-6 im luminalen Epithel des Uterus gebildet (Cork *et al.*, 2002; Perrier d'Hauterive *et al.*, 2004), mehr in Stromazellen als in epithelialen Zellen (Tabizadeh and Sun, 1992). Das Maximum seiner Sekretion ist in der mittleren bis späten sekretorischen Phase und fällt somit in das sogenannte Implantationsfenster (Tabibzadeh *et al.*, 1995; Sherwin *et al.*, 2002).

Nicht nur das Endometrium, sondern auch der Trophoblast exprimiert IL-6 und IL-6-Rezeptoren, welches die autokrine Produktion von hCG induziert. Somit wird IL-6 eine Rolle in der frühen Implantation, als auch für den Erhalt der Schwangerschaft zugeschrieben (Makkar *et al.*, 2006).

Die IL-6 Expression unterliegt dem Einfluss verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel IL-1, TNF-alpha, INF-gamma und den Steroidhormonen, insbesondere dem Östrogen (Bersinger *et al.*, 2011; Perrier d'Hauterive *et al.*, 2004, Tabibzadeh *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite inhibieren hCG und TGF-ß die IL-6 Expression (Perrier d'Hauterive et al., 2004). Niedrige IL-6-mRNA Spiegel werden in Zusammenhang mit wiederholten Aborten gebracht. Die endometriale IL-6 Expression war bei Frauen mit häufigen Aborten erniedrigt (Prins *et al.*, 2012). Verursacht wird dies möglicherweise durch eine erniedrigte IL-6 Funktion im mütterlichen Gewebe und einer nicht regelrechten Trophoblastenentwicklung (Jasper *et al.*, 2007). Tierexperimente zeigten die zentrale Rolle von IL-1 in der Implantation und IL-6, als Mediator für viele IL-1 Aktionen an der endometrialen-throphoblastären Kontaktstelle (Akira *et al.*, 1990). Das Fehlen von IL-6 verschlechterte signifikant die Implantationsrate (Dechaud *et al.*, 1998). Diese Studie ergab somit einen starken Hinweis auf die Bedeutung von IL-6 zum Erhalt der Schwangerschaft.

IL-6 bindet an verschiedene Rezeptoren: die membrangebundenen Rezeptoren IL-6Rα und IL-6Rß und den löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R), ein 55 kDa Protein, welches mit der gleichen Affinität wie die Membranrezeptoren an IL-6 binden (Mullberg *et al.*, 1993). IL-6Rα findet sich auf der Oberfläche des Endometriums und des Trophoblasten (Sharkey *et al.*, 1995) und kann, reguliert durch die Proteinkinase C, durch proteolytische Spaltung von der Plasmamembran gelöst werden. Aktiviert durch Mitglieder der IL-6-Familie nutzt es den intrazellulären Signalweg über gp-130, welches als Rezeptoruntereinheit das Signal intrazellulär weiterleitet (Taga *et al.*, 1992). Der Komplex aus gp80 und gp130 aktiviert dann die Mitglieder der Janus-Kinase-Familie (JAK) der zytosolischen Tyrosin-Kinasen (Taga *et al.*, 1996). Diese Kinasen phosphorylieren spezifische Transkriptionsfaktoren (STAT3), welches das Signal ins Zytoplasma oder den Nukleus übertragen (Laflamme *et al.*, 2005; van Mourik *et al.*, 2008; Ohbayashi *et al.*, 2007; Cork *et al.*, 2002; Makkar *et al.*, 2006).

3.5.4 Interleukin-1 induzierte Signalwege

Die Zytokinwirkung muss in ihrem Kontext umgehend umgesetzt werden können. Das bedeutet für die postrezeptor-aktivierten Signalwege eine effiziente Signaltransduktion, welche im Zellkern zu schnellen Veränderungen der Genexpression führen muss. Auf der zytoplasmatischen Seite der Rezeptoren werden nach extrazellulärer Ligandenbindung Signaltransduktionskaskaden aktiviert, bei denen aufeinanderfolgend kaskadenartig verschiedene Proteine aktiviert werden. Diese Aktivierungen sind häufig mit Phosphorylierungen verbunden oder durch den Austausch von gebundenem GDP durch GTP gekennzeichnet. Als Resultat eines solchen Signaltransduktionsweges kommt es zu gesteigerter oder verminderter Transkription von Zielgenen und der entsprechenden Proteinexpression. Zytokine können verschiedene Signalwege nutzen. Signalwege der IL-1 vermittelten Stimulation können über den IL-1RI oder den Jak-STAT-Weg führen. Die Interleukin-1-Rezeptor Familie bildet eine Subeinheit, die zur Immunglobulin-Superfamilie der Klasse 4 gehört. Sie hat eine wichtige Rolle in der Signalübertragung der angeborenen Immunantwort sowie der inflammatorischen Reaktion. Der IL-1-Rezeptor besitzt eine ca. 100 Aminosäuren lange, extrazelluläre Sequenz, die als Immunglobulindomäne bezeichnet wird. Die Rezeptorfamilie ist evolutionär stark konserviert und auch bei Insekten und Pflanzen Teil in der Signalvermittlung der Immunabwehr (Dunne *et al.*, 2003; Janeway, 2009).

IL-1ß agiert über zwei homologe Rezeptoren, den IL-1RI und IL-1RII. Bindet IL-1ß an den IL-1RI so entsteht ein Rezeptorkomplex, der aus dem IL-1RI und dem Interleukin-1-receptor accessory protein (IL-1RAcP) besteht. Der Rezeptor muss diesen multimetrischen Komplex ausbilden, da er keine intrinsische Enzymaktivität besitzt. Nach Oligodimerisierung des Rezeptors werden verschiedene Signalmoleküle rekrutiert. Über homophile Protein-Protein Interaktionen kooperiert er mit verschiedenen Zytosolproteinen um die zelluläre Antwort zu erreichen. Zu den assoziierten Proteinen gehören die Interleukin-assoziierte-Kinase (IRAK), der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktor-6 (TRAF6) und eine Reihe von TIR-Domänen beinhaltende Adaptermoleküle (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM). Durch die Aktivierung des intrazellulären Signalweges mittels IL-1 kommt es zur Oligomerisation und Lys-63-linked Polyubiquitination (K63-pUb) von TRAF6. Das Resultat ist die Amplifikation des Signalweges welches in der Aktivierung der MAP-Kinasen gipfelt (Elzinga *et al.*, 2008).

Eine weitere Rolle in der intrazellulären Vermittlung des extrazellulären Signals spielt neben der Aktivierung der MAP-Kinasen auch die des JAK/STAT-Wegs (Janeway, 2009). Dieser Weg ermöglicht die sehr schnelle und direkte Transduktion des extrazellulären Signals in den Zellkern. JAK domänisieren nach erfolgter Ligandenbindung und phosphorylieren im Anschluss im Zytosol gelegene latente Transkriptionsfaktoren als Signalgeber und Aktivatoren der Transkription (STAT), welche im Nucleus die Expression der Zielgene modulieren (Leonard *et al.*, 1998). Auch die Phophoinositid 3-Kinase (P13-K) Signalkaskade kann in der IL-1ß vermittelten Aktivierung induziert werden (Neumann *et al.*, 2002)

Häufig besitzen die an den Zytokinrezeptoren rekrutierten Proteine mehrere unterschiedliche oder gleiche Interaktionsdomänen und können darüber mit weiteren Proteinen assoziieren. Viele dieser Proteine dienen ausschließlich als Adaptermoleküle, andere stellen Enzyme oder Transkriptionsfaktoren dar (Löffler und Petrides, 2002). Die intrazelluläre zytokinvermittelte Signaltransduktion ist generell vielgestaltig und effizient.

3.5.4.1 MAP-Kinase-Weg

Der MAP-Kinase-Weg vermittelt vielfältige Funktionen in der Zellbiologie, er beinhaltet eine Familie von Proteinkinasen, deren Funktion und Regulation im Laufe der Evulotion konserviert blieben (Widman *et al.*, 1999). MAP-Kinasen sind als Serin- oder Threonin-Proteinkinasen Bestandteile des intrazellulären Signaltransduktionsnetzes. Die Aktivierung erfolgt z.B. durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone und andere Stressoren. Die Signalvermittlung dient unter anderem der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Kolch, 2000). Unter anderem wird der MAP-Kinase-Weg auch über die IL-1RI abhängige Stimulation aktiviert. Durch Phosphorylierung an zwei verschiedenen Aminosäuren, Tyrosin und Threonin, kann er direkt aktiviert werden, um dann andere Proteine an deren spezifischen Serin- und Threoninresten zu phosphorylieren. (Schäfer und Williams, 2000).

Die Weiterleitung des MAP-Kinase-Weg erfolgt über drei hintereinander geschaltete, hierarchisch geordnete Proteinebenen, den MAP-Kinasen: MAP-3K, MAP-2K und MAP-K welche in dieser Reihenfolge durch Phosphorylierung aktiviert werden (Cobb, 1999; Whitmarsh und Davis, 1996). Hierbei aktiviert jede MAP-Kinase nicht nur die unmittelbar nächstfolgende, sondern in Folge auch mehrstufig andere Zielproteine und es kommt zu einem verzweigten Geflecht der Informationsweitergabe.

Einer der bekanntesten MAP-Kinase-Wege führt über Ras, Raf, MEK und ERK. (Kolch, 2000). Die Aktivierungskaskade beginnt nach Ligandenbindung durch Phosphorylierung spezifischer Thyrosylreste am jeweiligen Rezeptor, welche über eine SH2-Domäne einer Reihe von Adapterproteinen als Bindungsstelle dienen. Nach Bindung eines Adapterproteines an den aktivierten Rezeptor (Grb2) erfolgt die weitere Bindung an ein als SOS bezeichnetes Protein. Nachfolgend induziert dieses den Austausch von GDP zu GTP an einem in die Membran integrierten Ras-Protein. Der so entstandene GTP-Ras-Komplex aktiviert Raf, eine Proteinkinase (MAP-3K), welche die Phosphorylierung von MEK (MAP-2K) an den Serinresten induziert. MEK wiederum aktiviert dann ERK (MAP-K) (Post und Brown, 1996; Davis, 1993; Kolch, 2000).

Am Ende der Phosphorylierungskaskade im Zytoplasma steht die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern und die konsekutive Transkription einer Vielzahl möglicher Zielgene der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum, dem programmierten Zelltod oder der lokalen Immunreaktion (Ichijo, 1999). Ein weiterer Weg neben dem Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg ist der JNK-Signalweg. Zytokine und externe Stressoren induzieren unter anderem diesen Weg. Auch hier handelt es sich um die Phosphorylierung drei hintereinander geschalteten MAP-Kinasen (Weston, 2002). In diesem Signalweg sind ASK, MEK (MAP-3K), MLK (MAP-2K) und JNK (MAP-K) eingebunden (Weston, 2002)

MAP-Kinasen werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Zu ihnen gehören ERK, mit den Isoformen ERK1-8, p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und cJNK (Robinson and Cobb, 1997). Die Aktivierung erfolgt durch verschiedenste Stimuli. IL-1ß aktiviert verschiedene MAP-Kinase-Gruppen (Saklatvala *et al.*, 1999; Stylianou and Saklatvala, 1998). Im Gegensatz zu ERK, das im Wesentlichen durch Hormone und Wachstumsfaktoren aktiviert wird, wird p38 in vielen Zellen durch IL-1ß und andere unterschiedlichen Stressstimuli aktiviert (Keyse, 1995).

3.5.4.2 PI3-K/AKT Signalweg

AKT (auch bekannt als Proteinkinase B oder PKB) ist Teil des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K)/AKT Signalweges, diesem wird eine zentrale Rolle in der Signalvermittlung von Zellwachstum, Zellproliferation und Zellstoffwechsel, Proteinsynthese, Transkription und Apoptose zugeschrieben (Hemmings BA, Restuccia DF, 2012). Die Serin/Threonin-Kinase AKT gilt als ein zentraler Signalpunkt in allen Zellen höherer Eukaryonten und ist eines der bekanntesten und vielfältigsten Proteinkinasen im Kern der humanen Physiologie und Krankheit (Manning et al. 2007). Es gibt drei AKT-Isoformen (AKT1/PKBαβ, AKT2/PKBβ, AKT3/PKBγ) (Manning *et al.*, 2007). P13-K katalysiert die Aktivierung von AKT. (Cantley, 2002; Capodici *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 2000; Wymann *et al.*, 2000). Die AKT Signalkas-kade wird über Zytokinrezeptoren, Tyrosinkinasen, Integrine, B- und T-Zell Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und andere Stimuli, welche die Produktion von Phophati-dyl-Inositol-Triphosphat über die PI3-K induzieren, vermittelt (Hers *et al.*, 2011; Bozulic *et al.*, 2009).

IL-1, IL-18 und LPS werden durch spezifische Rezeptorkomplexe der Toll/IL-1R Familie erkannt. Anders als der MAP-Kinase-Weg, welcher über das rezeptorassoziierte Modul MyD88-IRAK-TRAF6 erfolgt, konnte der PI3-K-Weg bei Neumann *et al.* direkt mit dem Rezeptormolekül und IRAK-1 interagieren. Hierbei stimulierte II-1ß die IL-6 Produktion in einer embryonalen murinen Zelllinie (Neumann *et al.*, 2002).

3.6 Zielsetzung

Die folgende Arbeit untersuchte Regulationsmechanismen, die die lokale Implantation beeinflussen. Dabei wurde die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1ß auf die Synthese, Expression und Sekretion von IL-6 humaner ES untersucht. Die Kultur von nicht-dezidualisierten ES der St-T1 Zelllinie diente als *in vitro* Modell.

1. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von IL-6 als endometriales Produkt auf den embryonalen IL-1ß Stimulus. Hierbei sollte eine dosis- bzw zeitabhängige Konzentration von IL-1ß zur Induktion des Produktzieles IL-6 bestimmt werden.

2. Des weiteren sollte die Signalvermittlung von IL-1ß über den korrespondierenden Rezeptor IL-1R untersucht und die Wirkung auf die IL-6 Synthese nach dessen Inhibition mittels des spezifischen des IL-1-Rezeptorantagonisten, sowie die Bestimmung der notwendigen Konzentration zum Erreichen der Inhibitionsschwelle, welche die zu erwartende IL-6 Induktion unterdrückt, untersucht werden.

3. Darüber hinaus sollten intrazellulär genutzte Signalproteine des MAP-Kinasen-Signalweges und deren Aktivierung ermittelt werden.

In der Untersuchung nach dem Einfluss der Dezidualisierung richtete sich diese Arbeit auf die Beobachtung nicht-dezidualisierter ES. Daraus könnten sich Hinweise ergeben, ob im Falle eines nicht stattgefundenen adäquaten Dezidualisierungsprozesses eine veränderte endometriale Stimulationssensitivität auf das embryonale IL-1ß-Substrat, im Vergleich zu dezidualisierten ES, bestand.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Autoklav: 2540 EL, Tuttnauer, Breda, Niederlande Bio-Photometer: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Brutschrank: Heraeus, Hanau, Deutschland DPU-414 Thermal Printer: Seiko Instruments, Neu Isenburg, Deutschland Eppendorf Mixer 5432, Eppendorf AG Gelkammer 40-1214: peqLAB GmbH, Erlangen, Deutschland Magnetrührer: IKA-Combimarg-MCT, IKA-Werke, Staufen, Deutschland Mikroliterzentrifuge: Micro 22 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland Mikroskop: Leitz-Diavert, Leica Microsystems, Wetzlar Deutschland Mikrowelle: Micromat, AEG-Electrolux, Nürnberg, Deutschland Pipettboy acu: Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland Pipetten (1-1000 µl): Eppendorf AG Standzentrifuge: Rotixa RP, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland Sterilbank GelAire BSB 3: Flow Laboratories, Opera, Italien Thermoblock: Thermostat 5320, Eppendorf AG Thermocycler: Biometra T-Gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland Thermocycler: peqSTAR – 96 Universal Gradient, peqLAB GmbH PTC-100[™], MJ Research, Waltham, USA Thermal-Transfer Drucker: Mitsubishi P90, Irvine, USA UV-Kammer: Gel-Doc 1000: Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland Vortex Genie: Scientific Industries Inc., N.Y., USA Waage: Sartorius, Göttingen, Deutschland Wärmebad: Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen, Deutschland Werkbank Cytair 125: ESI, Flufrance, Wissous, Frankreich Zentrifuge: GS-6KR, Beckmann, München, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon Blue Max[™]Tubes 15/50 ml: Becton Dickinson Labware, N.J., USA

Küvetten UVette®: Eppendorf AG

PCR Reaktionsgefäße: Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Pipettenspitzen: peqLAB Safeguard, peqLAB GmbH

Pipettenspitzen: Safe Seal-Tips® Professional, Biozym Scientific

Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 0,5/1,5/2,0 ml, Eppendorf AG

Stripetten Costar® 5/10/25 ml: Corning Incorporated, N.Y., USA

Zellkulturschalen: Falcon Easy Grip™ 35x10mm / 100x20mm, Becton Dickinson Labware

4.1.3 Zelllinie

Humane endometriale Stromazelllinie St-T1, Brosens et al., 1996

4.1.4 Kits

DNAse-Verdau: Deoxyribonuclease I, RNAse-free, Fermentas, Waltham, USA

ELISA Kit: Human IL-6 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

PCR: 2,5-fach Mastermix, Fermentas

RT: High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA

4.1.5 Primer

Die verwendeten Primer wurden alle in einer Konzentration von 100 μ M von der Firma Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland bezogen. Die spezifischen Sequenzen für humanes ß-Aktin und humanes IL-6 sind Tab. 1 zu entnehmen.

Primer	Sequenz $5' \rightarrow 3'$	T _m [°C]	T _A [°C]	Zykluszahl
hu ß-Aktin 5	CGGGACCTGACTGACTACC	61,0	56	35
hu ß-Aktin 3	AGGAAGGCTGGAAGAGTGC	58,8	56	35
hu IL-6 for	AGACTTGCCTGGTGAAAATCA	58,4	56	39
hu IL-6 rev	CAGGGGTGGTTATTGCATCTA	58,2	56	39

Tab. 1: Sequenzen humanes ß-Aktin und IL-6; Primer – Oligounkleotidsequenzen, Zykluszahlen in der PCR, Schmelz- (T_m) und Annealing- (T_A) Temperaturen

4.1.6 Zytokine und Inhibitoren

IL-1ß (rekombinant, human), R&D Systems, Inc.

IL-1ra, Promokine, PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland

MEK1 (=ERK-) Inhibitor (PD 98,059), Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

4.1.7 Reagenzien und Chemikalien

Agarose LE, Biozym Scientific GmbH

Bromphenolblau, Sigma-Aldrich GmbH

Borsäure, Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chloroform, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

DEPC, Sigma-Aldrich GmbH

DMEM Medium (high glucose), Biowest S.A.S., Nuaillé, Frankreich

Dulbecco's PBS 1x, Biowest S.A.S.

EDTA, Sigma-Aldrich GmbH

Ethanol (absolut), Merck KGaA

Ethidiumbromid, Fluka AG, Buchs SG, Schweiz

FBS (charcoal stripped), Biowest S.A.S.

Gentamycin, Biowest S.A.S.

Protein-Ladepuffer, Fermentas

L-Glutamin, Biowest S.A.S.

MCDB 105, Biowest S.A.S.

Methanol, Merck KGaA

MycoKill, Biowest S.A.S.

Natrium-Pyruvat, Biowest S.A.S.

NEAS, Biowest S.A.S.

Nuklease-freies Wasser (destilliertes Wasser mit 0,1% DEPC versetzt und autoklaviert bzw. aus PCR Mastermix Kit entnommen)

Penicillin/Streptomycin [100 U/ml], Biowest S.A.S.

peqGOLD TriFast™, peqLAB GmbH

2-Propanol, Merck KGaA

Protease Inhibitor Cocktail, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

Quantitas DNA Marker 200 bp - 10 kb, Biozym Scientific

Tris, Carl Roth GmbH & Co. KG

Trypsin-EDTA, Biowest S.A.S.

Zell-Lyse Puffer, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

4.1.8 Puffer und Medien

Alle nachfolgend genannten Medien und Puffer wurden bei 4°C aufbewahrt.

6x Agarosegel-Ladungspuffer wurde wie in Tab. 2 dargestellt mit dH₂O angesetzt:

Glycerol	12% (v/v)
EDTA	100mM
SDS	0,6% (v/v)
Bromphenolblau	0,003% (v/v)

Tab. 2: Zusammensetzung Agarosegel-Ladungspuffer

Das Medium zur Kryokonservierung bei -196°C ist Tab. 3 zu entnehmen.

DMEM Medium (high glucose, w/o L-Glutamine,	78% (v/v)
w/o Sodium-Pyruvate)	
MCDB 105	22% (v/v)
FBS (charcoal stripped)	20% (v/v)
L-Glutamin	1x
NEAS	1x
Natrium-Pyruvat	1x
Antibiotika:	
Penicillin/Streptomycin [100 U/ml]	100U/ml
Gentamycin	40µg/ml
Insulin	5µg/ml
DMSO	10% (v/v)

Tab. 3: Ansatz des Kryokonservierungsmedium

10x PBS (Tab. 4) wurde wie folgt angesetzt:

NaCl	1,4M
KCI	0,03M
Na ₂ HPO ₄	0,1M
KH ₂ PO ₄	0,02M

Tab. 4: Zusammensetzung 10x PBS

Der TBE-Ansatz (Tabelle 5) erfolgte mit dH₂O und einem Ziel pH von 8,8:

Tris	890mM
Borsäure	890mM
EDTA	20mM

Tab. 5: Zusammensetzung TBE-Puffer

Die ES wurden im Zellkulturmedium aufgeführt in Tab. 6 inkubiert:

DMEM Medium (high glucose, w/o L-Glutamine,	78% (v/v)
w/o Sodium-Pyruvate)	
MCDB 105	22% (v/v)
FBS (charcoal stripped)	10% (v/v)
L-Glutamin	2mM
NEAS	2mM
Natrium-Pyruvat	1mM
Insulin	4µg/ml
Antibiotika:	
Penicillin/Streptomycin [100 U/ml]	100U/ml
Gentamycin	40µg/ml
Antimykotikum:	
MycoKill	1mM

Tab. 6: Zellkulturmedium der ES

4.1.9 Computerprogramme

GelDoc Documentation System, Bio-Rad Laboratories GmbH

ChemiDocImaging System, Bio-Rad

Bildbearbeitung: Adobe Photoshop CC 2014, Adobe Systems Inc., San José, USA

Betriebssystem: Windows 7 Ultimate, Microsoft, Redmond, USA

Tabellen- und Diagrammbearbeitung: Microsoft Excel 2010, Microsoft Powerpoint 2010

Textbearbeitung: Microsoft Word 2010

4.1.10 Datenbank

PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez

4.2 Methoden

4.2.1 Zelllinie und Zellkultur

In den Kulturen der Versuchsreihe wurde humane endometriale Stromazellen der Zelllinie St-T1 verwendet, deren Nutzung freundlicherweise durch Herrn Professor Brosens genehmigt wurde. Es handelt sich um eine durch retrovirale Transduktion des Simian Virus (SV40) -T Antigens auf dem Vektor ZipSV40-6, immortalisierte und charakterisierte, nicht kanzerogene, fibroblastäre humane Endometriumzelllinie (Brosens *et al.*, 1996).

Diese Zelllinie wurde genutzt, da sie ähnliche biochemische und endokrinologische Eigenschaften primärer menschlicher ES aufweist und somit als adäquates *in vitro* Modell annährend die molekular-endokrinologische Situation des humanen Endometriums darstellt.

Die Kulturschalen wurden im Inkubator in einer humidifizierten Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Raumluft und 37°C äquilibriert. Die ES-Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem ES-Medium versorgt.

Die adhärenten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mikroskopisch auf ihre Proliferation untersucht.

Bei einer Konfluenz der Monolayer von jeweils mind. 90% erfolgte die Passage auf die Schalen der zu erfolgenden Versuchsreihe mit einer Größe von 35 x 10 mm unter Zugabe von 3 ml des o.g. Zellkulturmediums.

Für die Zellpassage wurde das verbrauchte Medium entfernt. Die weitere Subkultivierung von einer 100 x 20 mm messenden Schale auf zehn 35 x 10 mm Schalen erfolgte unter Zugabe von 2-fach Trypsin/EDTA, welches die Adhärenz und den Zellverbund löste. Zunächst wurden die Zellen mit 8 ml PBS gewaschen, da Trypsin seine zellverbundauflösende Wirkung in Anwesenheit von FBS verliert. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung aufgetragen und die Zellen im Brutschrank für 2 - 4 min inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der stattgefundenen Zellverbandsablösung wurde das Reaktionsgemisch mit 7 ml Medium versetzt und nach Resuspendieren in ein steriles 50 ml Falcon Tube überführt, welches bei 4°C und 2000 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Nach Absaugen des Überstandes konnte das gewonnene Zellpellet in 30 ml frischem ES-Medium resuspendiert und anschließend auf zehn 35 x 10 mm große Zellkulturschalen überführt werden.

Die so resuspendierten Zellkulturen wurden abermals inkubiert. Auch hier erfolgte alle 3 Tage ein Wechsel des Mediums bis erneut eine Konfluenz von mind. 90% erreicht war. Die so entstandenen Monolayer dienten als Grundlage der nachfolgenden Versuchsreihen.

Eine intermediäre Konservierung der Kulturzellen konnte durch Einfrieren der abgeernteten Zellen in einer Lösung bestehend aus 70% ES-Medium, 20% FBS und 10% DMSO bei -80°C erfolgen.

Die Überstände der Zellkulturen aus den Versuchsreihen wurden in einzelne Probengefäßen überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C kryokonserviert.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 RNA Isolation

Zur Gewinnung von intrazellulären Proteinen und RNA wurden die gewonnenen Zellen mittels eines Phenol-Chloroform-Protokolls weiterverarbeitet. Anschließend wurden Proben auf einem Agarose-Gel von 1,5 oder 2% (je nach Versuchsaufbau) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Ladder wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht visualisiert.

Die Isolation der RNA erfolgte mittels eines kombinierten Guanidin-Isothiocyanat/ Phenol-Reagenz nach Chomczynski (Chomczynski und Sacchi 1987). Nach vorsichtigem Absaugen der Überstände und deren Kryokonservierung, wurden die Zellen durch direkte Zugabe von 1ml peqGold TriFast[™] pro 35 mm Zellkulturplatte lysiert und die so entstandene Zellsuspension durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert und in ein trizolfestes 15 ml Tube überführt. Durch die folgende 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur konnte eine möglichst vollständige Dissoziierung der Nukleoproteinkomplexe erreicht werden. Pro ml TriFast[™] wurden 200 µl Chloroform zu den Proben gegeben und anschließend 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach 2- bis 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation mit 5000 xg für 15 min bei 4°C bildeten sich drei verschiedene Phasen aus: die obere wässrige Phase, die mittlere Interphase, und die untere rötliche Phenol-Chloroform-Phase. Hierbei befinden sich DNA und Proteine in der Inter- und Phenolphase, während die RNA ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert ist.

Die Inter- und Phenolphase wurden bis zur Proteinisolierung bei -20°C gelagert. Die obere wässrige Phase, welche ca. 60% des Gesamtvolumens ausmachte, wurde in ein neues steriles 1,5 ml Tube überführt Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich immer auf 1 ml TriFast™. Die RNA-Präzipitation erfolgte nach Zugabe von 500 µl Isopropanol. Im nächsten Schritt wurde die Probe durch Inversion gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 10000 xg bei 4°C entstand ein Pellet als RNA-Präzipitat von gelähnlicher Konsistenz. Nach vorsichtigem Abschütten des Isopropanolüberstandes wurde das Pellet unter Zugabe von 1000 µl 75% (v/v) Ethanol durch Vortexen und Zentrifugation für 5 min bei 5000 xg bei 4°C gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols erfolgte die Lösung der Pellets in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser. Die fertigen Proben wurden zur Verbesserung der Löslichkeit bei 55°C für 10 min inkubiert und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei –80°C eingefroren.

4.2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Messung der Gesamt-RNA-Menge der Proben erfolgte durch Bestimmung der Extinktion bei 260 nm Wellenlänge mit dem UV-Photometer. Hierfür wurde eine Lösung mit 1:100 Verdünnung der RNA Probe gemessen. Bei 260 nm Wellenlänge und 1 cm Schichtdicke der Küvette entsprach eine Absorption von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm als Maß für Verunreinigungen durch Proteine und Phenol bestimmt. Als Richtwert für eine kontaminationsfreie Probe galt hier ein Wert zwischen 1,8 und 2,0.

4.2.2.3 DNAse-Verdau

Um zu vermeiden, dass neben der gewünschten mRNA auch genomische DNA in der nachfolgenden PCR amplifiziert wird, wurde der RT ein DNAse Verdau vorgeschaltet. Hierbei wurde eventuell vorhandene DNA abgebaut, so dass nur noch die spezifische RNA verblieb.

Für den DNAse–Verdau wurde, bezogen auf einen Reaktionsansatz, ein Mastermix aus folgenden Komponenten erstellt (Tab. 7):

Komponenten	Endkonzentration
RNA	2µg
10x DNAse-Puffer	1 x
DNAse (1U/µl)	1 x
dH2O	ad 24µl

Tab. 7: Zusammensetzung DNAse-Verdau

Nun wurde das Reaktionsgemisch im Thermocycler für 30 min bei 37°C inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die DNA-Degradierung. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 2 mM EDTA-Lösung und 10-minütiger Inkubation bei 65°C beendet.

4.2.2.4 Reverse Transkription

Bei der nun folgenden reversen Transkription wurde mittels einer RNA abhängigen DNA Polymerase mRNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA konnte im Anschluss als Ausgangsmaterial in der PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Durch das Enzym Reverse Transkriptase erfolgte zunächst die cDNA-Synthese mit der RNA als Matrize. Random-Primer, die im Bereich des Poly-A-Endes (3'-Ende) der RNA hybridisieren, dienten ihr als Startpunkt. Die Random-Primer initiierten die Transkription der mRNA, die Reverse Transkriptase vervollständigte sie. Das Produkt war ein zur mRNA komplementärer DNA Strang (cDNA).

Der vollständige Reaktionsansatz von 50 µl bezogen auf eine RT-Reaktion enthielt Reagenzienmengen und endgültige Konzentrationen wie in nachfolgender Tabelle (Tab. 8) wiedergegeben:

Komponenten	Endkonzentration
10 x RT Puffer	1 x
25 x dNTPs	1 x
10 x Random Primer	1 x
20 x MultiScribe™ Reverse	1 x
Transkriptase (50 U/µL)	
RNA-Lösung (nach DNAse-Verdau)	30µl
Nukleasefreies dH ₂ O	ad50µl

Tab. 8: Zusammensetzung RT

Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne RNA mitgeführt.

Das Reaktionsgemisch wurde nun im Thermocycler für 10 min bei 25°C inkubiert und dann für weitere 2 Stunden auf 37°C erwärmt, bis die Reaktion abgeschlossen war. Die entstandene cDNA-Lösung diente im Anschluss als Template für den nachfolgenden PCR-Ansatz (Tab. 9).

4.2.2.5 PCR

Die PCR ist eine 1983 von Kary B. Mullis entdeckte Methode zur *in vitro* Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten. Hierbei werden geringe Mengen DNA innerhalb kürzester Zeit vervielfältigt, so dass diese in nachweisbaren Konzentrationen vorliegen.

Primer, kurze DNA-Stücke mit definierter Sequenz, dienen hierbei als Verlängerungspunkt für die Polymerasen, welche wiederum aus den einzelnen Nukleotiden lange DNA-Ketten knüpfen.

Ziel der PCR ist es einen selektiven DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Hierfür wurde die cDNA in zyklischer Abfolge nachfolgender Schritte in 40 Amplifikationen exponentiell vermehrt:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges
- 2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen (annealing)
- 3. Elongation der an die Matrizen-DNA angelagerten Oligonukleotide durch die DNA-Polymerase

Beginn eines jeden PCR-Zyklus ist die thermische Denaturierung. Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren bei ca. 90 - 94°C gelöst. An den nun entstandenen einzelsträngigen DNA-Matritzenmolekülen binden die komplementären synthetischen Oligonukleotide, die Primer. Dieser Schritt wird als Primer-Hybridisierung bezeichnet und erfolgt abhängig von der Primersequenz. Als letzter Schritt folgt die Amplifizierung des definierten Sequenzabschnitts durch das in diesem Versuch verwendete Enzym Taq-Polymerase bei ca. 65°C.

Alle PCRs in den durchgeführten Versuchen erfolgten nach dem folgenden Protokoll (Tab. 9):

	Temperatur (°C)	Dauer
1. Polymeraseaktivierung	94	1min
2. Denaturierung	94	30sec
3. Annealing	primerpaarspezifisch	45sec
4. Elongation	65	1min
5. finale Elongation	65	10min
\rightarrow 40 Wiederholungen der Schritte 2. – 4.		

Tab. 9: Abläufe der durchgeführten PCR

Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne cDNA mitgeführt.

Die PCR für ß-Aktin- als auch die für IL-6 wurde wie in der nachfolgende Tabelle (Tab. 10) in speziellen PCR-Reaktionsgefäßen angesetzt.

Komponenten	Endkonzentration
Sense (5´) Primer [5µM]	0,3µM
Antisense (3´) Primer [5µM]	0,3µM
2,5-fach Master Mix	1 x
Template DNA	5µl
dH ₂ O	ad 25µl

Tab. 10: Reaktionsansatz PCR

Das Prinzip der Gelelektrophorese (Sambrock *et al.*, 1989) beruht auf der Trennung von Molekülen basierend auf deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, dabei verhalten sich die negativ geladenen Nukleinsäuren umgekehrt proportional ihrer Größe. Folgende Faktoren beeinflussen diese Wanderungsgeschwindigkeit: das Molekulargewicht, die elektrische Ladung, die Konzentration des Agarosegels und die Stärke der angelegten Spannung. Bei einem gesuchten DNA-Fragment lässt sich so unter Zuhilfenahme eines definierten Größenmarkers beurteilen, ob dieses tatsächlich amplifiziert wurde. Sichtbar werden die Moleküle unter Zugabe eines DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes unter UV-Licht.

Zur Herstellung einer Agarose-Gelmatrix wurde zunächst die Konzentration entsprechend der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt. Für die Versuchsreihe wurden 1,5% ige bzw. 2% ige Gelmatrices verwendet. Hierfür wurden 1,8 g bzw. 2,2 g Agarose mit 120 ml 1 x TBE verrührt, aufgekocht und nach Zugabe von 8 µl Ethidiumbromid zum Erkalten in eine Gießform überführt. Anschließend wurde die erkaltete Gelmatrix in die Gelelektrophoresekammer mit 1 x TBE gebettet, sodass sie 0,5 cm bedeckt war. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Gelkammern mit 5 µl 6 x DNA-Ladungspuffer versetzt. Das Gesamtvolumen jeder Probe pro Geltasche betrug 25 µl. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 45 min. Im Anschluss wurde die Gelmatrix in die UV-Belichtungskammer überführt, wo die Wanderungsstrecke der Proben visualisiert werden konnte.

4.2.3 Proteinbiochemische Verfahren

4.2.3.1 Isolation

Die untersuchten Proben der nicht-dezidualisierten ES wurden mittels eines Zell-Lyse Puffers (Cell Signaling Technology) entsprechend dem Herstellerprotokoll lysiert. Vom Zellgemisch wurden die Proteine getrennt und nachfolgend das Proteingemisch durch 12% SDS-Polyacrylamidgel elekrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C unter Zugabe eines Protease Inhibitor Cocktails (Santa Cruz) gelagert.

4.2.3.2 ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay von IL-6

Die IL-1ß induzierte IL-6 Sekretion der St-T1 Zellen wurde unter Verwendung eines ELISA bestimmt.

Die Zellkulturen wurden mit dem inhibitorischen IL-1ra 172 ng/ml über 2 Stunden präinkubiert und anschließend mit IL-1ß, Arbeitskonzentration 10ng/ml, über 0 bis 96 Stunden inkubiert. Vor der Durchführung der Hauptversuchsreihe erfolgten zahlreiche Vorversuche zur Konzentrationsfindung des verwendeten Rezeptorantagonisten, sowie der intrazellulären Inhibitoren. Die Versuche wurden stets mit 3 biologischen Proben durchgeführt. Die technische Durchführung erfolgte 1-2 mal.

Die quantitative Bestimmung der gewonnenen Proteine aus den Überständen der ES-Zellkulturen erfolgte mittels Sandwich-ELISA, einem zur Gruppe der Immunassay-Verfahren gehörendem Nachweisprinzip (Engvall und Perlman, 1971; Mosmann und Fong, 1989). Die Methode basiert auf der Bindung zweier spezifischer AK an das korrespondierende Antigen. Hierbei haben die AK jeweils andere Bindungsstellen um sich nicht gegenseitig zu behindern. Ein monoklonaler IL-6-spezifischer AK (coating-AK) ist auf eine 96 well-Mikrotiterplatte gebunden. Nach Zugabe des Substrates von 100 µg (nach Angabe des Herstellers) und dem definierten Zellkulturüberstand der ES-Kulturen mit dem nachzuweisenden Antigen erfolgt die Bindung des Antigens an den coating-AK. Im nächsten Schritt erfolgt das Auswaschen aller ungebundenen Substanzen. Nach Zugabe des zweiten AK (= Detektions- oder capture-AK) bindet dieser nun an ein anderes Epitop des zu detektierenden Antigens. Es ist so ein AK-Antigen-AK-Komplex (Sandwich) entstanden. In einem zweiten Waschgang werden nun die überzähligen Detektions-AK entfernt. Es folgt die Zugabe eines chromogenen Substrates, welches mit dem an den Detektions-AK gebundenem Enzym HRP (Meerrettich-Peroxydase) reagiert. Diese Reaktion wird durch eine Färbung sichtbar, deren Intensität proportional zur Menge des initial gebunden IL-6 steht. Die Farbentwicklung wird durch Messung der Absorption bei 450 nm ausgewertet.

4.2.3.3 Western Blot-Analyse von ß-Aktin, JNK, AKT, ERK

Zum Nachweis der Signalkaskaden-Proteine ERK, AKT und JNK wurden die getrennten Proteinbanden mittels eines gerichteten elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen. 30µg Protein wurde jeweils auf die PVDF-Membran (Merck Millipore) übertragen. Die Membran war mit 5% fettfreier Milch geblockt und dann mit spezifischen Antikörpern gegen AKT (9542), pAKT (4060), JNK (9258), pJNK (4668) im Verhältnis 1:1000 und ß-Aktin bei 4°C über Nacht und im Anschluss mit Ziegen-anti-Kaninchen oder Ziegen-anti-Maus HRP 1:2000 über eine Stunde inkubiert. Die Signale wurden mittels Clarity Western ECL Substrat ermittelt und mit dem ChemiDocImaging System und der korrespondierenden Image Lab software analysiert. Alle Western blots erfolgten in 3-facher Ausführung.

5 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Einfluss von IL-1ß auf die IL-6 Signaltransduktion und Sekretion in ES.

Die Umsetzung der Arbeit erfolgte mittels Kulturen humaner ES der Zelllinie St-T1, welche von der Arbeitsgruppe um Brosens et al. (Brosens *et al.*, 1998) erfolgreich etabliert und verwendet wurde.

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Bielfeld und Frau Dr. Baston-Büst (Hess *et al.*, 2007; Baston-Büst *et al.*, 2013) zu der zytokingesteuerten Regulation im weiblichen Reproduktionstrakt zeichnete sich bereits im Vorfeld eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der durch die embryonale IL-1ß stimulierten endometrialen IL-6 Sekretion in dezidualisierten ES ab. Daraus resultierten die Fragen, ob das embryonale Produkt IL-1ß auch nicht-dezidualierte ES zur IL-6 Sekretion anregt und welche Signalproteine an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten

5.1 Versuchsmodell der humanen endometrialen Stromazellen

Konfluente Kulturen von ES dienten als *in vitro* Modell für die *in vivo* Verhältnisse nicht-dezidualisierter ES und wurden über verschiedene Zeiträume und mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1ß stimuliert. Zur Verifizierung intakter und aktiver Zellstände erfolgte im Vorfeld der Nachweis von ß-Aktin als Housekeeping Gen einer gesunden Zelle (Abb. 2). Im weiterführenden Versuch wurden lediglich die in der PCR ß-Aktin-mRNA positiven Proben weiter genutzt.

Probe Nr.:





Abb. 2: PCR des Housekeeping Gens &-Aktin in ES. Repräsentatives Ergebnis der &-Aktin PCR. Die Expression einer intakten cDNA von &-Aktin (407bp) war konstant in allen genutzten Proben der nachfolgenden Versuche. Banden: (0) Marker, (1) dH₂0 als Negativkontrolle, (2) RT-H₂0-als Negativkontrolle, (3-17) &-Aktin.

5.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau gliederte sich in 3 Abschnitte. Die Grundlagen basieren auf den Forschungsergebnissen der hiesigen Arbeitsgruppe. Aus den Arbeiten von Frau Prof. Dr. Bielfeld und Frau Dr. Baston-Büst über die parakrinen Signale des Trophoblasten sowie die dES ergaben sich einige der vorausgesetzten Konzentrationen und Zeitintervalle basierend auf den zuvor ermittelten Werten.

5.2.1 Expression und Sekretion von IL-6: Konzentrations- und Inkubationsdaueroptima von IL-1ß

Ziel des ersten Teils des Versuchsaufbaus war die Bestimmung der optimalen Konzentrations- und Inkubationszeit von ES mit IL-1ß, welche nötig ist um eine signifikante Hochregulation von IL-6 zu induzieren. Hierbei wurden die Proben mit IL-1ß Konzentrationen von 0,001-10 ng/ml über 0, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Std. inkubiert. Das daraus resultierende Konzentrations- und Inkubationsdaueroptimum von IL-1ß diente dann als Grundlage der nachfolgenden Versuche.

5.2.2 Inhibition der IL-1ß vermittelten Expression von IL-6 durch IL-1ra

Dieser Teil des Versuchs beschäftigte sich mit der extrazellulären inhibitorischen Wirkung des IL-1ra, welcher in Konkurrenz zum korrespondierenden Rezeptor IL-1RI mit II-1ß steht. Die Proben wurden mit IL-1ra für 2h bei 37°C vorinkubiert und anschließend in Zeitintervallen von 0, 6, 12, 24, 48, 72 und 96h mit IL-1ß mit einer Arbeitskonzentration von 10 ng/ml (im Vorversuch ermitteltes Konzentrationsoptimum) inkubiert. Ziel war es herauszufinden, ob die Inhibition durch Zugabe des IL-1ra zeit-und dosisabhängig ist. Die mit IL-1ß inkubierten Gruppen wurden Kontrollen ohne IL-1ß Zugabe gegenübergestellt.

5.2.3 Signalproteine des IL-1ß induzierten Signalweges

IL-1ß induzierte Signalwege können über verschiedene Signalproteine translatiert werden. Zur näheren Bestimmung wurden ERK, AKT und JNK als vorbeschriebene Signalmoleküle auf ihre Aktivität untersucht. Hierbei sollten mittels Western blot die phosphorylierten Formen von ERK, AKT und JNK bestimmt werden.

5.3 IL-1ß induzierte IL-6-mRNA Expression und IL-6 Sekretion

Zur Ermittlung welche IL-1ß Konzentration und Expositionsdauer die IL-6 Expression am stärksten stimuliert, wurden die ß-Aktin-mRNA positiven Zellen mit einem Konzentrationsspektrum von 0,001 bis 10 ng/ml für 24 und 48 Stunden inkubiert. Nach Aufreinigung von mRNA und Protein erfolgte die Untersuchung mittels RT-PCR. Im ELISA wurde die IL-6 Konzentration in den Überständen bestimmt.

5.3.1 PCR – IL-6-mRNA Expression nach IL-1ß Inkubation

Nach RNA-Isolation und anschließender reverser Transkription erfolgte mittels PCR der Nachweis von IL-6-mRNA als Produkt der Transkription im Zytosol.

In der zur quantitativen Verifizierung durchgeführten Densitometrie zeigt sich bei allen Konzentrationen einschließlich der Kontrolle sowohl zum 24- als auch zum 48-Stunden Zeitpunkt eine nachweisbare IL-6 Sekretion (Abb. 3).



Abb. 3: PCR-Ergebnis IL-1ß Zeit- und Dosisfindung zur Induktion von IL-6 in nicht-dezidualisierten ES. Banden: (0) Marker, (1) dH20 als Negativkontrolle; (2-7) 24h Inkubationsdauer, IL1ß Konzentrationen (links nach rechts) über 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 ng/ml; (0) Marker; (8-13) 48h Inkubationsdauer, IL1-ß Konzentrationen (links nach rechts) über 0, 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 ng/ml.

5.3.2 ELISA - IL-6 Protein im Zellüberstand nach IL-1ß Inkubation

Zur weiteren Bestimmung der IL-1ß induzierten IL-6 Produktion erfolgte zur Ermittlung der idealen Konzentration und Inkubationsdauer der maximalen IL-6 Sekretion die Bestimmung des IL-6 Proteins im Überstand der Zellkultur.

Die in der PCR ermittelte IL-6-mRNA Expression ließ sich auch auf Proteinebene mittels ELISA reproduzieren. Die Überstände der endometrialen Stromazellkulturen wurden nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 ng/ml IL-1ß mittels ELISA-Analyse untersucht. Die Sekretion von IL- 6 nahm in Abhängigkeit der Konzentration und Dauer zu. Hierbei lag das intensivste und statistisch signifikante Signal im 24-Stunden Versuch bei 10 ng/ml. (Abb. 4).



Abb.4: ELISA-Ergebnis der konzentrationsabhängigen IL-1ß [0-10ng/ml] induzierten IL-6 [pg/ml] Sekretion. Die Konzentration von 10 ng/ml ergab in der 24-stündigen als auch in der 48-stündigen Inkubationsdauer eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-6 (p<0,05).

5.4 Signalkaskaden von IL-1ß modulieren die IL-6 Expression in nichtdezidualisierten ES

Nach Verifizierung, dass IL-1ß als embryonales Signal die IL-6 Expression und Sekretion in nicht-dezidualisierten ES bewirkt, stand im nächsten Abschnitt der Versuche die Frage nach der möglichen extra- und intrazellulären Signalübertragung.

5.4.1 IL-1ß induzierte Signalvermittlung und Inhibition in nicht-dezidualisierten ES

Zur Kontrolle der Signalübertragung erfolgte der Inkubationsansatz mit IL-1ra.

5.4.1.1 IL-6-mRNA Expression nach Inhibition des IL-1-Rezeptors

Die Zellkulturen wurden mit dem IL-1ra inkubiert. IL-1ra konkurriert mit IL-1ß um den Bindungsplatz am IL-1Rezeptor Typ 1. Die Proben wurden mit einem von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bielfeld und Dr. Baston-Büst zuvor ermittel-



ten IL-1ra-Konzentrationsoptimum von 172 ng/ml über 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Im ELISA (Abb.5) zeigte die Expression keine signifikante Änderung.

5.4.2 Western blot-Analyse der phosphorylierten Proteine des MAP-Kinase-Signalweges in nicht-dezidualisierten ES

Die Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges durch IL-1ß als eines der induzierenden Zytokine wurde bereits im Vorfeld angesprochen. Zur Bestimmung dieses Signalweiterleitungssystems erfolgte die Inkubation der ES für 0 – 30 min. In Western blot-Analysen wurden die Lysate der Zellkulturen dann mittels spezifischer AK auf die phophorylierten und nichtphosphorylierten Formen von AKT, ERK und JNK untersucht. Diese Proteine sind an dem intrazellulären Signalübertragungsweg eines Zytokin-vermittelten Signals zur Transkription beteiligt (Young-June *et al.*, 2012).

Das im Zytoplasma lokalisierte AKT-Protein ergab in der Western blot-Analyse keinen statistisch signifikanten Anstieg der phosphorylierten und somit aktivierten Form (Abb.6) nach einer Inkubationszeit von 0, 2, 5, 10, 15 und 30 min. mit 10 ng/ml IL-1ß.

Abb.5: ELISA-Ergebnis der IL-1ß induzierten IL-6 Sekretion in den Überständen der ES nach zweistündiger Vorinkubation mit IL-1ra.



Abb.6: Quantifizierung von pAKT in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß der pAKT/AKT Ratio nicht-dezidualisierter ES nach Inkubation mit 10 ng/ml IL-1ß mit über 1, 2, 5, 10, 15, 30 min. (von links nach rechts). Eine signifikante Phophorylierungsrate ergab sich nicht. Versuchsreihe in dreifacher Ausführung. Die Verhältnisberechnung erfolgte aus dem Mittelwert.

Anschließend wurde die Aktivierung von JNK analysiert. Unter einer Inkubationzeit von wiederum 0, 2, 5, 10, 15 und 30 min. mit 10 ng/ml IL-1ß ließ sich mittels Western blot ein statistisch signifikanter Anstieg des phosphorylierten JNK–Proteins ermitteln (Abb.7A, 7B). Somit stimulierte IL-1ß den JNK-Signalweg in nicht-dezidualisierten ES.



Abb. 7A: JNK in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. 1): Repräsentativer Blot von JNK in nicht-dezidualisierten ES nach Inkubation mit IL-1ß mit 10ng/ml über 1, 2, 5, 10, 15, 30 min. (von links nach rechts). 2): pJNK in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. 3): ß-Aktin-Kontrolle in nicht-dezidualisierten ES.



Abb.7B: Quantifizierung von pJNK in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. Versuchsreihe in dreifacher Ausführung. Die Verhältnisberechnung erfolgte aus dem Mittelwert.

Das Ergebnis der Western blot-Analyse erbrachte einen Anstieg des phosphorylierten ERK. Nach den genannten Inkubationszeiten von 0 - 30 min. mit 10ng/ml IL-1ß (Abb.9) zeichnete sich im Bereich über 2 und 5 min. eine statistisch nicht signifikante aber numerisch erhöhte Phosphorylierungsrate ab.



Abb.8: Aktivierungsgrad des Signalmoleküls ERK nach Inkubation nicht-dezidualisierter ES mit IL-1ß. Versuchsreihe in dreifacher Ausführung. Die Verhältnisberechnung erfolgte aus dem Mittelwert.

In der Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe zeigte sich, dass im komplexen Netzwerk der MAP-Kinasen in nicht-dezidualisierten ES das IL-1ß vermittelte Signal über die Aktivierung von JNK übertragen wird (Abb.8). Die Aktivierung von ERK zeigte nach 2- und 5-minütiger Inkubation mit IL-1ß eine erhöhte Phoshorylierungsrate. Hinweise für eine Signalübertragung über AKT ergaben sich nicht.

6 Diskussion

Das humane Endometrium ist die Schnittstelle eines komplexen Zytokin-vermittelten embryo-maternalen Dialoges. Es unterliegt zyklischen Veränderungen, die dem Ziel einer embryonalen Implantation dienen.

IL-1ß ist eines der wirkenden Zytokine. Es ein pro-inflammtorisches Zytokin, welches neben der inflammtorischen Regulation auch am komplexen Prozess der embryo-maternalen Schnittstelle beteiligt ist (Hermann-Lavoie *et al.*, 2007). IL-1 wird von vielen Zellarten, wie zum Beispiel den Fibroblasten, den Keratinozyten, den glatten Muskelzellen, dem Endometrium und auch der Dezidua produziert (Mizel, 1989; Tabibzadeh, 1991; Romero *et al.*, 1989). Seine Wirkung ist auch außerhalb des Entzündungsprozesses, wie zum Beispiel der Modulation der Hormonexpression und Differenzierung anzusiedeln (Masuhiro *et al.*, 1991; Steele *et al.*, 1992). Seine proinflammatorische Wirkung hat Einfluss auf die immune Zellinvasion, die Angiogenese, das Zellwachstum und das Geweberemodeling (Krüssel *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Auch ein Embryo sezerniert als eines seiner ersten Produkte IL-1ß (Krüssel *et al.*, 1998).

Auch IL-6 wurde als ein proinflammorisches Zytokin im Zusammenhang endometrialer Expression vorbeschrieben. IL-6 ist ein Zytokin, welches durch Zellen des Immunsystems, aber auch durch Zellen, die nicht dem Immunsystem zugeordnet werden exprimiert. Hierzu zählen auch Endothelzellen, Fibroblasten und Keratozyten (Wolvekamp, Marquet, 1990).

Die IL-6 Expression im Endometrium unterliegt zyklischen Veränderungen. Während des angenommenen Implantationsfensters zwischen dem 21.-23. Zyklustag beginnt der kontinuierliche Anstieg im Menstruationszyklus (Tabibzadeh *et al.*, 1995). Eine durch Steroidhormone regulierte IL-6 Sekretion wurde laut Bücking in der Literatur als widersprüchlich beschrieben. So zeigte sich einerseits keine signifikante Änderung der endometrialen IL-6 Konzentration, andererseits deren Abfall (Bücking, 2003). Dies legt die Überlegung nahe, dass lokale Regulationsmechanismen mittels Zytokinexpression eine parakrine Modulation um den Zeitraum des Implantationsfensters im Uterus bewirken könnten. Eine Dysregulation der IL-6 Expression wurde im Zusammenhang mit vermehrten Fehlgeburten beschrieben (von Wolff *et al.*, 2002). Bei vorzeitiger Wehentätigkeit und Frühgeburtlichkeit wurden erhöhte IL-6 Spiegel in der Amnionflüssigkeit gemessen (Montes *et al.*, 1995).

Die lokale Regulation der immunologischen Ebene um den Implantationszeitpunkt ist Gegenstand zahlreicher Forschungen. Hierbei ist die Grundlage meist das dezidualisierte Endometrium als das repräsentative physiologische und essentielle Stadium des Uterus im Zeitraum des Implantationsfensters. Teklenburg *et al.* beschrieben, dass humane ES ab dem Zeitpunkt der Dezidualisierung sensibel auf die embryonalen Signale reagieren (Teklenburg *et al.*, 2010).

Die Dezidua produziert ein lokales Milieu von Zytokinen, das die Trophoblast-Anhaftung fördert und andererseits begrenzt sie die aggressive Invasion (Fazleabas *et al.*, 2004).

Die deziduale Sekretion enthält eine hohe Anzahl pro-invaser Faktoren wie zum Beispiel IL-1ß, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-13, IL-15, Eotaxin CCI11, IP-10 und RANTES und anti-invasive Faktoren wie IL-10, IL-12. Es scheint, dass deziduale Faktoren die Invasion, aber zur gleichen Zeit auch anti-invasive Faktoren beeinflussen (Sharma *et al.*, 2016.) Im Gegensatz zu vielen anderen Säugetieren bedarf die Dezidualisierung humaner ES nicht der Anwesenheit eines Embryos, sondern wird durch den postovulatorischen Anstieg des Progesteronspiegels gesteuert. Es gibt Hinweise, dass das Konzept der maternal kontrollierten Dezidualisierung auf die individuellen Embryonen eingeht, indem es die weiterführende Implantation und Entwicklung oder die frühzeitige Abstoßung induziert (Gellersen *et al.*, 2014).

Diesbezüglich stellt sich die Frage, welchen Einfluss eine inadäquate oder ausbleibende Dezidualisierung auf die Implantation hat und wie kompetent teil-dezidualisierte oder nicht-dezidualisierte ES noch am immunologischen Dialog und an der Selektion der Embryonen teilnehmen können. Daher wurden in dieser Arbeit nicht-dezidualisierte Stromazellen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Kenntnis, dass das embryonale Produkt IL-1ß auch bei nicht-dezidualisierten ES die IL-6 Transkription und Sekretion stimuliert. Im Zellkulturmodell wurde IL-6 auf mRNA- und Proteinebene nach einem IL-1ß Stimulus in der Zellkultur nachgewiesen. Jedoch waren im Vergleich zu dezidualisierten Zellen deutlich höhere Konzentrationen an IL-1ß nötig um einen signifikanten IL-6 Anstieg zu erreichen. In der Gegenüberstellung ist das Ansprechen nicht-dezidualisierter Zellen auf die IL-1ß Exposition gegenüber dezidualisierter ES deutlich geringer. Dies spricht für eine Sensibilisierung mütterlicher Zellen im Rahmen der Dezidualisierung als Vorbereitung auf eine adäquate embryonale Implantation.

6.1 IL-1ß induzierte IL-6-mRNA Expression und IL-6 Sekretion in nicht dezidualisierten ES

IL-6 ist ein durch IL-1ß reguliertes immunmodulatorisches Zytokin. IL-6 ist Teil der IL-6 Familie. Die IL-6-Expression und –Sekretion wurde als zeit- und konzentrationsabhängig für verschiedene Organsysteme wie z. B. dem Blutzellsystem, der Leber oder dem Darmtrakt beschrieben (Chung *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 1994; Tosato und Jones, 1990).

IL-1 wurde auch als Induktor der IL-6 Produktion auf mRNA- und Proteinebene im Endometrium beschrieben (Tabibzadeh, 1991; Laird *et al.*, 1994), wobei die IL-1 stimulierten IL-6 Konzentrationen in Abhängigkeit der Zyklusphase variierten (Laird *et al.*, 1993). Somit ist von einem zeitlichen Zusammenhang der IL-1ß beeinflussten IL-6 Produktion während der uterinen Vorbereitung auf eine optimale Rezeptivität gegenüber dem Embryo auszugehen.

Die Dezidualisierung beginnt mit dem Progesteronanstieg im weiblichen Zyklus nach der Ovulation und bedeutet eine charakteristische Differenzierung mit morphologischen und funktionellen Veränderungen der endometrialen Stromazellen (Leidenberger *et al.*, 2014). Die Veränderungen sind so spezifisch und zeitlich definiert, dass einen bekannten Ovulationstermin vorausgesetzt, sie zu einer genauen Bewertung der endometrialen Reifung herangezogen werden können (Noyes und Haman, 1953).

Im Falle einer nicht regelrechten Dezidualisierung und Differenzierung der ES ist ein gestörter embryo-maternaler Dialog denkbar. In dieser Untersuchung lag die nötige IL-1ß Konzentration zur Hochregulation der IL-6 Expression bei nicht-dezidualisierten ES deutlich höher als bei dezidualisierten ES. Trifft das embryonale Signal IL-1ß also auf ein nicht adäquat dezidualisiertes ES, so könnte die Konzentration des IL-1ß, trotz physiologisch regelrechter Kon-

zentration, nicht ausreichend sein, um eine suffiziente Antwort der ES auf Zytokinebene zu bewirken. Dies hätte möglicherweise eine konsekutiv verminderte IL-6 Expression zur Folge. Eine Dysregulation der IL-6 Konzentrationen kann zum Implantations- und damit Schwangerschaftsversagen führen. Die verminderte IL-6 Expression im Endometrium war bei Frauen mit erhöhter Abortrate beobachtet worden. Ebenso trug ein insuffizienter lokaler IL-6 Spiegel zum Verlust der Schwangerschaft bei (Prins *et al.*, 2012).

Dass eine grundlegende IL-6 Expression notwendig ist, kann aus der beobachteten basalen IL-6 Expression hergeleitet werden. Im Versuch war bereits in der 0-Probe ein IL-6 Nachweis zu beobachten. Somit bestand in nicht-dezidualisierten ES in der lokalen Homöostase eine IL-6 Expression. Da diese in Abwesenheit eines embryonalen Signals zu messen war, können verschiedene Regelkreise der IL-6 Expression diskutiert werden. Einer, welcher das lokale Milieu unabhängig von einer Schwangerschaft moduliert und ein anderer, als Teil der Regulation während der embryonalen Implantation. Somit erscheinen verschiedene Signaltransduktionswege möglich, welche zum einen durch systemische Steroidhormone induziert werden können, zum anderen durch lokale Mediatoren. Da in diesem Versuch keine Exposition der nicht-dezidualisierten Zellen mit einem Steroidhormon bestand, ist die gemessene basale IL-6 Expression der nicht-dezidualisierten ES in dem hier erfolgten *in vitro* Modell Steroid unabhängig.

Auch ist von undulierenden basalen Raten einer uterinen IL-6 Produktion auszugehen. Diese war in ES in der Proliferationsphase höher, als in ES in der sekretorischen Phase. Auch bestand in Abhängigkeit der Phase eine dosisabhängige Erhöhung der IL-1 induzierten IL-6 Produktion in proliferativen und sekretorischen ES, wobei die sekretorischen ES auf niedrigere IL-1 Konzentrationen als die proliferativen antworteten (Laird *et al.*, 1994). Die Empfindlichkeit der ES auf ein embryonales Signal ist somit nicht nur mit den Veränderungen durch eine Dezidualisierung zu diskutieren, sondern auch in Relation mit den vorangegangenen zyklischen Veränderungen der ES zu setzen.

Weiterhin war in eutopen ES des Uterus von Frauen mit Endometriose eine höhere IL-6 Sekretion, als bei Frauen ohne Endometriose gemessen worden (Tseng *et al.*, 1996). Das bedeutet dass neben zyklischen Dysregulationen und einer fehlerhaften Dezidualisierung auch eine inflammatorische Grunder-

krankung, wie die Endometriose, Hinweise auf eine pathologogische uterine Zytokinlandschaft geben könnte.

6.1.1 IL-6-mRNA Expression nach IL-1ß Inkubation

IL-6-mRNA wurde als endometriales Produkt der Transkription im Zytosol nachgewiesen. Es zeigte sich bei allen Konzentrationen der Versuche eine IL-6 Expression. Somit bestand laut dem Ergebnis eine basale IL-6 Expression in nicht-dezidualisierten ES. Wie oben beschrieben ist im Gegensatz zu dezidualisierten ES bei nicht-dezidualisierten ES eine deutlich höhere IL-1ß Konzentration nötig, um die IL-6-mRNA Synthese zu stimulieren. Nach Präinkubation mit IL-1ra und anschließender Inkubation mit IL-1ß blieb die Steigerung der Expression der ES von IL-6-mRNA im Vergleich zur Versuchsreihe ohne die IL-1ra Präinkubation, wo die Konzentration von 10ng/ml zu einer Steigerung der Sekretion um das dreifache geführt hatte, aus. Somit könnte der Dezidualisierungsprozeß eine Hochregulierung des IL-1R bewirken, da die dezidualisierten ES sensitiver bereits auf eine Konzentration von 0,1 ng/ml IL-1ß antworteten (Baston-Büst *et al.*, 2013).

Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine nicht adäquate Dezidualisierung für eine zukünftige Schwangerschaft hat. Endokrine, parakrine und autokrine Vorgänge verwalten engmaschig die Differenzierung der Dezidua (Gellersen *et al.*, 2014). Eine beeinträchtigte zyklische Dezidualisierung stört die embryo-maternale Interaktion. Folgen können rezidivierende Verluste der Schwangerschaft sein (Salker *et al.*, 2010). Möglich wäre dann eine konsekutiv erniedrigte Expression des IL-1 Rezeptors bei nicht-dezidualisierten ES. Ebenso ist eine anders gelagerte Signalwegstransduktion als Ursache für die verminderte IL-1ß Sensibilität denkbar. Somit ist eine Differenz der Rezeptorund Signalwegsinduktion zwischen dezidualisierten und nicht-dezidualisierten ES als Konsequenz des Dezidualisierungsprozesses zu diskutieren.

Eine verringerte Sensibilität nicht-dezidualisierter ES auf den IL-1ß Stimulus lässt auf eine veränderte Immunantwort im embryo-maternalen Dialog schließen. Dem zufolge könnte die Implantation insuffizient erfolgen oder die kritische Rezeptivität und Selektivität des ES bezüglich eines abnormalen Embryos herabsetzt sein. Es gibt Hinweise, dass die Dezidua dem Embryo gegenüber selektive Kompetenz hat. Der Dezidualisierungsprozess untermauert die endometriale Rezeptivität, die Selektion des Embryos und Entwicklung der Schwangerschaft (Gellersen *et al*, 2014). Auch konnte gezeigt werden, dass auf der anderen Seite ein kompetenter Präimplantationsembryo die Fähigkeit hat, die uterine Umgebung aktiv zu verbessern (Brosens *et al.*, 2013).

6.1.2 IL-6 Protein im Zellkulturüberstand nach IL-1ß Inkubation

IL-6 gilt als ein maßgeblich beteiligtes Zytokin im embryo-maternalen Dialog. Der Nachweis von IL-6 auf Proteinebene im Überstand korrelierte mit den in der PCR ermittelten Daten. Es fand sich eine basale IL-6 Konzentration bereits in der 0-Probe. Ab einer Konzentration von 10 ng/ml ergab sich eine Dynamik mit einem deutlichen Anstieg des IL-6-Transkriptes nach 24-stündiger Inkubation. Während einer 48-stündigen Inkubationszeit zeigte sich ab einer IL-1ß Konzentration von 1ng/ml ein Anstieg des IL-6-Konzentration, wobei auch im 48 Stunden Versuch die deutlichste IL-6 Konzentration unter Inkubation mit 10 ng/ml IL-1ß lag. Somit ist die Induktion der basalen IL-6 Konzentration nicht zuzuordnen, da die Zellen im *in vitro* Versuch keinem anderen Substrat außer den genannten exponiert waren. Auf lokaler Ebene wird die IL-1ß induzierte IL-6 Stimulation auf parakriner Ebene durch den Embryo in Zeitund Dosisabhängigkeit beeinflusst.

IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Implantationsphase. IL-6 Spiegel sind in der follikulären Phase relativ niedrig und während der Implantationsphase am höchsten. IL-6 wird über IL-1ß und Steroidhormone (insbesondere Östrogen) reguliert (Tabibzadeh *et al.*, 1995; von Wolff *et al.*, 2002). Das Zytokinprofil der embryo-maternalen Schnittstelle moduliert den Implantationsprozess. Die Invasion des extravillösen Trophoblasten und das Remodelling der Spiralarterien wird durch deziduale Faktoren beeinflusst. IL-6 ist ein potentes pro-angiogenetisches Zytokin im Milieu dezidualisierter ES (Nilsson *et al.*, 2005; Pitman *et al.*, 2012). Im Mausmodell wurden erhöhte utero-plazentare IL-6 Konzentrationen mit einem fetalen Verlust assoziiert (Zenclussen *et al.*, 2003). Eine veränderte IL-6 Sekretion wurde in vielen Schwangerschaftskomplikationen wie z.B. Unfruchtbarkeit, Pre-Eklampsie und Frühgeburtlichkeit beobachtet (Prins *et al.*, 2012). Eine zu diskutierende Bedeutung ist somit die Auswirkung einer adäquaten Dezidualisierung auf die lokale IL-6 Synthese.

In der Arbeit von Blistek *et al.* 2012 ergab sich im uterinen Gewebe von Schweinen, dass der Nachweis einer vermehrten IL-6-mRNA nicht zwangsläufig mit einem erhöhten IL-6 Proteinniveau einhergeht. Somit ist es möglich, dass posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der mRNA zu einer erniedrigten Proteinsynthese führen.

Im Vergleich zu dezidualisierten Zellen (Baston-Büst *et al.*, 2010; Issa *et al.*, 2006) bedurfte es bei den Kulturen nicht-dezidualisierter ES in dieser Arbeit einer deutlich höheren Expositionskonzentration von IL-1ß, um eine nachweisbare Dynamik der IL-6 Sekretion zu erreichen. Das lässt auf eine verminderte Signalübertragung in nicht-dezidualisierten ES schließen. Die Dezidualiserung könnte eine Steigerung der Rezeptivität und Effektivität der Signalkaskaden auf die embryonalen Signale wie z. B. IL-1ß bedeuten, wobei sich die Expression spezifischer Rezeptoren, als auch intrazelluläre Spektrum der Signalproteine verändern könnte. Die lokale Zytokinregulation würde sich dementsprechend im Rahmen einer Dezidualisierung verändern.

Auch im Kokultur-Modell von Blastozysten und epithelialen endometrialen Zellen war im Kulturmedium nach entsprechender Inkubationsdauer, IL-6 nachweisbar. Im Vergleich zu Blastozysten mit frustranen Implantationsversuchen waren die IL-6 Konzentrationen in der Gruppe erfolgreich implantierter Blastozysten dann erniedrigt (Dominguez *et al.*, 2008). IL-6 scheint daher sowohl eine erfolgreiche Entwicklung als auch Implantation des Embryos zu fördern.

Erhöhte IL-6 Spiegel können jedoch auch die Implantation einer Schwangerschaft an unphysiologischer Lokalisation wie z. B. bei der Tubargravidität begünstigen. So war bei Frauen mit ektoper Schwangerschaft eine signifikant erhöhte Infektionsrate mit Chlamydia trachomatis und oder Mycoplasma genitalis nachgewiesen worden. In Korrelation bestand eine erhöhte tubare Expression von IL-6, LIF und ihrer Signalmoleküle (Refaat *et al.*, 2016). Auch bei ektoper Schwangerschaft mit Nachweis einer Cytomegalievirus-Infektion ergab sich eine Hochregulation der IL-6 Expression (Ashshi, 2016).

Welche Rolle die erhöhte die IL-6 Expression als Teil einer Inflammationsreaktion im Rahmen eines infektiösen Geschehens oder als Teil eines immunologischen Dialoges zwischen dem Embryo und dem Tubarepithel zum Zwecke der Implantion hat, bleibt offen. In beiden Fällen ist ein zentraler Einfluss von IL-6 an dieser Schnittstelle zu vermuten.

6.2 Signalwege des IL-1ß in nicht-dezidualisierten Stromazellen

IL-1ß induziert als embryonales Signal auch in nicht-dezidualisierten ES die IL-6 Expression und Sekretion. Die nötige IL-1ß Konzentration war hierbei hundertfach höher als bei dezidualisierten ES (Baston-Büst et al., 2010; Issa et al., 2006). Gründe für die geringere Sensibilität der ES auf das embryonale Signal könnten Veränderungen auf Rezeptor-Ebene, aber auch auf Ebene der intrazellulären Signalkaskaden sein. Der Dezidualisierungsprozess bedeutet für die Zellen morphologische aber auch biochemische Veränderungen, mit denen eine veränderte Zellfunktion einhergeht. Die Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Enzymen ändert sich, aber auch die Expression von Rezeptoren und dezidua-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Gellersen und Brosens, 2003). Ziel der Dezidualisierung ist die optimale Vorbereitung auf die Implantation des Embryos. Im embryo-maternalen Dialog bedeutet es während des Implantationsfensters und darüber hinaus Bedingungen für eine schnelle, suffiziente und effektive Kommunikation zu schaffen. Dies könnte mittels einer erhöhten Rezeptordichte und oder einer vermehrten Aktivierung bzw. gezielten Steuerung intrazellulärer Signalkaskaden erreicht werden.

Die zyklische Dezidualisierung als Differenzierungsprozess im Zusammenhang mit der Menstruation kann auch eine Strategie zur Früherkennung einer embryonalen Fehlentwicklung und dessen Abstoßung bedeuten. Es konnte gezeigt werden, dass dezidualisierte Zellen eine besondere polarisierte transkriptionale Antwort auf die embryonalen Signale aufbauen, welche diskret im Falle eines kompetenten Embryos, bis extensiv und komplex in Anwesenheit eines qualitativ verminderten Embryos waren (Brosens *et al.*, 2013). Eine unzureichende Dezidualisierung kann somit in Anwesenheit eines gesunden Embryos zu einer insuffizienten endometrialen Rezeptivität führen, oder ein pathologisch veränderter Embryo erhält dennoch eine uneingeschränkte Einnistung im mütterlichen Gewebe.

Die Dezidualisierung bedeutet die Vorbereitung des ES auf den allogenen Embryo. Es ist ein terminaler Differenzierungsprozess, der die Morphologie und Funktion der Zelle an ihre neuen Aufgaben an der embryo-maternalen Schnittstelle zeitlich adäquat anpasst und unter anderem durch Progesteron induziert wird (Gellersen *et al.*, 2007). Eine effiziente Dezidualisierung erlaubt dem mütterlichen Gewebe die Regulierung der Trophoblasteninvasion, inflammatorischem und oxidativem Stress standzuhalten und die lokale maternale Immunantwort zu dämpfen (Gellersen *et al.*, 2007). Die Differenzierung bewirkte ein verändertes Zytokinspektrum, welches unter anderem zur Rekrutierung natürlicher Killerzellen (uNK-Zelle) führte, welche wiederum, entgegen ihrer zerstörerischen Funktion in der systemischen Immunabwehr, nun anstatt Zellgiften wichtige Zytokine zum Erhalt der Schwangerschaft produzierten. (Gellersen B *et al.*, 2007).

Neben einer adäquaten Dezidualisierung ist jedoch auch dessen zeitliche Synchronizität mit dem Embryo wichtig für einen erfolgreichen embryo-maternalen Dialog. Die embryonale Reife und die endometriale Entwicklung sind zwei unterschiedliche Prozesse, welche sich beide zum Zeitpunkt einer möglichen Implantation in einem entsprechender Entwicklungsniveau befinden müssen. Es gibt Hinweise, dass die Implantationsrate im Falle einer embryoendometrialen Asynchronizität von mehr als 3 Tagen (+/-1,5 Tage) signifikant sinkt (Teh *et al.*, 2016).

6.2.1 IL-1ß induzierte Signalvermittlung und Inhibition in nicht-dezidualisierten ES

Der signifikant führende Signalweg in der Signalkaskade der IL-1ß induzierten IL-6 Expression war in dieser Studie über JNK. Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung des Proteins nach Stimulation der nicht-dezidualisierten ES mit dem embryonalen Substrat IL-1ß. Eine signifikante Aktivierung von ERK und AKT konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Ist physiologisch eine Dezidualisierung nicht ausgereift oder erfolgt, bedeutet das einen veränderten embryo-maternalen Dialog. Die Regulationsmechanismen einiger Funktionen und die des Embryos können gestört werden. Es ist anzunehmen, dass die gemeinsame Kommunikation über lokale Zytokine insuffizient bleibt, weil sich das Profil von Zytokinen und genutzten Signalwegen nicht ausdifferenzieren konnte. Eine Gegenüberstellung der hier untersuchten Signalübermittlung in nicht-dezidualisierten ES über ERK, AKT und JNK zu der von dES könnte weitere Aufschlüsse erbringen.

6.2.1.1 IL-6-mRNA Expression nach Inhibition des IL-1-Rezeptors

Als Kontrollversuch wurden die Zellkulturen mit IL-1ra inkubiert. IL-1ra konkurriert mit IL-1ß um den Bindungsplatz am IL-1Rezeptor Typ 1. In der anschließenden RT-PCR-Analyse zeigten sich keine zeit- oder dosisabhängigen Veränderungen der IL-6-mRNA Synthese nach Inkubation mit IL-1ra, sondern lediglich eine Basalexpression von IL-6. IL-1ra unterbindet somit effektiv die IL-1ß Wirkung an dem korrespondieren Rezeptor und die intrazelluläre Signalfortführung. Das Ergebnis der Expression von IL-6 auf mRNA-Ebene korreliert mit dem der Proteinsekretion in den Zellkulturüberständen.

6.2.2 Western blot-Analyse der phosphorylierten Proteine des MAP-Kinasen-Signalweges in nicht-dezidualisierten ES

In den Western blot-Analysen wurden die Signalmoleküle, welche am Transduktionsweg des IL-1ß Einfluss auf die IL-6 Transkription nehmen können, untersucht. Der MAP-Kinaseweg ist einer der bedeutenden Signalkaskaden in der Vermittlung von Proliferation, Differenzierung und Erhalt der Zelle (Kolch *et al.*, 2000). Mittels korrespondierender AK wurde die Ausprägung der phophorylierten und nicht-phosphorylierten Formen von AKT, ERK und JNK als potentielle Kinasen einer Signalkaskade ermittelt.

Der Signalweg von IL-1ß beinhaltet extrazelluläre und intrazelluläre Signalweiterleitung mit positiven und negativen Feedbackmechanismen, die das IL-1ß Signal potenzieren oder beenden können. Nach der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor gipfelt eine komplexe Sequenz von kombinierten Phophorylierungen in der Aktivierung des NF-kB Signals und des JNK und p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signalweges, welcher die Expression der IL-1 Zielgene, wie z. B. IL-6 induziert (Weber *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit bestand eine nicht signifikante, aber tendenzielle Steigerung der ERK Aktivität. In der Proliferationsphase wurde unter dem Einfluss von Östrogen eine gesteigerte ERK Aktivierung beobachtet (Mohamed *et al.*, 2014). ERK und AKT nutzende Signalwege wurden auch in Zusammenhang mit dem Begünstigen des Wachstums von ES der Endometriose beobachtet (Matsuzaki *et al.*, 2015). Die Zellbeweglichkeit und die Invasionskapazität sind grundsätzliche Vorgänge nicht nur bei pathophysiologischen Vorgängen sondern auch bei physiologischen Abläufen des Gewebe Remodellings während des Menstruationszyklus und der embryonalen Implantation. Zu diesem Zwecke werden ERK als auch AKT Signalkaskaden über Wachstumsfaktoren und Östrogen aktiviert (Gentilini *et al.*, 2007).

Eine erhöhte Phosphorylierungsrate von AKT konnte nicht nachgewiesen werden. Die Aktivierung der AKT-Kinase dient in verschiedenen Signalwegen dem Ziel des Erhaltes der Zelle und Inhibition der Apoptose (Brazil *et al.*, 2004; Carnero *et al.*, 2010). Nicht-dezidualisierte ES zeigten sich in der Arbeit von Bödekker *et al.* als Apoptose resistent, wohingegen diese Wirkung durch die Dezidualisierung aufgehoben werden konnte. Es wurde jedoch, im Gegensatz zu dieser Arbeit, eine erhöhte AKT Aktivierung in nicht-dezidualisierten ES gemessen. Dies könnte jedoch daran liegen, dass andere Methoden bzw. andere AK genutzt wurden. Eine Änderung der Differenzierung von nicht-dezidualisierten ES in dezidualisierte bedeutet ein verändertes Phophorylierungsprofil von AKT.

In der Untersuchung von JNK konnte eine signifikante Phosphorylierungrate des Proteins nach 10ng/ml IL-1ß Stimulation über 0 bis 30 min in nicht-dezidualisierten ES ermittelt werden. Somit führte im komplexen Netzwerk des IL-1ß vermittelten Stimulus die Weiterleitung der Signalkaskade über JNK in den Nucleus nicht-dezidualiserter ES.

Die JNK Expression steigt in ES während der spätsekretorischen Phase (Kizilay *et al.*, 2008). Der JNK vermittelte Signalweg wird in unterschiedlichen Zellen unter anderem mit dem Ziel der IL-6 Expression genutzt, zum Beispiel auch in Microglia (Saebyeol *et al.*, 2008). IL-6 ist am inflammatorischen Milieu und der Wachstumsregulation, aber auch an der Entstehung von Tumoren, wie z. B. dem hepatozellulären Karzinom beteiligt (Das *et al.*, 2011). Ob in dezidualisierten ES ebenfalls der JNK-vermittelte Signalweg in der Ausprägung wie in nicht-dezidualisierten Zellen genutzt wird oder andere MEK und ERK vermittelte Signalkaskaden, welche differente modulatorische Effekte auf die Zytokinexpression der ES bewirken, bleibt zu untersuchen (Baston-Büst *et al.*, 2010).

Ein tendenzieller, wenn auch nicht signifikanter Anstieg des pERK, deutet allerdings auf eine Stimulation durch IL-1ß hin. AKT zeigte keine erhöhte Phophorylierungsrate oberhalb des Nullniveaus und ist somit kein vermittelndes Protein in der Signalkaskade des IL-1ß in nicht-dezidualisierten ES. Der Differenzierungsstatus der ES hat Einfluss auf die Signalweiterleitung und den embryo-maternalen Dialog. So zeigte sich eine reduzierte ERK1/2 Phosphorylierung nach Dezidualisierung von St-T1 (Baston-Büst *et al.*, 2010) sowie eine geringere p38-Phosphorylierung nach Dezidualisierung von ES (Yoshino *et al.*, 2003). Die mit einer strukturellen Umgestaltung einhergehenden Änderungen in der Gentranskription können Auswirkungen auf die Modellierung der Signaltransduktion und somit auf die Phosphorylierung von JNK haben.

An dieser Stelle ist erneut zur Diskussion zu stellen, welche Bedingungen der Dezidualisierung am regelrechten embryo-maternalen Dialog vorherrschen müssen. So hat der Embryo im Rahmen einer extrauterinen Implantation nicht die Basis eines gut vorbereiteten und dezidualisierten Endometriums, sondern wie zum Beispiel im Falle einer Tubargravidität, lediglich das Tubarepithel zur Verfügung, dessen physiologische Funktion eigentlich dem Transport und dem Erhalt der befruchteten Eizelle dienen soll. Trotzdem kann eine solche Implantation gelingen. Die Ermittlung welche Zytokine und Signalwege dann genutzt werden, könnte wichtige Hinweise über die embryo-maternale Kommunikation geben.

6.3 Limitation des *in vitro* Modells

In vitro Studienmodelle dienen dazu abschnittsweise die *in vivo* Bedingungen nachvollziehen zu können. Trotzdem bestehen Einschränkungen in der Aussagekraft von *in vitro* Modellen und es bleibt die Frage, in welchem Maße die gewonnen Parameter auf *in vivo* Bedingungen übertragbar sind. Die Mono-kultur bedeutet mit Zellenverbänden zu arbeiten, die aus ihrem natürlichen Kontext herausgenommen worden sind. Daraus folgt die Abwesenheit des komplexen Spektrums der lokalen Homöostase, einschließlich das der Signalmoleküle. Die parakrinen Wechselwirkungen mit Veränderungen auf der intraund extrazellulären Signalebene zwischen dem embryonalen und dem mütterlichen Gewebe, welche *in vivo* die Funktionen und das Verhalten der Zellen beeinflussen, fehlen im *in vitro* Versuch und beeinflussen das Ergebnis (Chen *et al.*, 2013).

Es gibt Studien, die die Wirkung auf die zellspezifische Genexpression und Zytokinsekretion im Kokultur-Modell untersuchen, um so den physiologischen Bedingungen näher zu sein. Kokulturen wurden auch zur Förderung in der *in vitro* Kultur von Embryonen eingesetzt (Wiemer *et al.*, 1993). So ergab sich in

der retrospektiven klinischen und prospektiven experimentellen Studie von Dominguez *et al.*, dass das Kokultur-Modell die Entwicklung von Blastozysten und die anschließende Implantationsrate günstig beeinflussen könnte, was den durch die endometrialen Epithelzellen sezernierten Faktoren, wie IL-6, zugeordnet wurde (Dominguez *et al.*, 2008).

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass der Differenzierungsgrad der Zellen ihre spezifische Antwort auf einen Stimulus wie IL-1ß bestimmen wird. Übertragen auf unseren Versuchsaufbau mit nicht-dezidualisierten ES bedeutet dies, dass der Stimulus IL-1ß zwar, wenn hoch genug konzentriert zugeführt, eine Antwort der Zielzellen bewirken kann, diese aber in ihrer Ausprägung anders ausfällt, als bei enddifferenzierten dezidualisierten Zellen. Nichtdezidualisierte ES scheinen also nicht in der Lage zu sein, hinsichtlich auf eine Implantation mit gleicher Sensitivität wie dezidualisierte ES auf den embryonalen Stimulus zu reagieren, welches im weitesten Sinne gegebenenfalls sogar als Schutzmechanismus für diese Zellen interpretiert werden könnte.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Von der Befruchtung bis zur Implantation der menschlichen Eizelle. S.14
- Abb.2: PCR Housekeeping Gen ß-Aktin in nicht-dezidualisierten ES. S.38
- Abb.3: PCR-Ergebnis IL-1ß Zeit- und Dosisfindung zur Induktion von IL-6 in nicht-dezidualisierten ES. S.40
- Abb.4: ELISA-Ergebnis IL-1ß Zeit- und Dosisfindung zur Induktion von IL-6 in nicht-dezidualisierten ES. S.41
- Abb.5: ELISA-Ergebnis IL-1ß induzierte IL-6 Sekretion nach Vorinkubation mit IL-1ra. S.42
- Abb.6: Quantifizierung von pAKT in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. S.43
- Abb.7A: Western blot JNK in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. S.43
- Abb.7B: Quantifizierung von pJNK in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. S.44
- Abb.8: Quantifizierung von pERK in nicht-dezidualisierten ES nach Stimulation mit IL-1ß. S.44

8 Tabellenverzeichnis

- Tab .1: Sequenzen humanes ß-Aktin und IL-6; Primer Oligounkleotidsequenzen, Zykluszahlen in der PCR, Schmelz- (T_m) und Annealing- (T_A) Temperaturen. S.26
- Tab. 2: Zusammensetzung Agarosegel-Ladungspuffers. S.28
- Tab. 3: Ansatz des Kryokonservierungsmedium. S.28
- Tab. 4: Zusammensetzung 10x PBS. S.29
- Tab. 5: Zusammensetzung TBE-Puffer. S.29
- Tab. 6: Zellkulturmedium der ES. S.29
- Tab. 7: Zusammensetzung DNAse-Verdau. S.33
- Tab. 8: Zusammensetzung RT. S.34
- Tab. 9: Abläufe der durchgeführten PCR. S.35
- Tab. 10: Reaktionsansatz PCR. S.35

9 Literaturverzeichnis

- Aggarwaj Y, Sethi G, Ahn KS, Sandur SK *et al.* (2006): Targeting Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-3 fpr Prevention and Therapy of Cancer: Modern Target but Ancient Solution. Ann N Y Acad Sci. 1091,151-69
- Aghajanova L, Hamilton A, Kwintkiewicz J *et al.* (2009): Steroidogenic enzyme and key decidualization marker dysregulation in endometrial stromal cells from women with versus without endometriosis. Biol Reprod. 80(1), 105-14
- Akira S, Hirano T, Taga T *et al.* (1990): Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL1 and TNF). FASEP. J.4,2860-2867
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007): Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. Ann Rev Immunol. 25,787-820
- Angstwurm MW, Gartner R, Ziegler-Heitbrock HW (1997): Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycles. Cytokines, 9, 370-374
- Ashshi AM (2016): Aberrant expression of interleukin-6 and its receptor in Fallopian tubes bearing an ectopic pregnancy with and without tubal cytomegalievirus infection. Virusdisease. 27(4):340-350
- Baeuerle PA, Elzinga BM, Twomey C *et al.* (2009): Interleukin-1 Receptor Type 1 Is a Substrate for Secretase-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis. Journ of Biological chemistry. 284; No3 1394– 1409
- Baltimore D. (1996): NF-kappa B: Ten years after. Cell. 87:13-20
- Balkwill FR, Burke F (1989): The cytokine network. Immunol Today. 10, 299-304
- Baston-Büst DM, Götte M, Janni W et al. (2010): Syndecan-1 knock-down in decidualized human endometrial stroma cells leads to significant changes in cytokine and angiogenic factor expression patterns. Reprod Biol Endokrinol 01/2010
- Baston-Büst DM, Schanz A, Böddeker SJ *et al.* (2013): CXCL1 expression in human decidua in vitro is mediated via MAPK signalling cascade. Cytokine. 64(1):79-85
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA et al. (2000): CXC chemokines in angiogenesis. J Leukoc Biol. 68(1):1-8
- Berlin-Institut f
 ür Bev
 ölkerung und Entwicklung,demografische Analysen, Konzepte, Strategien 06/2007, 03/2009
- Bellhumeur C, Blanchet J, Fontaine N *et al.* (2009): Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distict mechanisms. Hum Reprod. 24 (9):2193-2204
- Bersinger NA, Günthert AR, McKinnon B et al. (2011): Arch Gynecol Obstet. 283; 1291-1296
- Bigonnesse F, Marois M, Maheux R *et al.* (2001): Interleukin-1 receptor accessory protein is constitutively expressed in human endometrium during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod. 7: 333-339
- Blistek A, Morawska E, Ziecik AJ (2012): Regulation of expression and role of leukemia inhibitoryfactor and interleukin-6 in the uterus of early pregnant pigs. Theriogenology. 15;78(5):951-64
- Bödekker S (2015) Tod vor dem Leben? Die Rolle der Apoptose in der humanen, embryonalen Implantation; Dissertation; Universität Düsseldorf
- Bourdies A, Ahmad SF, Lachab A et al. (2015): Reprod Biomed Online. S1472-6483(15)00481-2

- Bozulic L, Hemmings BA (2009): PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phophorylation. Curr Opin Cell Biol. 21(2):256-61
- Brar AK, Frank GR, Kessler CA et al. (1997): Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. Endocrine. 6, 301-307
- Brenner RM, Maslar IA (1988): The primate Oviduct and Endometrium. In: The Physiology of Reproduction. In: Knobil E, Neill J eds. Vol. 1: RavenPress, Ltd., New York
- Brosens JJ, Takeda S, Acevedo CH *et al.* (1996): Human endometrial fibroblasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus. Endocrinology. 137,2225-2231
- Brosens JJ, Hayashi N, White JO *et al.* (1999) Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cell. Endocrinology. 140,4809-4820
- Brosens JJ, Gellersen B (2010): Something new about early pregnancy: decidual biosensoring and natural embryo selection. Ultrasound Obstet Gynecol. 36(1),1-5
- Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, et al. (2013): Scientific Reports 4:3894
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA (2004): Advances in protein kinase B signalling: AKTion in multiple fronts. Trend Biochem Sci. 29:233-242.
- Bücking J (2003) Untersuchungen zur Expression und Regulation von Interleukin-6 und Vasculat-Endothelian-Growth-Faktor (VEGF) im humanen Endometrium. Dissertation; LMU München: Medizinische Fakultät
- Cantley LC (2002): The phophoinositide 3-kinase pathway. Science. 296:1655
- Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y et al. (2001a): A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kB-dependent genes in primary rat pancreatic-cells. J Biol Chem. 276:48879–48886
- Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R et al. (2001b): Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic ß-cells by high-density oligonucleotide arrays. Diabetes. 50,909–920
- Capodici C, Hanft M, Feokistov M *et al.* (1998): Phophatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD 18-dpendent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-indepnedent pathway. J. Immunol. 160:1901
- Catalano RD, Johnson MH, Campbell EA et al. (2005): 370 Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. Proc Natl Acad Sci USA.102(24):8585-8590.
- Carnero A (2010) The PKB/AKT pathway in cancer. Curr Pharm Des.16:34-44
- Chard T (1996) Cytokines in implantation. Hum.Reprod Update. 1,385-396
- Chen JC, Erikson DW, Piltonen TT *et al.* (2013): Fertil Steril, 100(4) Cocultering human endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts alters cell-specific gene expression and cytokine production.
- Chevalier S, Fourcin M, Robledo O et al. (1996): Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. J Biol Chem. 21;271(25):14764-72
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanatephenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162(1):156-159
- Chung KW, Ando M, Adashi EY (2000): Periovulatory and interleukin (IL)-1-dependent regulation of IL-6 in the immature rat ovary: a specific IL-1 rezeptor-mediated eicosanoid-dependent effect. J Soc Gynecol Investig. 7(5):301-8
- Clark DE (1993): Cytokines, decidua and early pregnancy. Ref Reprod Biol. 15, 83-111

- Cobb MH (1999): MAP kinase pathways. Prog Biophys Mol Bioll. 71:479-500. Review
- Cork BA, Tuckerman EM, Li TC *et al.* (2002): Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. Mol Hum Reprod. 8,841–848
- Cross JC, Werb Z, Fischer SJ (1994): Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. Science. 266,1508-1517
- Das C, Kumar VS, Gupta S (2002): Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. J Reprod Immunol. 53:257-68
- Das M, Garlick DS, Greiner DL (2011): The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma.-Genes & Dev. 25:634-64533eqwq
- Davis RJ (1993): The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem. 268,14553-14556
- Dechaud H, Maudelonde T, Daures JP *et al.* (1998): Evaluation of endometrial inflammation by quantification of macrophages, T lymphocytes, and interleukin-1 and -6 in human endometrium. J Assist Reprod Genet. 15, 612-618
- De los Santos MJ, Mercader A, Frances A (1996): Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. Biol Reprod. 54:563-574
- Devalaraja RM, Nanney LZ, Du J (2000): Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. J Invest Dermatol. 115:234-244
- Dhawan P, Richmond A (2002): Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. J Leukoc Biol. 72:9–18
- Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA (2002): Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod. 8,636–643
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL *et al.* (2005): Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. Hum Reprod Update. 11,613–630.
- Dimitriadis E, Stoikos C, Tan YL, Slamonsen LA (2006): Interleukin 11 Signalling Components Signal Transducer and Acitvator of Transcription 3 (STAT3) and Sippressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) regulate Human Endometrial Stroma Cell Differentation. Endocrinology. 147(8),3809-19
- Dimitriadis E, Sharkey AM, Tan YL *et al.* (2007): Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11
 and leukaemia inhibitory factor in endometriuam of women with unexplained infertility during the implantation
 window. Reprod Biol Endocrinol. 5:44.
- Dinarello CA (1994): The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J. 8, 314-1325
- Dinarello CA (1996): Biologic Basis for Interleukin-I in Disease. Blood. 87, No.6, 2095-2147
- Dinarello CA (2005): Blocking IL-1 in systemic inflammation. JEM. vol. 201 No.9, 1355-1359
- DIR Deutsches IVF Register, Jahrbuch 2014, 2015 aus J Reproduktionsmed Endokrinol 2015 und Jahrbuch 2011 aus J Reproduktionsmed Endokrinol 2012; 9(6)453-84.
- Dominguez F, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F et al. (2005): Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? FASEB J. 19,1056–1060

- Dominguez F, Gadea B, Mercader A *el al.* (2008): Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtaine after cocultue in human endometrial cells versusu the sequential system. Fertil Steril. 93(3):774-782
- Dower SK, Kronheim SR, Hopp TP et al. (1986): The cell surface receptors for interleukin-1α and interleukin-1ß are identical. Nature. 324, 266-268
- Dunne A, O'Neill LA (2003): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE. 171:re3
- Engstler H., Menning S. (2003) Die Familie im Spiegel der amtlichen Statistik. Lebensformen, Familienstrukturen, wirtschaftliche Situation der Familien und familiendemographische Entwicklung in Deutschland. Erweiterte Neuauflage 2003. Bonn, Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend
- Engvall E, Perlman P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. Bd. 8, S. 871-874
- Evain-Brion D et al. (2001): The 2 differentation pathways of the human trophoblast. Gynecol Obstet Fertil.
 29, S. 497-502
- Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z (2004): Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment a review. Placenta. 25 Suppl A:S26-31
- Feldmann M (1993): Cell cooperation in the antibody response. In: Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (Hrsg.): Immunology. Mosby, Chicago, USA.
- Fernandez EJ, Lolis E (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 42:469-49
- Findlay JK (1986): Angiogenesis in reproductive tissues. J Endocrinol. 111,357-366
- Fisher ST, Appenheimer MM, Evans SS (2014): The two faces of IL-6 in the tumor micronvirement; Semin Immunol. 38-47
- Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E *et al.* (2003): Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) Hum Reprod Update. 14(4):335-344
- Frank GR, Brar AK, Cedars MI, Handwerger S (1994): Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. Endocrinology. 134, 258–263
- Gao J. Tian J, Lv Y et al. (2009): Leptin induces functionale activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. 2009 Cancer Sci.s100(3):389-395
- Garlanda C, Dinarello C, Mantovani A (2013): The Interleukin-1 Family: Back to the Future; Immunity. Vol. 39(6);1003-1018
- Gellersen B., Kempf R., Telgmann R., DiMattia G.E. (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. Mol. Endocrinol.; 8:356-373
- Gellersen B., Brosens J. (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. J. Endocrinol.178, 357–372
- Gellersen B, Brosens JJ (2014): Cyclic decidualization of the human endometrium I reproductive health and failure. 2014. Endocrin Rev. 35(6):851-905

- Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ (2007): Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. Semin Reprod Med. 25:445-453
- Gentilini D, Busacca M, di Francesco S *et al.* (2007): PI3K/Akt Ans ERK ½ signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17ß-estradiol and growth factors. Mol Hum Reprod. 13(5):317-322
- Germeyer A, Sharkey AM, Prasadajudio M *et al.* (2009): Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. Mol Hum Reprod. 15(1):39-48
- Gleeson L.M., Chakraborty C., McKinnon T., and Lala P.K. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 Stimulates Human Trophoblast Migration by Signaling through 395 {{alpha}}5{beta}1 Integrin via Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(6):2484-2493
- Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA *et al.* (1995): Angiogenesis in the human female reproductive tract. Obstet Gynecol Surv. 50(9),688-97
- Gubbay O, Critchley OD, Bowen JM *et al.*(2002):Prolactin induces ERK Phophorylation in Epithelial an CD56
 Natural Killer Cells of the Human Endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 87(5):2329-2335
- Hannan NJ, Jones RL, White CA *et al.* (2006): The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. Biol Reprod. 74,896–904
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP et al. (1990): Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. Nature. 343,336-340
- Harper MJ (1992): The implantation window. Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 6:351-371
- Haouzi D, Assou S, Mahmouk K *et al.* (2009):Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural und stimulated sycles fort he same patients. Hum Reprod. 24:1436-1445
- Heinrich PC, Behrmann, Haan S *et al.* (2003): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J. 374,1–20
- Hemmings BA, Restuccia DF (2012): P13K-PFB/Akt Pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol. 4(9):a011189
- Heneweer C, Schmidt M, Denker HW *et al.* (2005): Molecular mechanisms in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine Ishikawa cells. Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction (JECAR), 2:4 doi: 10.1186/1743-1050-2-4
- Hermann-Lavoie C, Rao CV, Akoum A et al. (2007): Chorionic gonadotropin down563 regulates the expression of the decoy inhibitory interleukin 1 receptor type II in human endometrial epithelial cells. Endocrinology. 148:5377-5384
- Hess AP, Nayak NR, Giudice LC (2006): Oviduct and Endometrium: cyclicchanges in the primate oviduct and endometrium. In: Neill J.D. (ed) The Physiology of Reproduction, 3rd Edition. Elsevier. St. Louis, 359-403
- Hess AP, Hamilton AE, Talbi S (2007): Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. Biol Reprod. 76(1),102-117
- Hess AP, Baston-Buest DM, Schanz A *et al.* (2009): Interleukin-1 System in the human fallopian tube-No spatial but a temporal regulation of mRNA and protein expression Mol Cel Endokcrinol. 6;303(1-2):7-12
- Hers I, Vincent RR, Tavaré JM (2011): Akt signalling in health and disease. Cell Signal. 23(10),1515-27
- Hirano T, Akira S, Taga T et al. Biological and clinical aspect of IL-6. Immunol today, 11:443-9
- Horne AW, White JO,Lalani EN (2000): The endometrium and embryo implantation A receptive endometrium depends on more than hormonal influences. BMJ. 321(7272):1301–1302

- Horuk R, McCubrey, JA (1989): The IL-1 receptor in Raji human B-lymphoma cells. Molecular charcterization and evidence for receptor-mediated activation of gene expression. Biochem J. 260,657-663.
- Huang JR, Tseng L, Bischof P, Janne O (1987): Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. Endocrinol. 121,2011–2017
- Ichijo H. (1999): From receptors to stress-activated MAP kinases. Oncogene.18:6087-93. Review
- IfD Allensbach Institut für Demoskopie Allensbach (2007) Ungewollt kinderlos. Was kann die moderne Medizin gegen den Kindermangel in Deutschland tun?
- Issa R, Xie S, Lee KY *et al.* (2006): GRO-(alpha) regulation in airway smooth muscle by IL-1beta and ZTNF-(alpha): role of NF-(kappa) and MAP kinases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 291: L66-74. 10.1152/ajplung.00384.2005
- Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM et al. (2006): Endocrine regulation of menstruation. Endocr Rev. 27,17–46
- Janeway CA, Travers P, Walport M *et al.* (2005): Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.
 6. ed New York, NY: Garland Science Publishing. ISBN 0-443-07310-4
- Jang S, Kelley KW, Johnson RW (2008) Luteolin reduces IL-& produktion in microglia by inhibiting JNK phophprylation and activation of AP-1. J Nutr. Oct;140(10):1892-8
- Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA (2007): Reduced expression of IL-6 and IL-1 mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. J Reprod Immunol 73,74–84
- Jones SA et al. (2001): The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. FASEB J. 15(1): p. 43-58
- Jones RL, Findlay JK, Salamonsen LA (2006): The role of activins during decidualisation of human Endometrium. Australian & N. Z. J. Obstet. & Gyn. 46, 245–249 56
- Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK (2002): Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. Clin Endocrinol Metab. 87,4001–4004
- Jönsson D, Amisten S, Bratthall G et al. (2009): LPS induces GROalpha chemokine production via NFkappaB in oral fibroblasts. Inflamm Res. 58(11), 791-796
- Loppnow H (2007): Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. Der Internist, 2,Nr.1, 13-27
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S *et al.* (2003): Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. Endocrinol. 144(7):2870–2881
- Keyse SM, (1995): An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases, Biochemica et Biophysica Acta. 1265,152-160
- Kishimot T (1989): The biology of interleukin-6. Blood. 74,1-10
- Kizilay G, Cakmak H, Yen CF (2008): Histochem Cell Biol. 130:761
- Kliman HJ, Dubowy RL, Feinberg RF (2000): Improved accuracy of endometrial assessment using cyclin E and p27. Paper presented at: Human Fertility and Reproduction: the oocyte, the embryo and the uterus (New York University, NY, NY).
- Knobil E (1980): The neuroendocrine control of the menstrual cycle. Recent Prog Horm. Res. 36, 53
- Kolch W (2000): Meaningful relastionships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J. 351 Pt,289-3015

- Krach M, Saklatvala J (2002): Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. Cytokine. 20,91–106
- Krüssel JS, Huang HY, Wen Y *et al.* (1997): Different pattern of interleukin-1 beta-(IL-1 beta), interleukin-1 receptor antagonist- (IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I- (IL-1R tI) mRNA-expression in single preimplantation mouse embryos at various developmental stages. J Reprod Immunol. 34:103-120
- Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML (1998): Einfluß von parakrinen Faktoren auf die embryonale Implantation. Gynäkologe 31:339–345
- Krüssel JS, Huang HY, Simon C (1998): Single blastomeres within human preimplantation embryos express different amounts of messenger ribonucleic acidfor beta-actin and interleukin-1 receptor type I. J Clin Endocrinol Metab. 83:953-959
- Krüssel J, Simon C, Rubio M et al. (1998): Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos 10.1093/humrep/13.8.2206. Hum Reprod. 13(8):2206-2211S
- Krüssel JS, Huang HY, Hirchenhain J *et al.* (2000) Is there a place for biochemical embryonic preimplantational screening? J Reprod Fertil Suppl. 55,147-159
- Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML et al. (2003): Regulation of embryonic implantation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 110 Suppl.1,S2–S9
- Krüssel J, Hirchenhain J, Schanz A *et al.* (2006): Interlekin-1 and Implantation. Landes Biocience Madam Curie Database. Immunology of Pregnancy, Chapter Category: Reproductive Biology
- Laflamme J, Akoum A, Leclerc P (2005): Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6. Mol Hum Reprod. 2:141-150
- Laird SM, Tuckerman E, Li TC, Bolton AE (1994): Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin and placental protein 14. Hum Reprod. 9:1339-1343
- Lala PK, Graham CH (1990): Mechanisms of trophoblast invasieness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. Cancer Metastasis Rev. 9:369-379
- Lathi RB, Hess AP, Tulac S *et al.* (2005): Dose-Dependent Insulin Regulation of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 in Human Endometrial Stromal Cells Is Mediated by Distinct Signaling Pathways. J Clin Endocrinol Metab. 90(3):1599-1606
- Leidenberger F, Ortmann O, Strowitzki T (2009, 2014): Klinische Endokrinologie f
 ür Frauen
 ärzte. Auflagen 4.,5., Springer-Verlag ISBN 978-3-642-38043-3
- Leitao B, Jones MC, Fusi L *et al.* (2009) Silencing of the JNK pathway maintains progesterone receptor activity in decidualizing human endometrial stromal cells exposed to oxidative stress signals. FASEB J. 24(5):1541-1551
- Leonard WJ, O'Shea JJ (1998): Jaks and STATs: biological implications. 1. Annu Rev Immunol.16: 293-322.
- Lin SL, Yan LY, Liang XW (2009): Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b-NCBI. Reprod Biol Endocrinol 20;7:76
- Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V et al. (2002): Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. Fertil Steril. 78:221-233.
- Lippert H: Lehrbuch Anatomie, 5., völlig überarbeitete Auflage, 2000, Urban & Fischer Verlag München -Jena, ISBN 3-437-42360-6, S.379,S.398-399

- Lira SA, Zalamea P, Heinrich JN (1994): Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermis of transgenic mice results in marked infiltration of a single class of inflammatory cells. J Exp Med. 180(425):2039-2048
- Löffler G, Petrides PE (2002) Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag GmbH, Auflage: 7., ISBN-10: 3540422951
- Makkar G, Ng EHY, Yeung WSB *et al.* (2006) Reduced Expression of Interleukin-11 and Interleukin-6 in the
 Periimplantation Endometrium of Excessive Ovarian Responders during in Vitro Fertilization Treatment. J Clin
 Endokrinol Metab. 91:3181-3188
- Manning BD, Cantley LC (2007): AKT/PKB Signaling: navigation downstream. Cell. 129(7),1261-74
- Markert UR, Morales-Prieto DM, Fitzgerald JS (2011): Expert Review of Clinical Immunology, Vol. 7;5:603-609
- Martin KL (2000) Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts. Hum. Fertil. 3:247-254
- Masuhiro K, Matsusaki N, Nishio E (1991): Trophoblast-derived interleukin-1 (IL-1) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6-receptor system in first trimester human trophoblasts. J Cin Endocrinol & Metab. 72:594-601
- Matsuzaki S, Darcha C (2015) Co-operation between the AKT and ERK Signaling pathways may support growth of deep endometriosis in a fibrotic microenviroment in vitro. Hum Reprod. 0(0):1-11
- Medawar PB (1953): Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. In Society for Experimental Biology (New York: Academic Press) 320-338
- Minden A, Karin M (1997): Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. Biochim Biophys Acta.1333:F85-104. Review.
- Mizuno K, Tanaka T, Umesaki N (1998): Establishment and characterization of in vitro decidualization in normal human endometrial stromal cells. Osaka City Med J. 44:105–115
- Mohamed SA, Atta IS, Rowan GG (2014) Journal of Egyptian National Cancer Institute. 26(1):37-41
- Montes MJ, Tortosa CG, Borja C *et al.*(1995): Constituive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. Am J Reprod Immunol. 34:188-194
- Mosmann, TR, Fong TA (1989) Specific assays for cytokine production by T cells. J Immunol Methods.116: 151-158
- Motro B, Itin A, Sachs L et al. (1990): Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. Proc Natl Acad Rci USA. 87:3092-6
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF et al. (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev. 52:145–176
- Nasu K., Fujisawa K, Arima K et al. (2001): Expression and regulation of growth-regulated oncogene alpha in human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod. 7:741-746
- Nasu K, Fukuda J, Sun B *et al.* (2003): Interleukin-13 and tumor necrosis factor-beta differentially regulate the production of cytokines by cultured human endometrial stromal cells. Fertil Steril. 79:821-827
- Navot D, Bergh PA, Williams MA et al. (1991): Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. Lancet 337:1375-7
- Neumann D, Lieneklaus S, Rosati O et al. (2002): IL-1ß induced phophorylation of PKB/Akt depends on the presence of IRAK-1. Euro J Immunol. 32(12):3689-98

- Nilsson MB, Langley RR, Fidler IJ (2005): Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. Cancer Res. 65:10794-10800
- Noyes RW, Haman JO (1953): Accuracy of endometrial dating. Fert Steril. 4:504-17
- Norwitz ER, Schust DJ et al. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. N Engl J Med. 345(19):1400-8
- Ohbayashi N, Ikeda O, Taira Net al. (2007): LIF- and IL-6-induced acetylation of STAT3 at Lys-685 through PI3K/Akt activation. Biol Pharm Bull. 30:1860–1864
- Oquendo P, Alberta J, Wen DZ et al. (1989): The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. J Biol Chem. 264:4133-4137
- Pang G, Couch L, Baley R *et al.* (1994): GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccheride, IL-1 alpha and TNF-alpha. Clin Exp Immunol 96(3):437-443
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T *et al.* (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev. 22(2):153-83
- Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S *et al.* (2004) Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. Hum Reprod 19:2633–2643
- Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Dubois, M *et al.* (2005): Human Endometrial Leukemia Inhibitory factor and Interleukin- 6: Control of Secretion by Transforming Growth Factor-ß-Related Members. Neuroim-munomodulation. 12:57-163
- Pitman H, Innes BA, Robson SC et al. (2012) Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. Hum Reprod. 28(8):2075-2086
- Polan ML, Simón C, Frances A *et al.* (1995): Role of embryonic factors in human implantation. In: Simón, C., Pellicer, A. (Hrsg.) Regulators of human implantation. Oxford University Press, Oxford, UK
- Popovici RM, Betzler NK, Krause MS (2006): Gene expression profiling of human endometrial-trophoblast interaction in a coculture model. Endocrinology. 147:5662-5675
- Post GR, Brown JH (1996): G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses, FASEB.10:741-749
- Prins JR Gomez-Lopez N, Robertson SA (2012): Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. J Reprod Immunol 95(1-2):1-14
- Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN (2010): Endometrial decidualization: Of mice and men. Seminars in Reproductive Medicine. 28(1):17-26
- Refaat B, Ashshi AM, Batwa SA *et al.* (2016): The prevalence of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalum tubal infections and their effects on the expression of IL-6 and leukemia inhibitory factor in Fallopian tubes with and without an ectopic pregnancy. Innate Immun. 22(7):534-45
- Ribaux P, Ehses JA, Lin-Marq N et al. (2007): Induction of CXCL1 by Extracellular Matrix and Autocrine Enhancement by IL-1 in Rat Pancreatic
 ß-cells, Endocrinology. 148:5582-5590
- Richmond, A., Thomas, H.G. (1998) Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. J. Cell Biochem.; 36:185-198
- Robertson SA (2010): Immune regulation of conception and embryo implantation all about quality control? Reprod Immunol. 85:51-57

- Romero R, Wu YK, Brody DT et al. (1989): Humandecidua: a source of interleukin-1. Obstet Gynecol. 73:31-34
- Rudack C, Sachse F, Alberty J (2006): Primary role of growth-related oncogene alpha and granulocyte chemotactic protein-2 as neutrophil chemoattratants in chronic rhinosinusitis. Clin Exp Allergy. 36:748-759
- Saklatvala J, Dean J, Finch A (1999): Protein kinase cascades in intracellular signalling by interleukin-I and tumour necrosis factor. Biochem Soc Symp. 64:63-77. Review
- Salamonsen, LA, Jones, RL (2003): Endometrial remodeling. In: Meyer J (ed.) Encyclopedia of Hormones. San Diego, USA: Academic Press, 504–512
- Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones, RL et al. (2003): Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases – a review. Placenta. 24,76
- Salamonson LA, Hannan NJ, Dimitriadis E (2007): Cytokine and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. Semin Reprod Med. 25:437-444
- Salker M, Teklenburg G, Molokhia M *et al.* (2010): Natural selection of human embryos: impaired decidualisation of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. PLoS One 21:5(4)
- Samalecos A, Reimann K, Wittmann S (2009): Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. Reprod Biol Endocrinol. 7:76
- Scapini P, Morini M, Tecchio C (2004): CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor. A J Immunol. 172:5034-5040
- Schanz A, Hess A, Shahin A *et al.* (2004): Molekulare Mechanismen der Embryoimplantation im Endometrium. Der Gynäkologe. 37:123-127
- Schiebler, T.H., Korf, H.W. (2007) Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Auflage: 10., ISBN-10: 3798517703
- Seger R, Krebs EG (1995): The MAPK signaling pathway. FASEB J. 9(9):726-35
- Sharkey AM, Dellow K, Blayney M *et al.* (1995): Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. Biol Reprod. 53:974–981
- Sharma S, GodboleG., Modi D (2016): Decidual Control of Trophoblast Invasion. Am J Reprod Immunol. doi: 10.1111/aij.12466
- Sehgal PB (1992): Regulation of IL-6 gene expression. Res Immunol. 143:724-34
- Sherwin, JR, Smith, SK, Wilson A *et al.* (2002): Soluble gp130 ist upregulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility. J Clin Endokrinol Metab. 87,3953-3960
- Sherwin JR, FreemanTC, Stephens RJ *et al.* (2004): Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. Mol Endocrinol.18(9):2185-95
- Sheth KV, Roca GL, Al-Sedairy ST *et al.* (1991): Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid. Fertil Steril. 55: 952-957
- Simón C, Piquette GN, France, A *et al.* (1993a): Localisation of interleukin-1 receptor type I and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 77:549-555
- Simón C, Piquette GN, Frances A *et al.* (1993b): Interleukin-1 type receptor messenger ribonucleic acid expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. Fertil Steril, 59:791-796.
- Simón C, Valbuena, D, Krüssel JS et al. (1998a): Interleukine-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. Fertil Steril. 70:896-906
- Sims JE, March CJ, Cosma D et al. (1988): cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobin superfamily. Science. 241:585-589
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL et al. (1993): Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6155-6159.
- Sporn MB, Roberts A.B (1988) Peptide growth factors are multifunctional. Nature. 332:217-219
- Steele GL, Currie WD, Leung EH *et al.*(1992): Rapid stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by interleukin-1? From perifused first trimester trophoblast. J Clin Endocrinol & Metab. 75:783-788
- Stylianou E, O'Neill LA, Rawlinson L *et al.* (1992): Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. J Biol Chem. 267:15836–15841
- Stylianou E, Saklatvala J (1998): Interleukin-1. Int J Biochem Cell Biol. 30:1075- 9. Review
- Szelenyi J (2001): Cytokines and the central nervous system. Brain Res Bull. 54:329-338
- Tabanelli S, Tang B, Gurpide E (1992): In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 42:337–344
- Tabibzadeh S. (1991): Human endometrium: an active site of cytokine production and action. Endocr Rev. 12:272-290
- Tabibzadeh S, Sun XZ (1992): Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. Hum Reprod. 7:1214-1221
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A *et al.* (1995): Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. Hum Reprod. 10:2793–2799
- Tabibzadeh S, Babaknia A (1995): The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue destruction. Hum Reprod. 10: 1579-1602
- Tabibzadeh S. (1996): The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. Mol Hum Reprod. 2:77-92
- Tabibzadeh S (2002): Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals. Front. Bioscience. 7: 1475-1486
- Taga T, Narazaki M, Yasukawa K et al. (1992): Functional inhibition of hematopoietic and neurotrophic cytokines by blocking the interleukin-6 signal transducer gp130. Proc Natl Acad Sci USA. 89:10998-11001
- Taga T (1996): Gp 130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. J Neurochem. 67:1-10
- Tazuke SI, Giuidice LC (1996): Growth factors and cytokines in endometrium embryonic development, and maternal: embryonic interactions. Sem Reprod Endocrinol. 14:231-245
- Teh WT, McBain J, Rogers P (2016): J Assist Reprod Genet. 33(11):1419-1430
- Teklenburg G et al. (2010) Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stroma cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. PLoS One. 5,e10258
- Thellin O, Heinen E (2003): Pregnancy and the immune system: between tolerance and Rejection.Toxicology. 185:79-184

- Tosato G, Jones KD (1990): Interleukin-1 induces interleukin-6 production in perpheral blood monocytes. Blood. 75:1305-1310
- Tsai HH, Frost E, To V (2002): The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. Cell. 110:373-383
- Tseng JF, Ryan IP, Milam TD (1996): Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 81(3):1118-22
- Tseng L, Gao, JG, Chen R *et al.* (1992): Effect of progestin, antiprogestin and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. Biol Reprod. 47:441-450
- Vaddi K, Keller, M, Newton K (1997): The Chemokine FactsBook. ISBN-10: 0127099050
- Vandermolen DT, Gu Y (1996): Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro potein production, and stimulation thereof by IL-1 beta. Fertil Steril. 66:741-747
- van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ (2009): Embryonic implantation: cytokines, 445 adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. J Leukoc Biol. 85(1):4-19
- van Snick J (1990) Interleukin 6: An overview. Annu Rev Immunol. 8:235-78
- Viganò P, Mangioni S, Pompei F *et al.* (2003): Maternal-conceptis cross talk a review. Placenta.(Suppl B)24:56-61
- von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T *et al.* (2000): Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. Mol Hum Reprod. 6,627-634
- von Wolff M, Stieger S, Lumpp K *et al.* (2002): Endometrial interleukin-6 in vitro is not regulated directly by female steroid hormones, but by pro-inflammatory cytokines und hypoxia. Mol Hum Reprod. 8,1096-1102
- von Wolff M, Thaler CJ, Zepf C *et al.* (2002): Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle. Gynäkol Endokrinol. 16:121-129
- Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010): Interleukin-1 pathway. Sci Signal. 19:3(105)
- Wang X, Fu S, Wang Y *et al.* (2007): Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. Mol Cell Neurosci. 36:343-354
- Wegmann T G, Lin H et al. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today. 14(7):353-6
- Weston CR, Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Genet Dev. 12(1)14-21
- Widman C, Gibson S, Jarpe M et al. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev. 79:143-180
- Wilcox AJ, Baird MD, Weinberg C *et al.* (1999): Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy Engl J Med. 340:1796-1799
- Wiemer KE, Hoffmann DI, Maxson WS *et al.* (1993): Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following the co-cultue on bovine oviductal epithelial cells. Human Reprod. 8:97-101
- White CA, DimitriadisE, Sharkey AM *et al.* (2007): Interleukin 1 is induced by interleukin 11 during decidualization of human endometrial stromal cells, but is not released in a bioactive form. J Reprod Immunol 73, 28– 38
- Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996): Transcription factor AP-1 regulation by mitogenactivated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med. 74:589-607. Review

- Wolvekamp MC, Marquet RL (1990): Interleukin-6:historical background, genetics and biological significance. Immunol Lett. 24(1):1-9
- Woohyoung J, Jinhyeon K, Fuller WB *et al.* (2016): Stimulatory effects of Interleukin-1 beta on developmet of porcine uterine epithelial cell are mediated by activation of ERK1/2 MAPK cell signaling cascade. Molecular and Cellular Endocrinology. 419:225-234
- Wymann MP, Sozzani F, Altruda F. et *al.* (2000): Lipids on the move: phophoinositide-3-kinases in leucocyte function. Immunol Today. 21:260
- Young-June J, Jeong-Hyung L, Young-Myeong K (2012): Macrophage inhibitory cytokine-1 stimulates proliferation of human umbilical vein endothelial cells by up-regulating cyclins D1 and E through the PI3K/Akt-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 and E2F activation signaling pathways. Science Direkt. Cellular Signalling. Vol. 24,1485-1495
- Yoshino O et al. (2003): Endometrial stroma cells undergoing decidualization downregulate their properties to
 produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 beta via reduced p38 mitogen activates protein kinase phophorylation. J Clin Endocrinol Meatb. 88:2236-2241
- YoshinoO, Osuga Y, Hirota Y *et al.* (2004): Possible Pathophysiological Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) in Endometriosis. American Journal of Reproductive Immunology. 52(5):306-311
- Zenklussen AC, Blois S, Stumpo R *et al.* (2003): Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the fetomaternal interface. Cytokine. 24150-160
- Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirom R et al. (1991): Cytokine involvement in oocytes and early embryos. Fertil Steril. 56:265-272
- Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C (2000): Corticotrophinreleasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. Mol Hum Reprod. 6:344-351

10 Danksagung

Nachfolgenden Personen möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen:

Frau Prof. Dr. Alexandra Bielfeld gab mir die Möglichkeit durch diese Arbeit an einer höchst interessanten wissenschaftlichen Schnittstelle der menschlichen Entwicklung mitwirken zu dürfen. Durch ihr professionelles Engagement, ihre ansteckende Motivation und ihre profunden wissenschaftlichen Kenntnisse erhielt ich einen effizienten thematischen Zugang.

Frau Dr. Dunja Baston-Büst ließ mich im stets konstruktiven Dialog und mit unerschütterlicher Geduld an Ihrem außerordentlichen Wissen teilhaben. Dank ihrer differenzierten, sachdienlichen und auch menschlichen Unterstützung konnte ich die komplexen inhaltlichen Sachverhalten vertiefen, die diese Arbeit erst möglich machten.

Sabine und Axel Peters für die freundschaftliche, hilfreiche und geduldige technische Unterstützung.

Meinem Mann Paulo, meinen Kindern, meiner Schwester und meinen Eltern für eine Geduld und Unterstützung, die ich nicht in Worte fassen kann.