

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor Univ.- Prof. Dr. Marek Zygmunt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Heparine modulieren humane endometriale Stromazellen im Hinblick auf deren
Differenzierung und Reaktionsverhalten gegenüber TNF- α und INF- γ**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2012

vorgelegt von: Julia Hehui Spratte

geb. am: 03. Juli 1984

in: Kirchheim unter Teck

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Marek Zygmunt
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Daniela Hornung
Ort, Raum:	Greifswald, Seminarraum der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Tag der Disputation:	04. März 2013

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Gewebebegewinnung und Zellkultur	5
2.2 Dezidualisierung <i>in vitro</i>	5
2.3 Cell Viability Assay	5
2.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	6
2.5 Durchflusszytometrie	6
2.6 In-Cell Western Assay	7
2.7 Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (real-time RT-PCR)	7
2.8 Cyclisches Adenosin 3', 5'- Monophosphat Assay	8
2.9 Transkriptionsfaktor Assay	9
2.10 Statistik	9
3. Ergebnisse	10
3.1 Heparin und Dezidualisierung	10
3.1.1 Heparin moduliert dosisabhängig IGFBP-1, PRL und IGF-1 in dezidualisierenden ESCs <i>in vitro</i>	10
3.1.2 Heparineffekte auf IGFBP-1, PRL und IGF-1 sind zeitabhängig	11
3.1.3 Niedermolekulare Heparine (NMHs) modulieren IGFBP-1, PRL und IGF-1 während der Dezidualisierung <i>in vitro</i>	13
3.1.4 Heparin und NMHs führen zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel in dezidualisierten ESCs	14
3.2 Mechanistische Untersuchungen des Heparineffekts	15
3.2.1 Einfluss von Thrombin und Faktor Xa (FXa) auf IGF-1 während der Dezidualisierung	15
3.2.2 Heparin, Dextransulfat und Danaparoid zeigen unterschiedliche Effekte	15
3.2.3 Verschiedene NMHs haben unterschiedliche Effekte auf IGF-1	16
3.2.4 Dosisabhängigkeit des Einfluss von Heparin auf dezidualisierende ESCs	18
3.3 Einfluss von Heparin auf den IFN- γ Signalweg	20
3.3.1 Heparine hemmen die IFN- γ vermittelte Hochregulation des interferon response factor (IRF)-1 aber nicht des N-myc interactor (Nmi)	20
3.3.2 Hemmung der IFN- γ vermittelten Phosphorylierung von STAT-1 durch Heparin	22

3.3.3 Heparin interferiert mit IFN- γ bei der Bindung an seinen Rezeptor	23
3.4. Einfluss von Heparin auf den TNF- α Signalweg	24
3.4.1 Heparin hemmt die TNF- α induzierte Hochregulation von IL-6 und IL-8	24
3.4.2 TNF- α Effekte werden über NF- κ B vermittelt	25
3.4.3 Heparin hemmt nicht die Degradation von I κ B α	27
3.4.4 Heparin interferiert mit NF- κ B im Zellkern	27
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	34
6. Literaturverzeichnis	36
7. Publikationen	41
8. Eidesstattliche Erklärung	42
9. Danksagung	43

1. Einleitung

Die Dezidualisierung, d.h. die Differenzierung des endometrialen Stromas in der zweiten Hälfte des weiblichen Zyklus, ist die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation des Embryos und eine darauf folgende Schwangerschaft (Dunn *et al.*, 2003). Die morphologischen Veränderungen des Endometriums während des Zyklus werden von den beiden Sexualhormonen Östrogen und Progesteron gesteuert. Östrogen wird in den Granulosazellen des reifen Follikels und nach der Ovulation vom Corpus luteum gebildet. Progesteron wird hauptsächlich vom Corpus luteum und in der Schwangerschaft von der Plazenta produziert (Kiechel *et al.*, 2007). Der Einfluss dieser beiden Hormone auf die Dezidualisierung des Endometriums wurde zum ersten Mal 1950 von Noyes, Hertig und Rock beschrieben. Östrogen ist das dominierende Hormon der Proliferationsphase, in der das Endometrium stark proliferiert und vermehrt Östrogen- und Progesteronrezeptoren ausgebildet werden. (Hoozemans *et al.*, 2004). Progesteron hingegen ist für die Transformation und die Dezidualisierung des Endometriums in der Sekretionsphase, genauso wie für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Während der Sekretionsphase findet eine Umwandlung des endometrialen Stromas statt. Hierbei wandern vermehrt uterine natürliche Killerzellen (uNK Zellen) in das Endometrium ein. Eine Gefäßumwandlung im Endometrium wird durch die Bildung so genannter Spiralarterien eingeleitet (Gellersen *et al.*, 2007). Auf diese Weise bereiten Östrogen und Progesteron gemeinsam das Endometrium auf eine mögliche Implantation vor. Der rezep tive Zeitraum dauert nur wenige Tage an; das so genannte Implantationsfenster beim Menschen reicht nur etwa von Tag 20-24 des Zyklus (Wilcox *et al.*, 1999).

Außer Östrogen und Progesteron sind auch lokal sezernierte und parakrin wirkende Wachstumsfaktoren und Zytokine ganz wesentlich an der endometrialen Umwandlung beteiligt (Strowitzki *et al.*, 2006). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 ist eines der Hauptsekretionsprodukte dezidualisierter endometrialer Stromazellen und könnte eine Rolle in der Implantationsregulation spielen (Giudice *et al.*, 1999). Ein weiterer Faktor, der von endometrialen Stromazellen während der Dezidualisierung ansteigend sezerniert wird, ist Prolaktin (PRL). PRL scheint ebenso wie IGFBP-1 an der Regulation der Implantation und darüber hinaus noch an der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft beteiligt zu sein (Garzia *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Hochregulation von insulin-like growth factor (IGF)-1 in

der frühen Dezidualisierungsphase für die endometriale Rezeptivität wichtig zu sein scheint (Fluhr *et al.*, 2007).

Die Implantation – bestehend aus den drei Phasen Apposition, Adhesion und Invasion – ist ein komplizierter Prozess, dessen Erfolg nicht nur von der Qualität der Blastozyste und der Rezeptivität des Endometriums abhängt, sondern maßgeblich vom Zusammenspiel einer Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteuert wird (Singh *et al.*, 2011). Die Ursachen für Implantationsstörungen und habituelle Aborte sind vielfältig.

Von habituellen Aborten spricht man nach drei oder mehr Fehlgeburten im ersten Trimester einer Schwangerschaft. Rund 1% aller Frauen mit Kinderwunsch leiden unter habituellen Aborten (Rai und Regan, 2006). Fehlgeburten lassen sich grob in embryologische Ursachen (hauptsächlich aufgrund eines fehlerhaften embryonalen Karyotyps) und in mütterliche Ursachen einteilen, bei denen das Endometrium und/oder die Plazentation betroffen sind (Li *et al.*, 2002). Erkrankungen, die mütterliche Gründe für Implantationsstörungen hervorrufen können, sind angeborene oder erworbene Gerinnungsstörungen, Autoimmundefekte, endokrinologische Störungen und Defekte des Endometriums (Regan und Rai, 2000). Trotzdem bleibt die Ätiologie von etwa 50 % aller habituellen Aborte unbekannt (ESHRE Capri Workshop Group, 2008). Es wird vermutet, dass ein Teil dieser wiederholten Fehlgeburten immunologische Gründe hat. Die Leukozytenpopulation im Endometrium unterscheidet sich deutlich von der im Blutkreislauf. Im Endometrium befinden sich hauptsächlich T-Helferzellen (Th-Zellen), Makrophagen und uNK Zellen, deren Anzahl und Verhältnis im Verlauf des Menstruationszyklus variieren (Bulmer *et al.*, 1995). Diese dezidualen Immunzellen produzieren unter anderem die beiden inflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ , welche beide eine wichtige Rolle sowohl in der Physiologie als auch in der Pathologie von endometrialer Differenzierung und Implantation spielen (Haider und Knöfler, 2009; Murphy *et al.*, 2009).

TNF- α ist an der Regulation von Angiogenese, Apoptose, Proliferation, Differenzierung und der Anlockung von Leukozyten im Endometrium beteiligt (Haider und Knöfler, 2009). Der TNF- α Signalweg beginnt an den beiden membranständigen Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2, die typischerweise inflammatorische und apoptotische aber genauso Signalwege der Angiogenese und des Zellüberlebens aktivieren (Bradley, 2008). Das TNF- α Signal wird von den Rezeptoren auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B

weitergeleitet. Nachdem NF- κ B von seinem Inhibitor I κ B α durch dessen Degradation getrennt wurde, wird es phosphoryliert und in den Zellkern transloziert, um dort als Transkriptionsfaktor die Expression von Inflammations- oder Überlebenszytokinen zu initiieren (Yamamoto und Gaynor, 2001).

IFN- γ reguliert im humanen Endometrium verschiedene immunmodulatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-6, IL-8, IL-15, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) und macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Nasu *et al.*, 1998). Des Weiteren besitzt IFN- γ während des Menstruationszyklus einen regulierenden Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung des Endometriums (Christian *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass IFN- γ in Kombination mit TNF- α humane endometriale Stromazellen für Fas-vermittelte Apoptose sensibilisiert (Fluhr *et al.*, 2007). Durch die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor wird signal transducers and activators of transcription (STAT)-1 durch dessen Phosphorylierung und anschließender Translokation in den Zellkern aktiviert (Bach *et al.*, 1997).

Unfraktioniertes Heparin besitzt ein Molekulargewicht zwischen 5 und 30 kDa. Es besteht aus einem Gemisch an polysulfatierten Glykosaminoglykanen (Linhardt *et al.*, 1988), die dem Zuckermolekül eine negative Ladung verleihen. Aufgrund dieser Tatsache kann es mit positiv geladenen Proteinen interagieren. Seine antikoagulatorische Wirkung entfaltet das Molekül durch die Bindung von Antithrombin und die daraus resultierende Katalysierung des Faktors X sowie Thrombin. Ganz unabhängig von seinem antikoagulatorischen Wirkmechanismus treten *in vivo* vielfältige weitere biologische Aktivitäten auf (Linhardt *et al.*, 1992).

Niedermolekulare Heparine (NMHs) werden durch enzymatische oder chemische Depolymerisation aus unfraktioniertem Heparin hergestellt. Sie wirken hauptsächlich durch die Hemmung von Faktor Xa (Shriver *et al.*, 2000). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass unfraktioniertes Heparin genauso wie NMHs die Schwangerschaftsergebnisse bei Frauen, die unter Thrombophilie und Schwangerschaftskomplikationen wie wiederholten Fehlgeburten, Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsretardierung leiden, verbessern (Kutteh, 1996; Rai *et al.*, 1997). Die Vorstellung, dass Plazentathrombosen und -infarkte der Grund für die frühen Fehlgeburten sein könnten, forcierte die Idee der Verwendung von Heparin als Thromboseprophylaxe (Nelson und Greer, 2008). Überraschenderweise sind intravaskuläre oder intervillöse Blutgerinnsel in Plazentas des ersten Trimesters und

Deziduaprobe so gut wie nie nachweisbar (Sebire *et al.*, 2003). Auch bei Frauen mit habituellen Aborten unbekannten Ursprungs, die keine angeborenen Thrombophilien aufwiesen, konnte Heparin erfolgreich eingesetzt werden (Badaway *et al.*, 2008). In einer weiteren klinischen Studie wurden NMHs solchen Frauen verabreicht, die sich aufgrund wiederholten Implantationsversagens einem *in vitro* Fertilisationsprogramm unterzogen. Durch die Verabreichung dieser Präparate während der Lutealphase konnte eine Verbesserung der Implantationsrate und Lebendgeburtrate beobachtet werden (Urman *et al.*, 2009). Für die präventiven Effekte des Heparins an pathologischen Vorgängen der feto-maternalen Kontaktzone scheinen biologische Eigenschaften dieses Moleküls verantwortlich zu sein, die über seine klassische antikoagulatorische Wirkung hinausgehen. Dieses Konzept unterstreichen Untersuchungen, die Heparine als antiinflammatorische und immunmodulatorische Moleküle beschreiben, welche die Aktivität von natürlichen Killerzellen unterbinden (Johann *et al.*, 1995) oder die Rekrutierung von Leukozyten und deren Adhäsion an Blutgefäßwände inhibieren (Christopherson *et al.*, 2002). Heparin kann zudem die Funktion von Th-1 Zytokinen wie IFN- γ hemmen, indem es die Reaktion von Endothelzellen auf IFN- γ blockiert (Ranjbaran *et al.*, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Heparin auch auf direktem Weg Apoptose, Differenzierung und Motilität humaner Trophoblastzellen modulieren kann (Ganapathy *et al.*, 2007; Hills *et al.*, 2006). All diese Beobachtungen sind Grundlagen der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente. Hierin wurden die Effekte von Heparin auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen und dessen möglicher molekularer Wirkungsmechanismus untersucht. Weiterhin konnten solche Effekte, die Heparin direkt auf die Signalwege der beiden inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α im humanen Endometrium ausübt, nachgewiesen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebegewinnung und Zellkultur

Die endometrialen Gewebeproben wurden aus Hysterektomiepräparaten von Frauen gewonnen, bei denen diese Operation aus benignen Gründen durchgeführt wurde. Dazu wurde nach ausführlicher Aufklärung das schriftliche Einverständnis zur Verwendung der Gewebeproben eingeholt. Bei allen Patientinnen konnte ein regelmäßiger Menstruationszyklus und eine nachgewiesene Fertilität dokumentiert werden, weiterhin galten alle Patientinnen als gesund. Das Studienprotokoll ist von der Ethikkommission der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald anerkannt.

Die endometrialen Stromazellen (ESCs) wurden aus dem Gewebe isoliert, in Kultur gebracht und – wie in vorangegangenen Artikeln beschrieben – charakterisiert (Fluhr *et al.*, 2007). Die Verdauung des zerkleinerten endometrialen Gewebes erfolgte durch die Inkubation mit Kollagenase (Biochrom, Berlin, Deutschland). Mit Hilfe eines 40 µm Filters (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) wurden die Stromazellen von Epithelzellen und dem restlichen unverdauten Gewebe getrennt. Die Kultivierung der endometrialen Stromazellen erfolgte in 75 cm² Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in DMEM/F-12 Zellkulturmedium ohne Phenolrot (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), dem 10 % depletiertes fetales Kälberserum und 50 µg/ml Gentamycin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) hinzugefügt wurde. Die Reinheit der ESCs-Kulturen wurde durch die Immunfluoreszenzanfärbung von Vimentin überprüft.

2.2 Dezidualisierung *in vitro*

Die Dezidualisierung der ESCs *in vitro* wurde durch die Inkubation mit 30 nmol/l 17β-Östradiol und 1 µmol/l Progesteron (beide Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) über eine Zeitspanne von 9 bzw. 12 Tagen erreicht. Der Nachweis der Dezidualisierung erfolgte durch den signifikanten Anstieg von sezerniertem insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 und Prolaktin (PRL), wie es in Vorarbeiten beschrieben wurde (Fluhr *et al.*, 2007).

2.3 Cell Viability Assay

Die Zellviabilität während der Dezidualisierung und unter dem Einfluss der verwendeten Substanzen wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue™ Assays (Promega, Madison, WI, USA)

gemessen, der entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt wurde. Der Assay basiert auf der Fähigkeit von lebenden Zellen den Redoxfarbstoff Resazurin in fluoreszierendes Resorufin umzuwandeln. Nicht lebensfähige Zellen sind zu diesem Metabolismus nicht mehr in der Lage und zeigen aus diesem Grund keine Fluoreszenz. Zur Detektion des Fluoreszenzsignals wurde das Mikroplattenlesegerät FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) verwendet.

2.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

IL-6, IL-8, IGFBP-1, PRL und IGF-1 wurden in Zellkulturüberständen und IFN- γ in Zelllysaten mittels kommerziell erhältlichen ELISA Kits (IL-6, IL-8, IGFBP-1, PRL und IGF-1 R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland; IFN- γ BMS228HS, Bender MedSystems, Wien, Österreich) quantifiziert. Dabei handelte es sich um Sandwich-ELISAs, bei denen zwei Antikörper spezifisch an unterschiedliche Epitope des zu untersuchenden Antigens binden. An den zweiten Antikörper bindet eine Streptavidin-Meerrettichperoxidase, die das chromogene Substrat Tetramethylbenzidin umsetzt. Dabei ist die Farbintensität des Substrats proportional zur Antigenmenge. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerprotokollen. Signifikante Kreuzreaktionen konnten ausgeschlossen werden. Die Intra- bzw. Interassayschwankungen lagen unter 5%. Heparin und NMHs zeigten keine signifikante Interferenz bei den ELISA Messungen. Die Absorption wurde mit dem Mikroplattenlesegerät FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen.

2.5 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde das I κ B α Level im Zytoplasma und die IFN- γ Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche gemessen. Die Intrazellulärfärbung von I κ B α erfolgte mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon L35A5; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) nach vorangegangener Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol. Für die Extrazellulärfärbung des IFN- γ Rezeptors wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper (Klon MMHGR-1; PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) verwendet.

Die Durchführung erfolgte gemäß eines standardisierten (I κ B α Level; Krutzik und Nolan, 2003) bzw. eines von unserer Arbeitsgruppe bereits beschriebenen Protokolls (IFN- γ Rezeptorexpression; Fluhr *et al.*, 2007).

Der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 647 gekoppelte Zweitantikörper wurde von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) bezogen. Zur Überprüfung unspezifischer Bindungen wurden Isotypkontrollen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Messungen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCanto™ (BD Biosciences) durchgeführt. Die Analytik erfolgte durch die Software FACSDiva™ (BD Biosciences).

2.6 In-Cell Western Assay

Der In-Cell Western Assay basiert auf einer Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen und dient der Quantifizierung intrazellulärer Signalereignisse in ganzen Zellen. In unseren Experimenten wurde er verwendet, um die Menge an phosphoryliertem (Tyr701) STAT-1 in ESCs zu messen. Im Anschluss an die jeweiligen Experimente erfolgten eine Fixierung der Zellen mit 3,7%igem Formaldehyd und anschließend eine Permeabilisierung durch eiskaltes Methanol. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR®, Lincoln, NE) wurden die Zellen mit einem anti-phospho (Tyr701) STAT-1 Antikörper (Modelnr: 9171; Cell Signaling Technology, Danvers, USA) und einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye®800CW konjugierten Sekundärantikörper (LI-COR®, Lincoln, NE) inkubiert. Zur Normalisierung der einzelnen wells auf die darin enthaltene Zellzahl erfolgte zu jedem der Ansätze eine DNA-Färbung mittels DRAQ5™ (Biostatus Limited, Shepshed, United Kingdom). Visualisiert und analysiert wurde der Assay mit einem LI-COR® Odyssey® Infrarot-Detektionsgerät (LI-COR®, Lincoln, NE).

2.7 Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (real-time RT-PCR)

Im Anschluss an die jeweiligen Vorbehandlungen erfolgte eine RNA-Isolation durch Einsatz des PeqGOLD TriFast™ Reagenzes (PeqLab, Erlangen, Deutschland) entsprechend des Herstellerprotokolls. Die sich anschließende cDNA-Synthese wurde mittels eines High Capacity cDNA Archive Kits (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Level von IL-6, IL-8, IRF-1, Nmi, IGFBP-1, PRL, IGF-1 wurden mit Hilfe der real-time RT-PCR bestimmt. Alle Expressionswerte wurden zur Normierung auf das Haushaltsgen β -Aktin bezogen. Die Amplifikation der cDNA-Proben erfolgte in einem Ansatz aus den entsprechenden Primern im kommerziell erhältlichen Power SYBR® Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Primer wurden durch die Software Primer Express® Primer Design Software v2.0

(Applied Biosystems) erstellt und durch die Firma Invitrogen synthetisiert. Um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen, wurden ausschließlich intronüberspannende Sequenzen generiert. Die PCR Amplifikation wurde in Duplikaten in einem ABI Prism™ 7300 Sequenzdetektor (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Dafür wurde ein bereits beschriebenes Standardprotokoll (Fluhr *et al.*, 2007) verwendet. Um die Spezifität des Amplifikationsprozesses zu überprüfen, wurden die PCR Produkte durch eine thermische Dissoziation analysiert. Die relative Expression der untersuchten Gene im Verhältnis zu β -Aktin wurde nach folgender Formel berechnet: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak und Schmittgen, 2001).

Auflistung der Sequenzen der verwendeten Primer:

β -Aktin forward	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'
β -Aktin reverse	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
IGFBP-1 forward	5'-TACCTGCCAAACTGCAACAAGA-3'
IGFBP-1 reverse	5'-CCATGGATGTCTCACACTGTCTG-3'
PRL forward	5'-CACCCCCGAAGACAAGGAG-3'
PRL reverse	5'-CCAGGATCGCAATATGCTGAC-3'
IGF-1 forward	5'-AGTCAGCTCGCTCTGTCCGT-3'
IGF-1 reverse	5'-TGCGTTCTTCAAATGTACTTCCTT-3'
IRF-1 forward	5'-CATTACACAGGCCGATACAAA-3'
IRF-1 reverse	5'-AGCGAAAGTTGGCCTTCCA-3'
Nmi forward	5'-ACCGCGTGGACTATGACAGAC-3'
Nmi reverse	5'-TTGTCAGCCACTCCAATCTCC-3'
IL-8 forward	5'-TCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3'
IL-8 reverse	5'-TTAGCACTCCTTGGCAAAACTG-3'
IL-6 forward	5'-TGGCAGAAAACAACCTGAACCT-3'
IL-6 reverse	5'-ACCAGGCAAGTCTCCTCATTGA-3'

2.8 Cyclisches Adenosin 3', 5'- Monophosphat Assay

An Tag 3 und Tag 12 der Dezidualisierung wurden die intrazellulären cAMP-Level mittels cAMP-Glo™ Assay (Promega, Madison, WI, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers gemessen. Hierbei katalysiert eine Luciferase die ATP-abhängige Umsetzung des Substrats Luciferin, wobei es in einem Oxidationsprozess neben der

Freisetzung von Kohlendioxid und AMP zur Biolumineszenz kommt, die photometrisch erfasst werden kann. Abhängig von der intrazellulären ATP-Konzentration, die indirekt einen Anhaltspunkt über die intrazellulär vorherrschende cAMP-Konzentration gibt, verändert sich die Lichtemission mehr oder weniger stark. Zur Messung der Lumineszenz wurde das Mikroplattenlesegerät FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) verwendet.

2.9 Transkriptionsfaktor Assay

Die für die nachfolgenden Transkriptionsfaktor Assays benötigten Zellkernlysate wurden mit Hilfe des Nuclear Extract Kits (Active Motif, Rixensart, Belgien) gewonnen. Im Anschluss daran erfolgte eine Bestimmung der Proteinmenge durch das ProStain™ Kit (Active Motif, Rixensart, Belgien) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Menge an aktivem NF- κ B sowie Sp1 im Zellkernlysate wurde mit den Transkriptionsfaktor Assay Kits TransAM™ Chemi NF- κ B p65 und TransAM™ Sp1 (beide Active Motif, Rixensart, Belgien) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Die Assays enthalten 96-well Mikroplatten, deren wells mit der konsensuellen DNA-Bindungssequenz von NF- κ B (5'-GGGACTTTCC-3') bzw. Sp1 (5'-GGGGCGGGG-3') beschichtet sind. Zur Überprüfung der Spezifität des Assays wurden Kontrollen mit Wildtyp- bzw. mutierten Oligonukleotiden durchgeführt. Das Lumineszenzsignal wurde durch das Mikroplattenlesegerät FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) erfasst.

2.10 Statistik

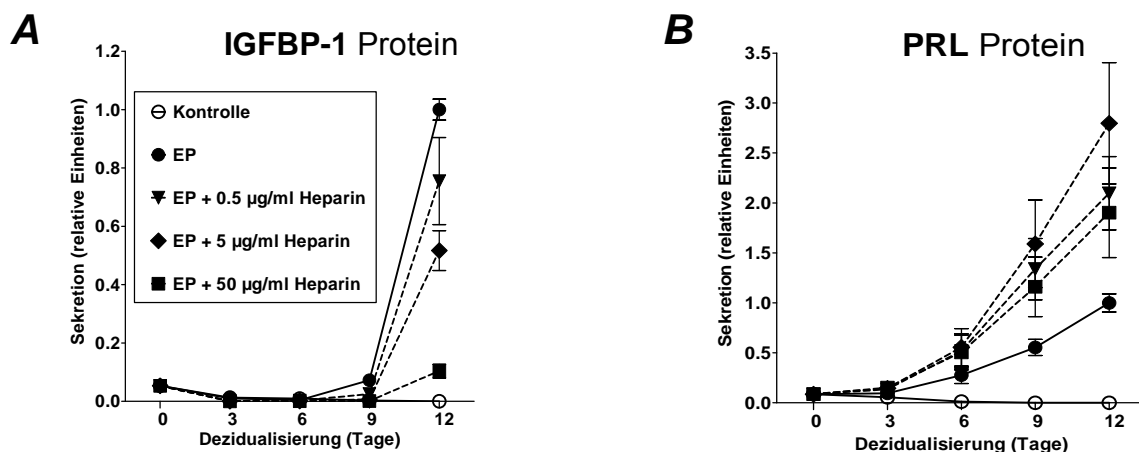
Jede Experimentbedingung wurde in Triplikaten oder Quadruplikaten durchgeführt. Dabei wurden alle Experimente mit drei bis fünf aus verschiedenen Patientinnen stammenden Zellkulturen wiederholt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad PRISM Version 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Zur Testung des Signifikanzniveaus kamen one-way ANOVAs gefolgt von den multiplen Vergleichstests nach Dunnett und Bonferroni zum Einsatz. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) dargestellt. Der Unterschied zweier Werte galt als signifikant wenn $p < 0.05$ war.

3. Ergebnisse

3.1 Heparin und Dezidualisierung

3.1.1 Heparin moduliert dosisabhängig IGFBP-1, PRL und IGF-1 in dezidualisierenden ESCs *in vitro*

Wir untersuchten den Einfluss von Heparin auf IGFBP-1, PRL und IGF-1, da sie als relevante Marker der Dezidualisierung gelten. Die Dezidualisierung der Zellen erfolgte mit 30 nmol/l 17β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron (EP). Simultan hierzu wurden die Zellen mit unfraktioniertem Heparin in den Konzentrationen von 0.5, 5 und 50 μ g/ml inkubiert. Unter alleiniger EP Stimulation stellte sich der während der Dezidualisierung zu erwartende Anstieg von IGFBP-1 und PRL ein. Die Zugabe von Heparin führte über den Zeitverlauf von 12 Tagen zu einer dosisabhängigen Abnahme der IGFBP-1 Sekretion. Bei einer Heparinkonzentration von 50 μ g/ml erschien dieser Effekt so stark, dass an Tag 12 kein signifikanter Anstieg von IGFBP-1 mehr zu erkennen war (Abb. 1 A). Im Gegensatz dazu steigerte Heparin konzentrationsabhängig die Freisetzung von PRL (Abb. 1 B). Das typische Sekretionsmuster von IGF-1 mit einem Anstieg von Tag 0 bis Tag 6 gefolgt von einem Abfall hin zu Tag 12 wurde durch die Zugabe von Heparin dosisabhängig gesteigert (Abb. 1 C). Die Bestimmung der mRNA Expression zeigte übereinstimmende Ergebnisse bei IGFBP-1 und PRL an Tag 12 (Abb. 1 D und 1 E) und IGF-1 an Tag 3 (Abb. 1 F). Die Zellviabilität wurde durch die Inkubation mit Heparin über das gesamte Zeitintervall von 12 Tagen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).



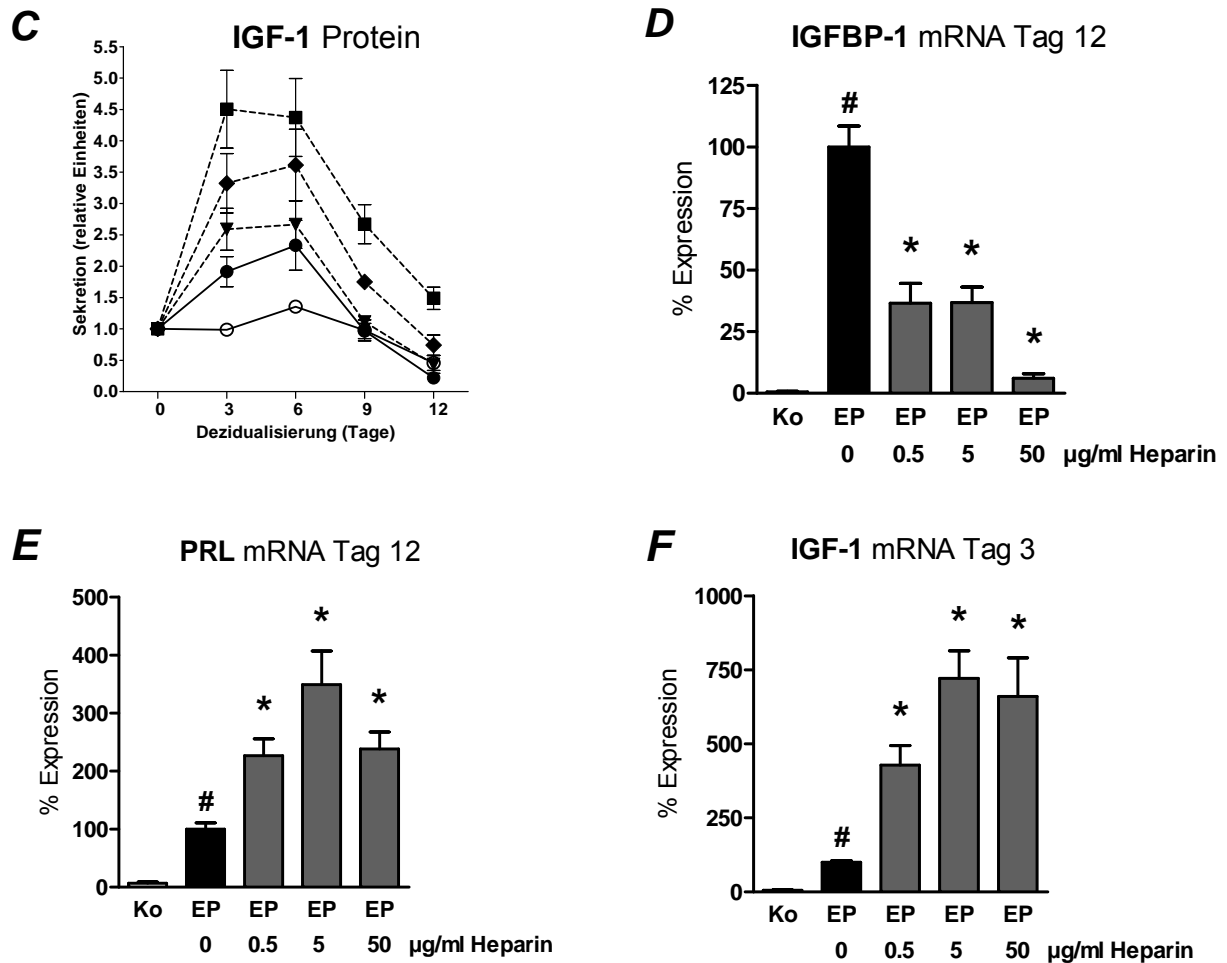


Abb. 1: Heparin moduliert in vitro dosisabhängig IGFBP-1, PRL und IGF-1. In den Zellkulturüberständen wurde die Sekretion von (A) IGFBP-1, (B) PRL und (C) IGF-1 an Tag 0, 3, 6, 9 und 12 mittels ELISA gemessen. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron (EP) dezidualisiert und simultan mit 0.5, 5 und 50 μ g/ml unfraktioniertem Heparin inkubiert. Als Kontrolle (Ko) dienten ESCs, die keine Hormon- oder Heparinzugabe erfuhren. Die Werte von Tag 12 (IGFBP-1 und PRL) bzw. Tag 0 (IGF-1) wurden als relative Einheiten mit dem Wert 1 normiert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert drei verschiedener Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat ausgeführt wurde. Die mRNA Expression von (D) IGFBP-1, (E) PRL und (F) IGF-1 wurde an Tag 9 (IGFBP-1 und PRL) und Tag 3 (IGF-1) mittels real-time RT-PCR gemessen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert vier verschiedener Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat ausgeführt wurde. Die Werte von EP wurden 100% gesetzt. # $p < 0.05$ EP vs. Kontrolle (Ko), * $p < 0.05$ EP + Heparin vs. EP.

3.1.2 Heparineffekte auf IGFBP-1, PRL und IGF-1 sind zeitabhängig

Um eine Zeitabhängigkeit der beobachteten Heparineffekte zu überprüfen, wurde der Zugabezeitpunkt von Heparin in der Konzentration von 5 μ g/ml während des

3. Ergebnisse

Zeitverlaufs der Dezidualisierung variiert. Je früher die Zugabe von Heparin erfolgte, desto ausgeprägter waren der inhibierende Effekt auf die IGFBP-1 Sekretion (Abb. 2 A) sowie die steigernde Wirkung auf die PRL Sekretion (Abb. 2 B). Durch die verzögerte Zugabe von Heparin zeigte sich auch ein verzögerter Anstieg der IGF-1 Sekretion (Fig. 2 C). Dieser zeitabhängige Einfluss von Heparin auf IGFBP-1, PRL und IGF-1 konnte auch auf Transkriptionsebene verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

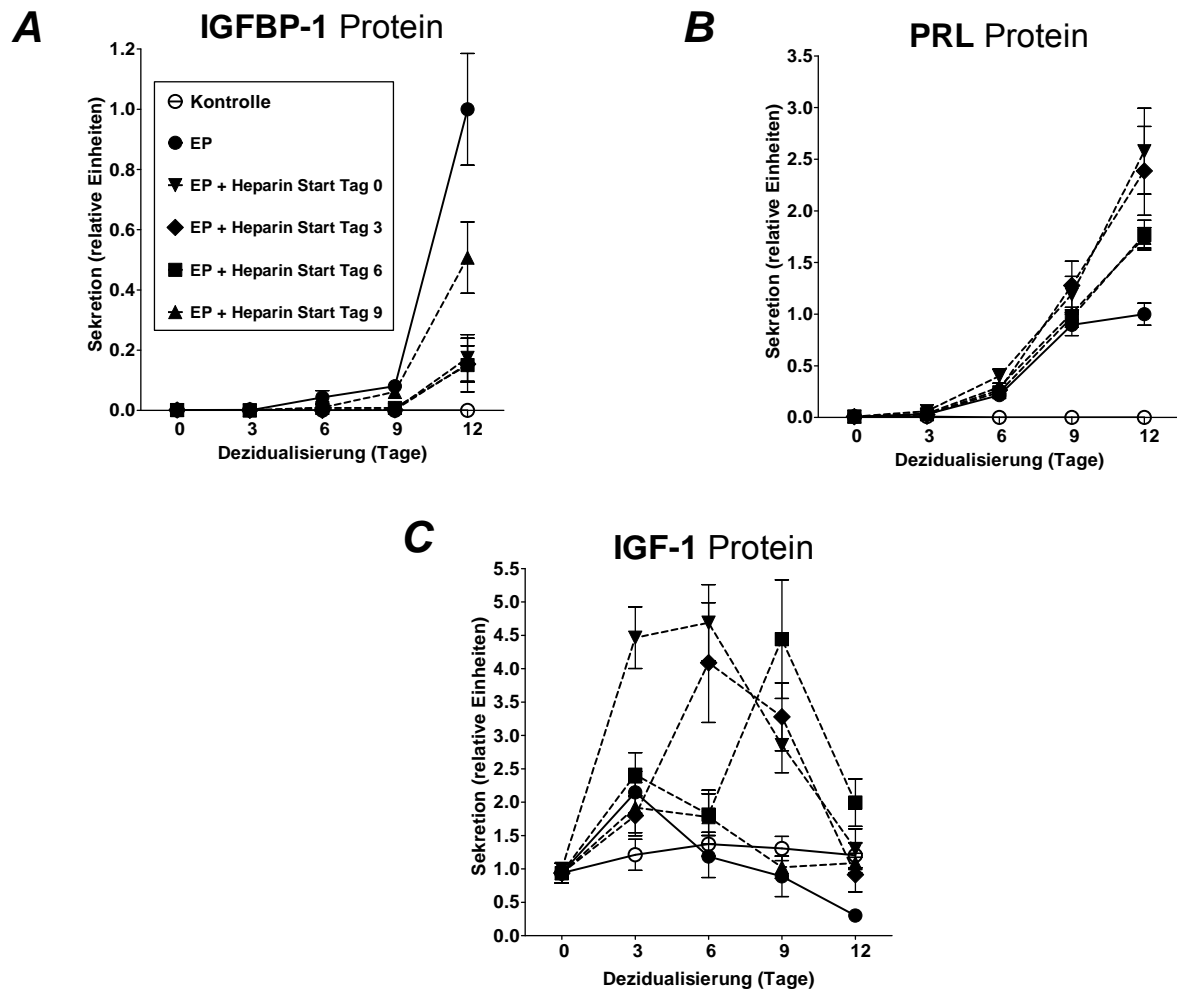


Abb. 2: Zeitabhängige Effekte von Heparin auf IGFBP-1, PRL und IGF-1. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron alleine (EP) oder in Kombination mit 5 μ g/ml unfraktioniertem Heparin über einen Zeitraum von 12 Tagen dezidualisiert. Die Zugabe von Heparin erfolgte gestaffelt ab Tag 0, 3, 6 oder 9. ESCs ohne Hormon- oder Heparinzugabe dienten als Kontrolle. Mittels ELISA wurde die Menge an sezerniertem (A) IGFBP-1, (B) PRL und (C) IGF-1 in den Zellkulturüberständen gemessen. Die Werte von Tag 12 (IGFBP-1 und PRL) bzw. Tag 0 (IGF-1) wurden als relative Einheiten mit dem Wert 1 normiert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von vier verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat ausgeführt wurde.

3.1.3 Niedermolekulare Heparine (NMHs) modulieren IGFBP-1, PRL und IGF-1 während der Dezidualisierung *in vitro*

Der Einfluss der NMHs Enoxaparin, Dalteparin und Certoparin (jeweils 1IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml) auf die Dezidualisierung von ESCs wurde ebenfalls *in vitro* untersucht. Ähnlich wie bei unfraktioniertem Heparin führte die Zugabe aller drei NMHs über einen Zeitraum von 12 Tagen zu einem verminderten Anstieg der IGFBP-1 Sekretion (Abb. 3 A) sowie zu einer signifikanten Steigerung der PRL und IGF-1 Sekretion (Abb. 3 B und 3 C).

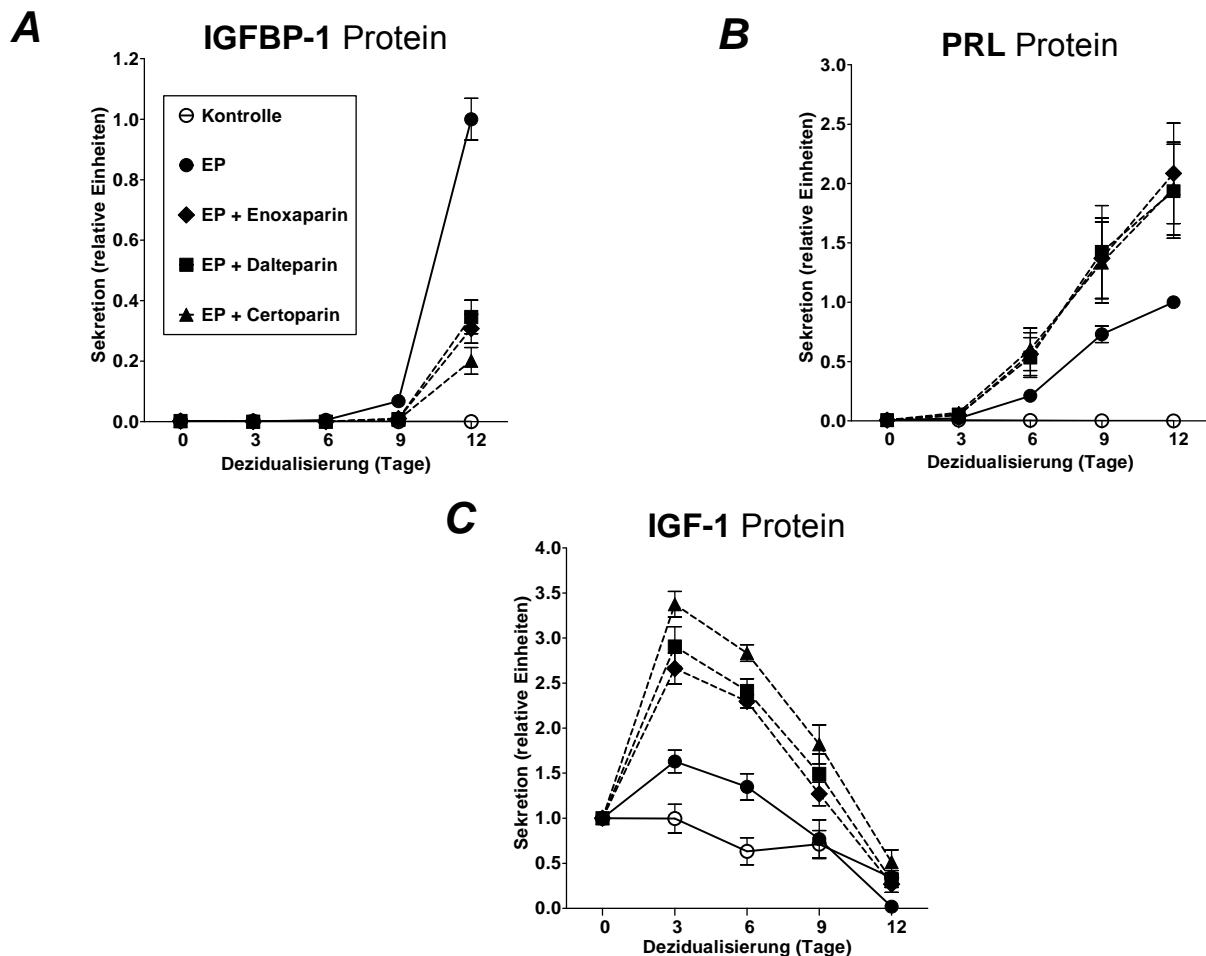


Abb. 3: Während der Dezidualisierung modulieren niedermolekulare Heparine (NMHs) IGFBP-1, PRL und IGF-1. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron alleine (EP) oder unter Zugabe von Enoxaparin, Dalteparin oder Certoparin mit einer Konzentration von 1IU Faktor anti-Xa Aktivität/ml über einen Zeitraum von 12 Tagen dezidualisiert. ESCs ohne Hormonzugabe oder der Zugabe von NMHs dienten als Kontrolle. Die Werte von Tag 12 (IGFBP-1 und PRL) bzw. Tag 0 (IGF-1) wurden als relative Einheiten mit dem Wert 1 normiert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von drei verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat durchgeführt wurde.

3.1.4 Heparin und NMHs führen zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel in dezidualisierten ESCs

Unter der Zugabe von Heparin und NMHs wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel während der frühen (Tag 3) und der späten Phase (Tag 12) der Dezidualisierung gemessen. An Tag 3 zeigten sich sowohl unter der Kontrollbedingung als auch unter der Dezidualisierung gleichartig niedrige Level an intrazellulärem cAMP (Daten nicht gezeigt). An Tag 12 wurde in dezidualisierten ESCs ein signifikanter Anstieg an intrazellulärem cAMP sichtbar, der durch die Zugabe von 5 µg/ml Heparin und NMHs (jeweils 1IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml) signifikant gesteigert werden konnte (Abb. 4).

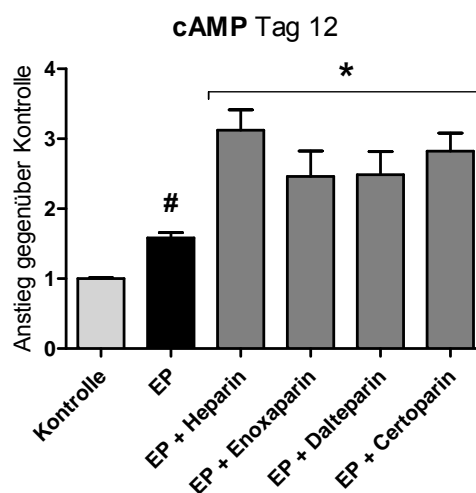


Abb. 4: Heparin und NMHs erhöhen intrazelluläre cAMP-Spiegel. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17β-Östradiol und 1 µmol/l Progesteron (EP) über einen Zeitraum von 12 Tagen dezidualisiert. Es erfolgte eine Inkubation mit 5 µg/ml unfraktioniertem Heparin oder Enoxaparin, Dalteparin oder Certoparin in einer Konzentration von jeweils 1IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml. ESCs ohne Hormon- oder Heparinbehandlung dienten als Kontrolle. An Tag 12 wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel mit Hilfe eines lumineszenzbasierten Assays gemessen. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert von fünf verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Sextuplikat ausgeführt wurde. [#]p<0.05 EP vs. Kontrolle, *p<0.05 Bedingungen mit Heparin vs. EP.

3.2 Mechanistische Untersuchungen des Heparineffekts

3.2.1 Einfluss von Thrombin und Faktor Xa (FXa) auf IGF-1 während der Dezidualisierung

Als Antikoagulant hemmt Heparin die beiden Gerinnungsfaktoren Thrombin und FXa. Wir untersuchten, ob diese Gerinnungsfaktoren einen Einfluss auf die Dezidualisierung *in vitro* haben. Wie in den zuvor durchgeführten Experimenten erfolgte parallel zur Dezidualisierung mittels 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron (EP) eine Inkubation der ESCs mit 1 IU/ml Thrombin oder 0.5 IU/ml Faktor Xa über 3 Tage. Thrombin und Faktor Xa führten gegenüber der alleinigen hormonellen Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der IGF-1 Sekretion (Abb. 5).

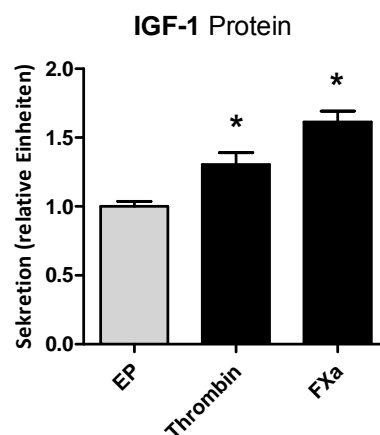


Abb. 5: Einfluss von Thrombin und Faktor Xa auf die IGF-1-Sekretion. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron alleine (EP) oder unter Zugabe von 1 IU/ml Thrombin oder 0.5 IU/ml Faktor Xa dezidualisiert. An Tag 3 wurde in den Zellkulturüberständen die IGF-1 Sekretion mittels ELISA gemessen. Die Werte für EP wurden als relative Einheiten durch den Wert 1 normiert; alle anderen Werte wurden als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. * $p < 0.05$ im Vergleich zu EP.

3.2.2 Heparin, Dextransulfat und Danaparoid zeigen unterschiedliche Effekte

Um zu testen, ob der beobachtete Effekt in Verbindung mit der antikoagulatorischen Wirkung von Heparin steht, oder ob ein eigenständiger Mechanismus dafür verantwortlich ist, kam in den Folgeexperimenten Dextransulfat zum Einsatz. Dextransulfat ist ein polysulfatiertes lineares Zuckermolekül, welches dieselbe

Molekulargewichtsverteilung wie Heparin aufweist. Allerdings besitzt es keine antikoagulatorische Wirkung. ESCs zeigten bei Inkubation mit Dextransulfat einen ähnlich starken Anstieg der IGF-1 Sekretion wie dies bei der Inkubation mit Heparin beobachtet werden konnte.

Danaparoid ist ein Heparinoid mit anti-Faktor Xa Aktivität. Es besteht aus einem Gemisch aus polysulfatierten Glykosaminoglykanen, die aber nur etwa halb so viele negative Ladungsträger wie Heparin oder Dextransulfat besitzen. Die Inkubation mit Danaparoid zeigte ebenfalls eine Stimulation der IGF-1 Sekretion, die allerdings signifikant geringer ausfiel, als die unter Heparin (Abb.6).

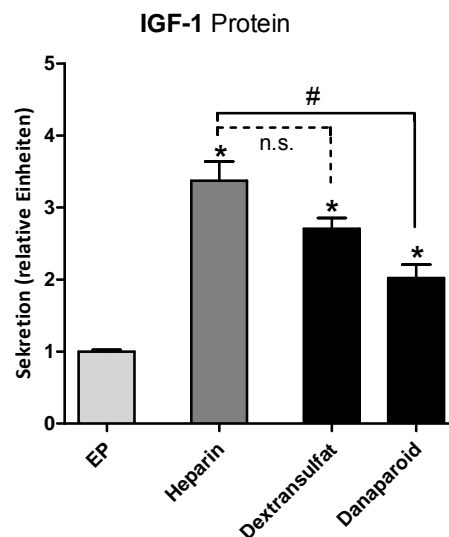


Abb. 6: Unterschiedliche Effekte von Heparin, Dextransulfat und Danaparoid auf die IGF-1 Sekretion. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron alleine (EP) oder unter Zugabe von Heparin, Dextransulfat oder Danaparoid (jeweils 5 μ g/ml) dezidualisiert. An Tag 3 wurde in den Zellkulturüberständen die IGF-1 Sekretion mittels ELISA gemessen. Die Werte für EP wurden durch den Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. * $p < 0.05$ jede Bedingung vs. EP, # $p < 0.05$ Dextransulfat und Danaparoid vs. Heparin.

3.2.3 Verschiedene NMHs haben unterschiedliche Effekte auf IGF-1

Um die Rolle der antikoagulatorischen Eigenschaft, der Molekülgröße und der Menge an negativer Ladung auf die heparinvermittelten Effekte der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen zu klären, untersuchten wir den Einfluss von NMHs mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Die Zugabe von Dalteparin, Enoxaparin und

3. Ergebnisse

Reviparin sowie des selektiven Faktor Xa Inhibitors Fondaparinux erfolgte wiederum parallel zur Dezidualisierung. An Tag 3 wurde die IGF-1 Sekretion gemessen und mit den Werten der Heparinbehandlung verglichen. Der IGF-1 Sekretionsanstieg unter der Behandlung mit Dalteparin, Enoxaparin und Reviparin, die in derselben antikoagulatorisch potenten Dosis wie das unfractionierte Heparin (1 IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml) eingesetzt wurden, fiel deutlich geringer aus als unter der Behandlung mit unfractioniertem Heparin. Fondaparinux zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die IGF-1 Sekretion in dezidualisierenden ESCs (Abb. 7 A).

Ähnliche Ergebnisse konnten nach Zugabe der NMHs und Fondaparinux in einer einheitlichen Dosis von je 5 µg/ml beobachtet werden. Wieder führten Dalteparin, Enoxaparin und Reviparin, im Vergleich zur Behandlung mit unfractioniertem Heparin, zu einer weniger starken Steigerung der IGF-1 Sekretion. Unter Zugabe von Fondaparinux als kleinstem Molekül kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der IGF-1 Sekretion (Abb. 7 B).

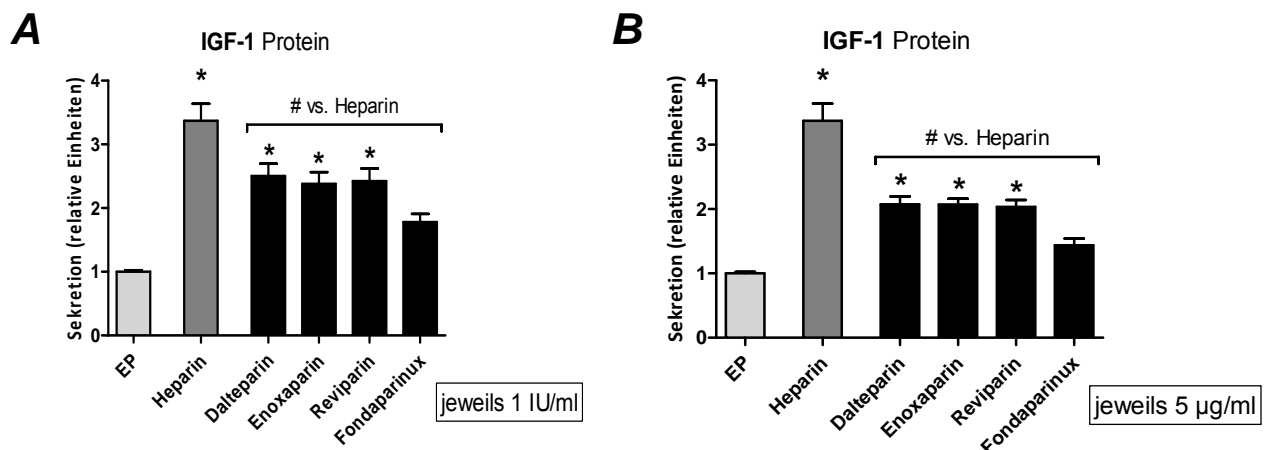


Abb. 7: Effekte verschiedener NMHs auf die IGF-1-Sekretion. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 µmol/l Progesteron alleine (EP) oder unter Zugabe von Heparin, Dalteparin, Enoxaparin, Reviparin oder Fondaparinux dezidualisiert. Die verwendeten Konzentrationen waren (A) jeweils 1 IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml und (B) jeweils 5 µg/ml. An Tag 3 wurde in den Zellkulturüberständen die IGF-1 Sekretion mittels ELISA gemessen. Die Werte für EP wurden mit dem Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. * $p < 0.05$ jede Bedingung vs. EP, # $p < 0.05$ Dalteparin, Enoxaparin, Reviparin und Fondaparinux vs. Heparin.

3.2.4 Dosisabhängigkeit des Einfluss von Heparin auf dezidualisierende ESCs

Endometriale Stromazellen wurden mit 30 nmol/l 17β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron (EP) in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin (0-102.4 IU/ml) inkubiert. An Tag 3 wurde die Sekretion von IGF-1 mittels ELISA gemessen. Unfraktioniertes Heparin führte ab einer Konzentration von 0.4 IU/ml zu einem signifikanten Anstieg der hormoninduzierten IGF-1 Sekretion. Höhere Dosen als 0.4 IU/ führten zu einer nur geringfügigeren Zunahme der IGF-1 Sekretion (Abb. 8).

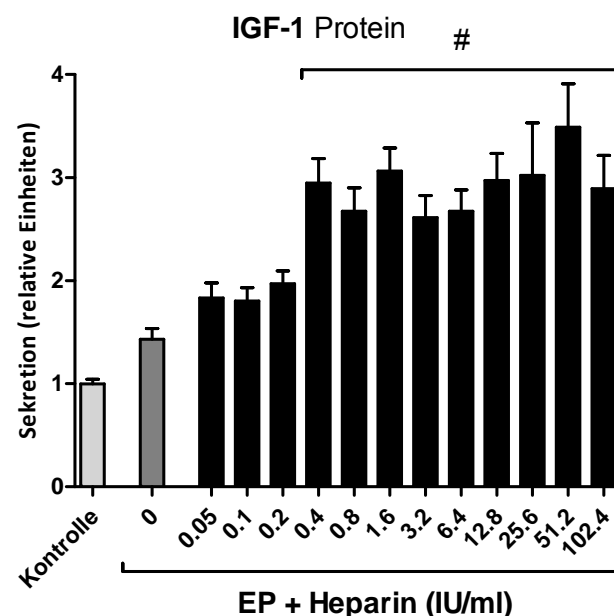


Abb. 8: Dosisabhängiger Effekt von Heparin auf die Sekretion von IGF-1. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron (EP) über 3 Tage dezidualisiert. Parallel erfolgte eine Inkubation mit unfraktioniertem Heparin in aufsteigender Dosierung (0-102.4 IU/ml). ESCs ohne Hormon- oder Heparinbehandlung dienten als Kontrolle. Mittels ELISA wurde in den Zellkulturüberständen die IGF-1 Sekretion gemessen. Die Werte für die Kontrollzellen wurden durch den Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. # $p < 0.05$ EP + Heparin vs. EP.

3.2.5 Effekte von Dextransulfat auf Marker der Dezidualisierung

Durch die Dezidualisierung von ESCs mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron (EP) in Kombination mit Heparin bzw. Dextransulfat (jeweils 5 μ g/ml) über 12 Tage wurde der Einfluss von Dextransulfat auf die Marker der späten Dezidualisierung IGFBP-1 und PRL untersucht. In ähnlicher Weise wie unfractioniertes Heparin führte Dextransulfat zu einer signifikanten Reduktion des physiologischen IGFBP-1 Sekretionsanstieges (*Abb. 9 A*) sowie zu einer signifikanten Erhöhung der PRL Sekretion (*Abb. 9 B*).

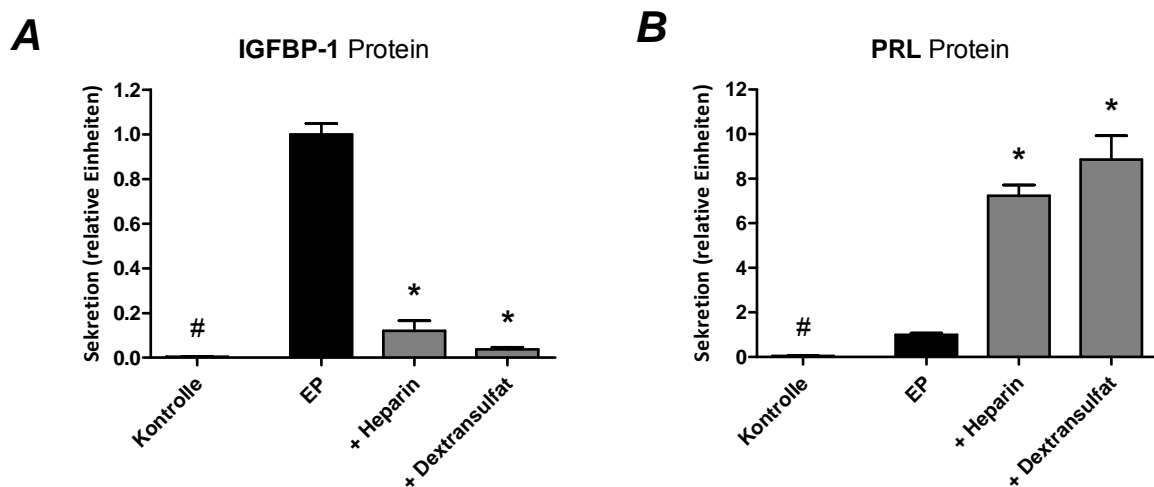


Abb. 9: Einfluss von Dextransulfat auf IGFBP-1 und PRL Sekretion. ESCs wurden mit 30 nmol/l 17 β -Östradiol und 1 μ mol/l Progesteron alleine (EP) oder unter Zugabe von Heparin oder Dextransulfat (jeweils 5 μ g/ml) dezidualisiert. ESCs ohne Behandlung dienten als Kontrolle. An Tag 12 wurde die Sekretion von (A) IGFBP-1 und (B) PRL mittels ELISA in den Zellkulturüberständen gemessen. Die Werte für EP wurden mit dem Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. #p und *p<0.05 verglichen mit EP.

3.3 Einfluss von Heparin auf den IFN- γ Signalweg

3.3.1 Heparine hemmen die IFN- γ vermittelte Hochregulation des interferon response factor (IRF)-1 aber nicht des N-myc interactor (Nmi)

IRF-1 und Nmi sind repräsentative Vertreter so genannter IFN- γ Zielgene. Wir untersuchten den Effekt von Heparin auf diese zwei Gene, indem wir dezidualisierte ESCs mit IFN- γ (0.4 ng/ml und 50 ng/ml) alleine oder in Kombination mit 5 μ g/ml unfraktioniertem Heparin stimulierten. Die Heparinbehandlung verminderte den stimulierenden Effekt von 0.4 μ g/ml IFN- γ auf die IRF-1 Expression signifikant. Allerdings hatte Heparin keinen Effekt, wenn die Stimulation mit einer Konzentration von 50 μ g/ml IFN- γ erfolgte (Abb. 10 A).

Interessanterweise zeigten sich durch Heparin auf die IFN- γ induzierte Hochregulation der Expression von Nmi keine signifikanten Veränderungen (Abb. 10 B).

Zusätzlich zu Heparin untersuchten wir den Einfluss der drei NMHS Enoxaparin, Dalteparin und Certoparin auf die IFN- γ vermittelte Geninduktion von IRF-1 und Nmi. Enoxaparin, Dalteparin und Certoparin hemmten die Hochregulation der IRF-1 Expression im IFN- γ Niedrigdosisbereich ohne einen Effekt auf die Expression von Nmi zu haben (Abb. 11 A und 11 B). Die Inkubation der Zellen mit NMHS alleine hatte keinen Einfluss auf IRF-1 und Nmi (Daten nicht gezeigt).

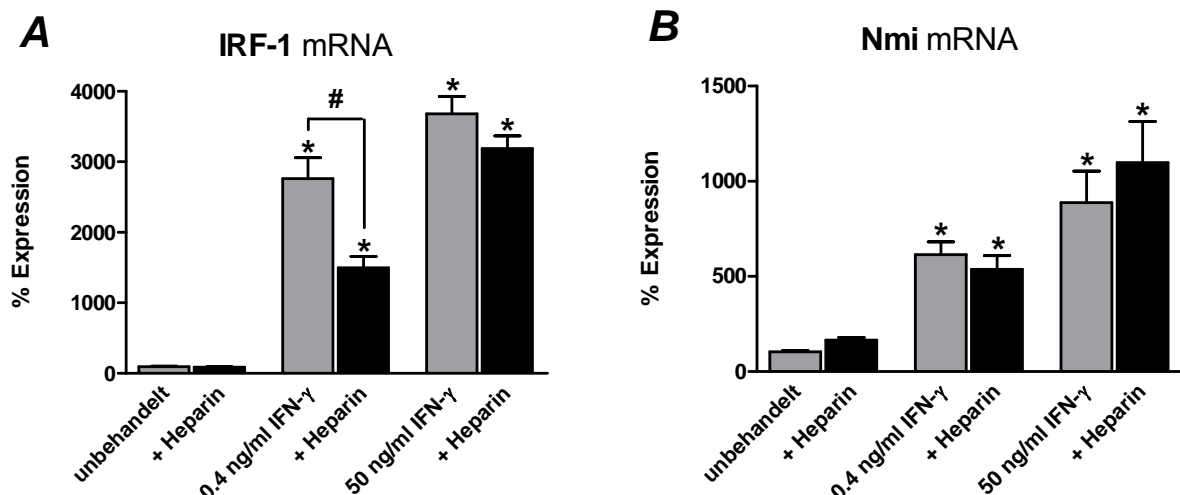


Abb. 10: Heparinvermittelte Effekte auf die IFN- γ Zielgene IRF-1 und Nmi. Dezidualisierte ESCs wurde für 6 Stunden mit rekombinantem IFN- γ alleine (graue Balken) oder in Kombination mit 5 μ g/ml Heparin (schwarze Balken) inkubiert. Die mRNA Expression von (A) IRF-1 und (B) Nmi wurde mittels

3. Ergebnisse

real-time RT-PCR gemessen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von vier verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat durchgeführt wurde. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden 100% gesetzt. # $p < 0.05$ IFN- γ vs. IFN- γ + Heparin, * $p < 0.05$ jede Bedingung vs. unbehandelt.

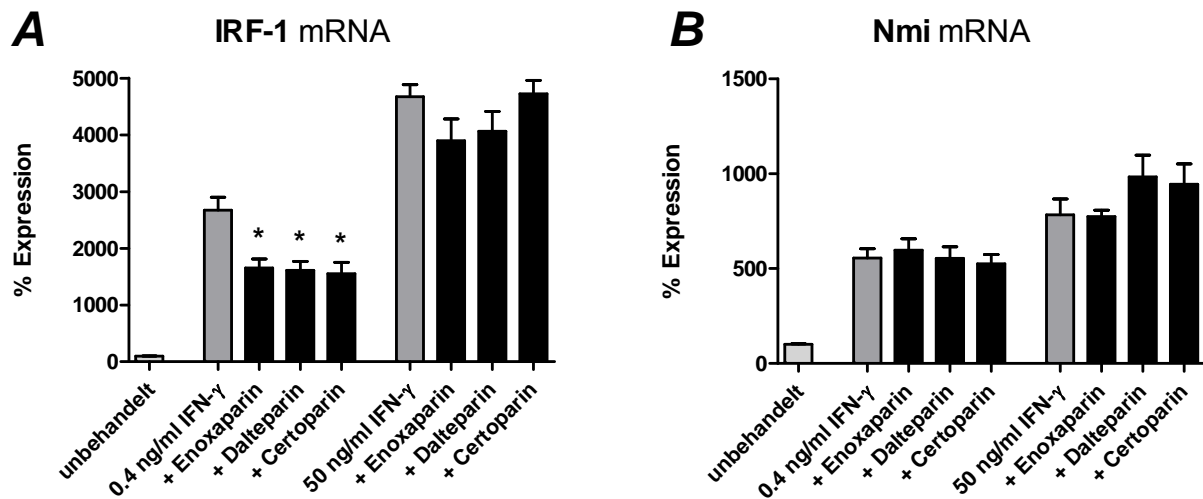


Abb. 11: Effekte von Enoxaparin, Dalteparin und Certoparin auf die IFN- γ Zielgene IRF-1 und Nmi. Dezidualisierte ESCs wurde für 6 Stunden mit rekombinantem IFN- γ alleine (graue Balken) oder in Kombination mit Enoxaparin, Dalteparin oder Certoparin in einer jeweiligen Konzentration von 1IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml (schwarze Balken) inkubiert. Die mRNA Expression von (A) IRF-1 und (B) Nmi wurde mittels real-time RT-PCR gemessen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von drei verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat ausgeführt wurde. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden 100% gesetzt. * $p < 0.05$ 0.4 ng/ml IFN- γ vs. 0.4 ng/ml IFN- γ + Enoxaparin, Dalteparin und Certoparin.

3.3.2 Hemmung der IFN- γ vermittelten Phosphorylierung von STAT-1 durch Heparin

Wir analysierten die Auswirkung von Heparin auf die Phosphorylierung und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-1. Dazu wurden undifferenzierte und dezidualisierte ESCs mit einer ansteigenden Dosis von IFN- γ (0-50 $\mu\text{g/ml}$) mit und ohne 5 $\mu\text{g/ml}$ unfraktioniertem Heparin behandelt. Heparin führte zu einer signifikanten Verminderung der STAT-1 Phosphorylierung bei 0.4 $\mu\text{g/ml}$ und 2 $\mu\text{g/ml}$ IFN- γ . Kein Effekt zeigte sich bei höheren Dosen von IFN- γ (10 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 12).

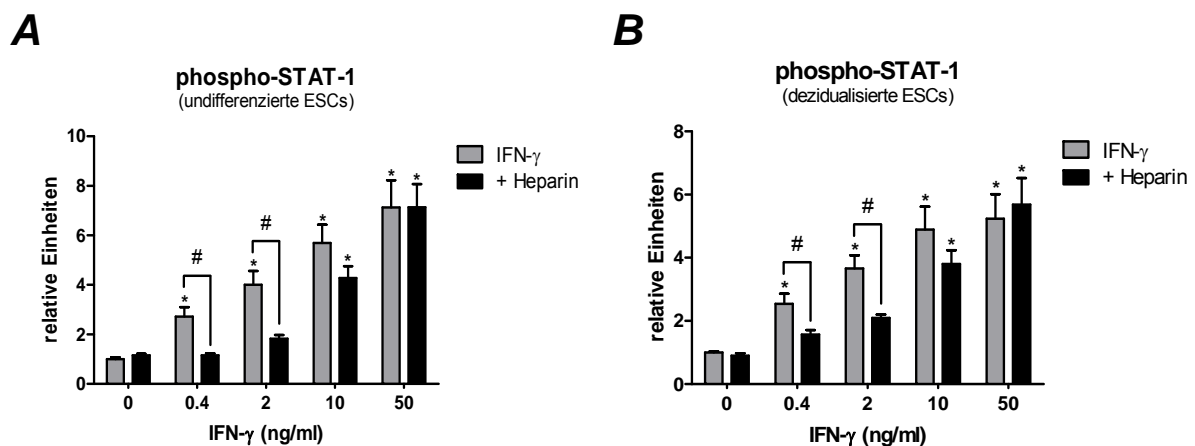


Abb. 12: Einfluss von Heparin auf die IFN- γ vermittelte Phosphorylierung von STAT-1. (A) Undifferenzierte und (B) dezidualisierte ESCs wurde für 20 Minuten mit rekombinantem IFN- γ alleine (graue Balken) oder in Kombination mit 5 $\mu\text{g/ml}$ unfraktioniertem Heparin (schwarze Balken) inkubiert. Mittels In-Cell Western Assay wurde die intrazelluläre Menge an phosho-STAT-1 quantifiziert. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von drei verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Quadruplikat ausgeführt wurde. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden durch den Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. # $p < 0.05$ IFN- γ vs. IFN- γ + Heparin, * $p < 0.05$ jede Bedingung vs. unbehandelt (0).

3.3.3 Heparin interferiert mit IFN- γ bei der Bindung an seinen Rezeptor

Zur Untersuchung, ob Heparin Auswirkungen auf die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor hat, wurden undifferenzierte ESCs über eine Zeitspanne von 60 Minuten mit 2 ng/ml IFN- γ alleine oder in Kombination mit 5 μ g/ml Heparin inkubiert. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Heparin den Anstieg von zellgebundenem IFN- γ signifikant verminderte (Abb. 13 A). Außerdem kam es bei der Inkubation mit ansteigenden Dosen an IFN- γ (0.4-50 μ g/ml) in Kombination mit 5 μ g/ml Heparin sogar im Hochdosisbereich zu einer Verminderung an zellgebundenem IFN- γ (Abb. 13 B).

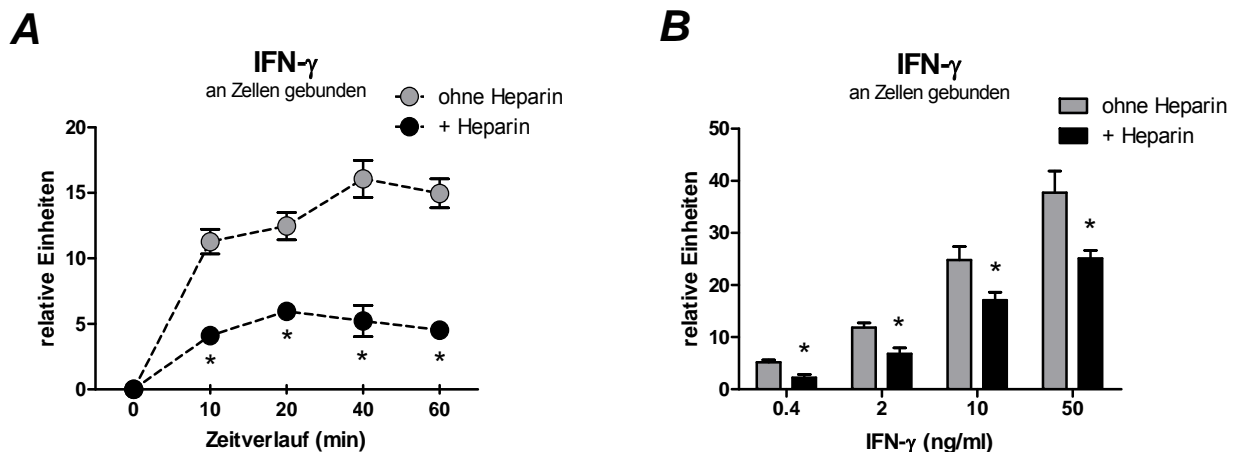


Abb. 13: Heparin interferiert mit IFN- γ bei der Bindung an seinen Rezeptor. (A) Undifferenzierte ESCs wurden mit 2 ng/ml rekombinantem IFN- γ alleine (graue Punkte) oder in Kombination mit 5 μ g/ml unfraktioniertem Heparin (schwarze Punkte) über einen Zeitverlauf von 10, 20, 40 und 60 Minuten inkubiert. (B) Undifferenzierte ESCs wurden für 10 Minuten mit 0.4, 2, 10 oder 50 ng/ml rekombinantem IFN- γ alleine (graue Balken) oder in Kombination mit 5 μ g/ml unfraktioniertem Heparin (schwarze Balken) inkubiert. Die Menge an zellgebundenem IFN- γ wurde in Zelllysaten mittels high sensitivity ELISA bestimmt. Die Punkte und Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von vier verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Bedingung als Triplikat ausgeführt wurde. Die Werte sind in relativen Einheiten ausgedrückt und stellen die relative Menge an zellgebundenem IFN- γ bezogen auf die Zellzahl dar. * $p < 0.05$ die jeweilige IFN- γ Bedingung vs. IFN- γ + Heparin

3.4. Einfluss von Heparin auf den TNF- α Signalweg

3.4.1 Heparin hemmt die TNF- α induzierte Hochregulation von IL-6 und IL-8

Um festzustellen, ob die Behandlung mit unfraktioniertem Heparin einen Einfluss auf die durch TNF- α induzierte Sekretionssteigerung von IL-6 und IL-8 hat, wurden dezidualisierte ESCs für 6 Stunden mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α alleine oder in Kombination mit unfraktioniertem Heparin in ansteigender Dosierung (0-16 IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml) behandelt. Die Zugabe von unfraktioniertem Heparin führte zu einer signifikanten Verminderung der durch TNF- α stimulierten IL-6- und IL-8-Sekretion, hatte aber keinen Einfluss auf die basale Sekretion der beiden Zytokine (*Abb. 14 A und 14 B*). Dieser inhibierende Effekt von unfraktioniertem Heparin konnte auch mittels real-time RT-PCR auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (*Abb. 14 C und D*).

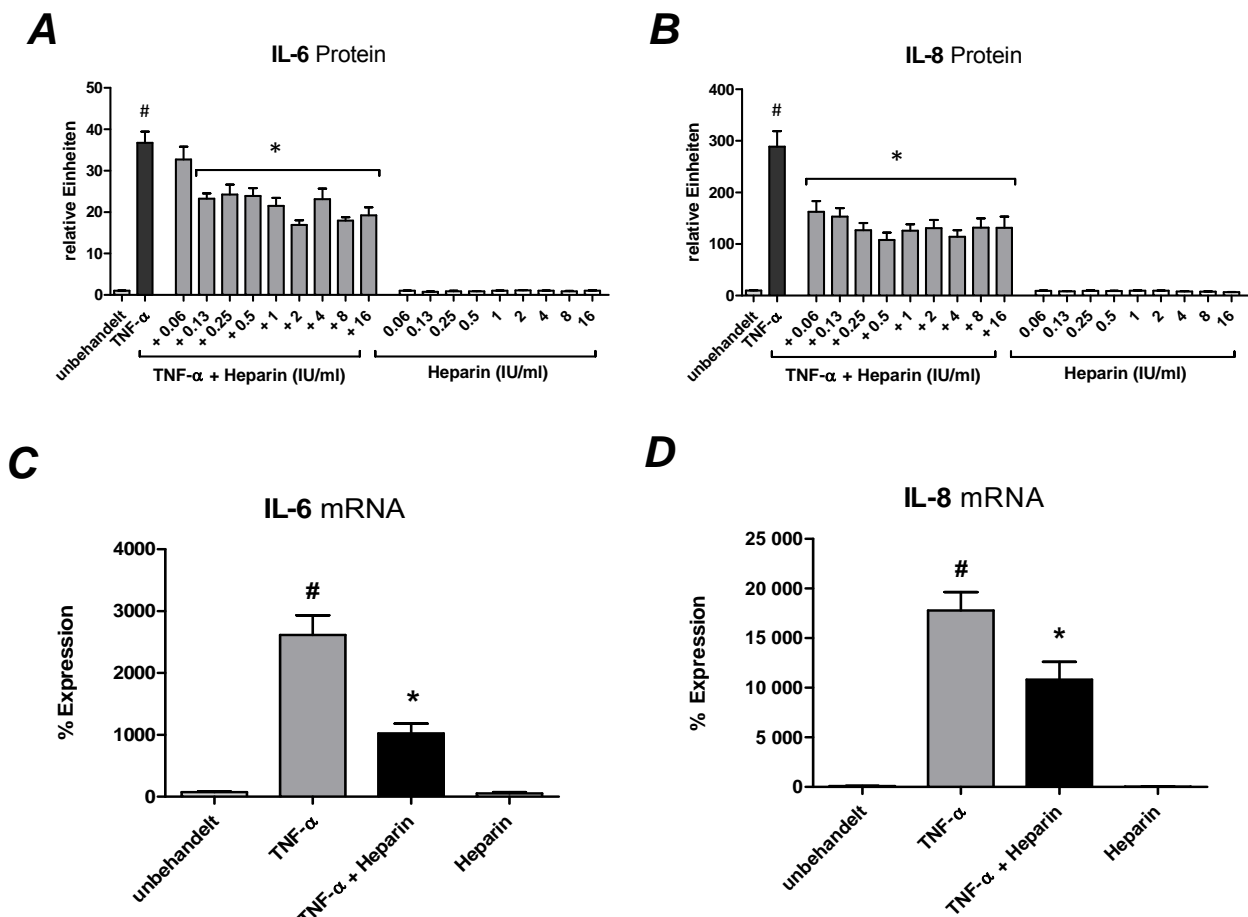


Abb. 14: Heparin und der TNF- α Signalweg. Dezidualisierte ESCs wurden mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α alleine oder in Kombination mit (A, B) 0.06-16 IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml bzw. (C, D) 1 IU anti-Faktor Xa Aktivität/ml unfraktioniertem Heparin für 6 Stunden inkubiert.

3. Ergebnisse

Die Sekretion von (A) IL-6 und (B) IL-8 wurde mit Hilfe eines ELISA in den Zellkulturüberständen gemessen. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden durch den Wert 1 zu Relativeinheiten normiert. Mittels real-time RT-PCR wurde die mRNA Expression von (C) IL-6 und (D) IL-8 bestimmt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden 100 % gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. # $p < 0.05$ TNF- α vs. unbehandelten Zellen, * $p < 0.05$ TNF- α + Heparin vs. TNF- α .

3.4.2 TNF- α Effekte werden über NF- κ B vermittelt

Um zu klären, ob der NF- κ B Signalweg an den TNF- α Effekten beteiligt ist, wurden die intrazellulären Level an I κ B α und phospho-NF- κ B mit Hilfe des In-Cell Western Assays gemessen. Die zehnminütige Inkubation von dezidualisierten ESCs mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α führte zu einer signifikanten Reduktion des inhibitorischen Proteins I κ B α (Abb. 15 A) sowie einer erhöhten Phosphorylierung von NF- κ B (Abb. 15 B). Durch die Inhibitoren MG-132 (20 μ M) und Parthenolid (20 μ M) ließen sich sowohl die Degradation von I κ B α als auch die Phosphorylierung von NF- κ B hemmen (Abb. 15 A und 15 B). Ebenso kam es durch die Zugabe von MG-132 und Parthenolid zur Inhibition des TNF- α vermittelten Anstiegs von IL-6 und IL-8 nach 6 Stunden (Abb. 15 C und 15 D).

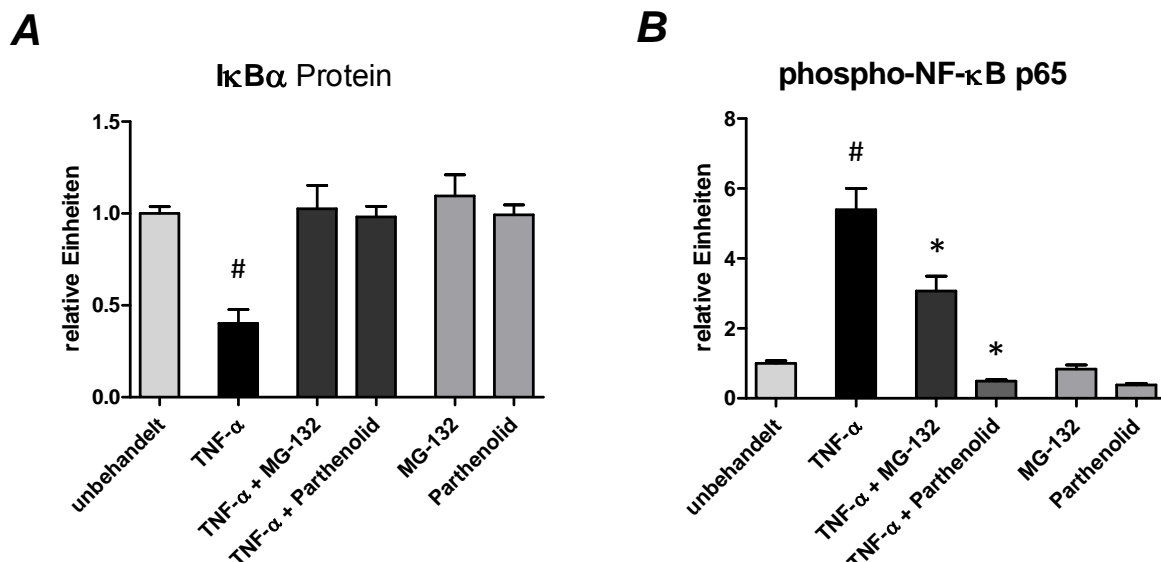


Abb. 15: Die Vermittlung von TNF- α Effekten erfolgt über NF- κ B.

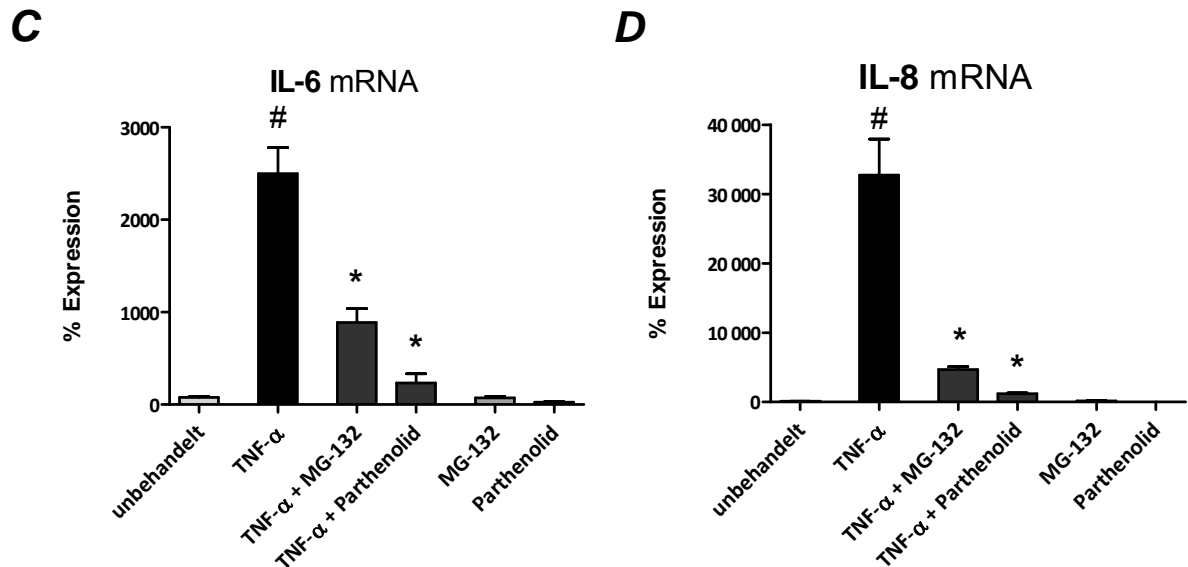


Abb. 15: Die Vermittlung von TNF- α Effekten erfolgt über NF- κ B. Dezidualisierte ESCs wurden für (A, B) 10 Minuten bzw. (C, D) 6 Stunden mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α alleine oder in Kombination mit 20 μ M MG-132 oder 20 μ M Parthenolid inkubiert. (A, B) I κ B α und phospho-NF- κ B wurden mittels In-Cell Western Assay gemessen. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden durch den Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. (C, D) Die mRNA Expression von IL- und IL-8 wurde in der real-time RT-PCR gemessen. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden 100 % gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. # p <0.05 TNF- α vs. unbehandelten Zellen, * p <0.05 TNF- α + MG-132 bzw. Parthenolid vs. TNF- α .

3.4.3 Heparin hemmt nicht die Degradation von I κ B α

Durch Einsatz des In-Cell Western Assays untersuchten wir, ob der über NF- κ B vermittelte Heparineffekt durch die Hemmung der I κ B α Degradation zustande kam. Die Zugabe von 1 IU anti-Xa Aktivität/ml Heparin zeigte keinen Effekt auf die Degradation von I κ B α weder nach TNF- α Stimulation noch auf das basale Level (Abb. 16).

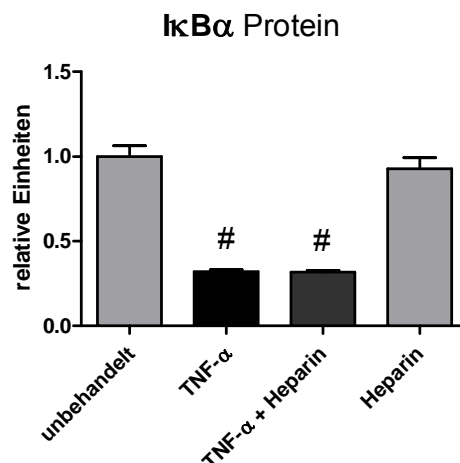


Abb. 16: Die Degradation von I κ B α wird nicht durch Heparin beeinflusst. Dezidualisierte ESCs wurden mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α alleine oder in Kombination mit 1 IU anti-Xa Aktivität/ml unfraktioniertem Heparin inkubiert. Nach 10 Minuten wurde I κ B α mittels In-Cell Western Assay bestimmt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden durch den Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. # $p < 0.05$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

3.4.4 Heparin interferiert mit NF- κ B im Zellkern

Da Heparin in ESCs keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B hatte, untersuchten wir, ob es im Zellkern zu Interferenzen zwischen Heparin und NF- κ B kommen kann. Nach Stimulation dezidualisierter ESCs mit 50 ng/ml TNF- α kam es im Zellkernlysate zu einem starken Anstieg an DNA gebundenem NF- κ B. Die Menge an aktivem NF- κ B verminderte sich bei simultaner Inkubation von TNF- α mit 1 IU anti-Xa Aktivität/ml unfraktioniertem Heparin signifikant (Abb. 17 A). Die Fähigkeit von NF- κ B zur DNA-Bindung verminderte sich auch, wenn die Zugabe von 1 IU anti-Xa Aktivität/ml unfraktioniertem Heparin zum Kernlysate TNF- α stimulierter ESCs erfolgte (Abb. 17 B). Um festzustellen, ob dieser Heparineffekt spezifisch für NF- κ B ist, untersuchten wir den Einfluss von Heparin auf den konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktor Sp-1.

Im Gegensatz zu NF- κ B zeigte sich im Zellkern keine Interferenz von Heparin mit der DNA-Bindung von Sp1 (Abb. 17 C).

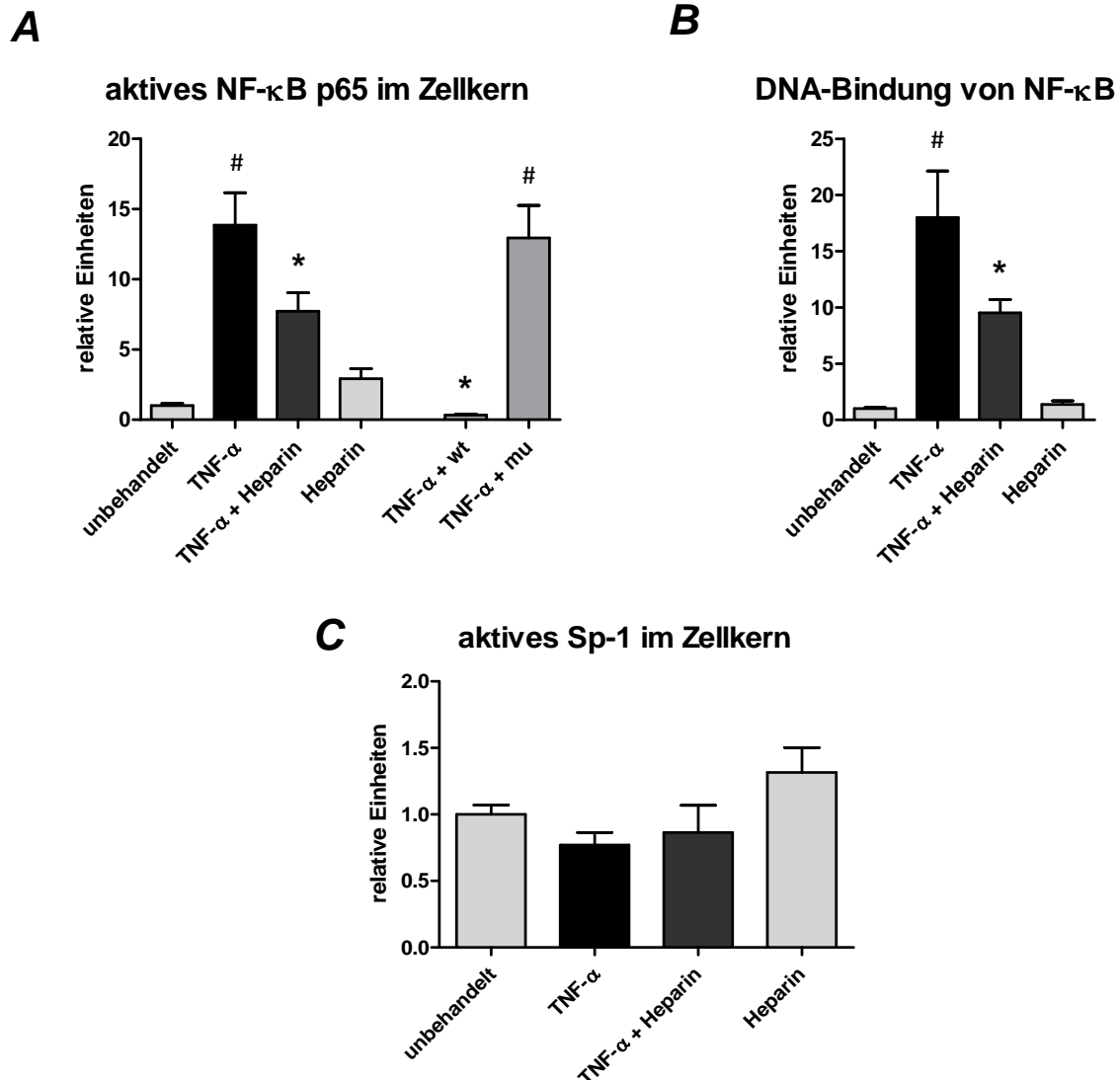


Abb. 17: Interferenz von Heparin mit NF- κ B im Zellkern. Dezidualisierte ESCs wurden für 30 Minuten mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α alleine oder in Kombination mit 1 IU anti-Xa Aktivität/ml unfraktioniertem Heparin inkubiert. Im Zellkernextrakt wurde die DNA-Bindung von (A) NF- κ B und (C) Sp-1 mit Hilfe des jeweiligen Transkriptionsfaktor Assays gemessen. Die Zellkerne wurden zur Herstellung des Zellkernextrakts isoliert und anschließend lysiert. Die Spezifität des NF- κ B Assays wurde durch die Zugabe von (A) Wildtyp (wt)- bzw. mutierten (mt) Oligonukleotiden im Überschuss überprüft. (B) Dezidualisierte ESCs wurden für 30 Minuten mit 50 ng/ml rekombinantem TNF- α inkubiert. Die Zugabe von 1 IU anti-Xa Aktivität/ml unfraktioniertem Heparin erfolgte während des Transkriptionsfaktor Assays direkt zum Zellkernextrakt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden durch den Wert 1 normiert und alle anderen Werte als Relativwerte darauf bezogen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. # $p < 0.05$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen, * $p < 0.05$ im Vergleich zu TNF- α .

4. Diskussion

Die Zytokine IGFBP-1, PRL und IGF-1 sind wichtige Marker der Dezidualisierung humaner endometrialer Stromazellen (Dunn *et al.*, 2003; Fluhr *et al.*, 2007). Wir konnten zeigen, dass die antikoagulatorischen Substanzen unfractioniertes Heparin und NMHs *in vitro* einen modulierenden Einfluss auf IGFBP-1, PRL und IGF-1 haben.

PRL hat die Fähigkeit, an Heparin zu binden, was seine biologische Aktivität als Wachstumsfaktor beeinflussen kann (Khurana *et al.*, 1999). Es besitzt einen autokrin inhibitorischen Effekt auf die Dezidualisierung; in humanen uterinen Fibroblasten zeigte sich im Zellüberstand und auf Transkriptionsebene eine PRL abhängige Reduktion der IGFBP-1 Konzentration (Eyal *et al.*, 2007). Der von uns beobachtete verminderte Effekt von Heparin auf die Sekretion von IGFBP-1 und die gleichzeitig stimulierende Wirkung auf die PRL Sekretion legen die Vermutung nahe, dass Heparin zur Verstärkung dieses autokrinen Regulationsmechanismus in dezidualisierenden endometrialen Stromazellen führen kann. Weiterhin ging eine verminderte Expression von PRL im Endometrium während des Implantationsfensters bei einigen Patientinnen mit unerklärbarer Infertilität und wiederholten Fehlgeburten einher (Garzia *et al.*, 2004). Der stimulierende Effekt von Heparin auf endometriales PRL könnte somit nicht nur eine Rolle in der Dezidualisierung spielen, sondern auch einen direkten Einfluss auf die frühe Implantation haben.

Während des Zeitverlaufs der Dezidualisierung *in vitro* beobachteten wir ein IGFBP-1 Sekretionsmuster, das dem *in vivo* gemessenen sehr ähnlich ist; dabei beginnt die IGFBP-1 Sekretion an Tag 10 nach dem so genannten LH Peak (Licht *et al.*, 2002). Dieser Zeitpunkt steht mit einem rasch ansteigenden Risiko für Implantationsversagen und einer frühen Fehlgeburt in Verbindung (Wilcox *et al.*, 1999). Dem phasenspezifischen Expressionsmuster von IGFBP-1 folgend, ließe sich ein modulierender Einfluss dieses Zytokins auf die Regulation der endometrialen Rezeptivität vermuten. Die beobachtete Inhibition von IGFBP-1 durch Heparin könnte damit als pharmakologische Interventionsmöglichkeit betrachtet werden. Möglicherweise ließe sich dadurch eine Modulation der Dauer der endometrialen Rezeptivität vornehmen.

Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe ähnliche Effekte auf die Sekretion von IGFBP-1 auch für das Schwangerschaftshormon hCG nachweisen (Fluhr *et al.*, 2006). Darüber, ob IGFBP-1 den Implantationsprozess des Trophoblasten fördert oder

hemmt, wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird beschrieben, dass IGFBP-1 die Migration des Ersttrimestertrophoblasten durch die Bindung an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin fördert (Gleeson *et al.*, 2001), andererseits wurde eine Hemmung der Zytotrophoblasteninvasion in die Schicht der dezidualen endometrialen Stromazellen, die eine große Menge an IGFBP-1 sezernieren, beobachtet. Auch dieser Effekt wird durch die Bindung von IGFBP-1 an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin des Throphoblasten vermittelt (Irwin *et al.*, 1998).

Frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zum signifikanten Anstieg von IGF-1 während der Dezidualisierung *in vitro* zwischen Tag 0, 3 und 6 gefolgt von einem raschen Abfall zu Tag 12 hin, konnten bestätigt werden (Fluhr *et al.*, 2007). Heparin führte zur Steigerung des zyklusabhängigen Expressionsmusters von IGF-1 und verstärkt damit seine Funktion als Wachstumsfaktor zur Vorbereitung des Endometriums auf das Implantationsfenster. Die anschließende Verminderung der IGF-1 Expression nach Tag 6 scheint für die frühe Schwangerschaft wichtig zu sein und bleibt durch die Gabe von Heparin unverändert.

In weiteren *in vitro* Experimenten untersuchten wir die Effekte von Heparin und verglichen sie mit denjenigen, die verschiedene heparinähnliche Substanzen (Unterschiede hinsichtlich des Molekulargewichtes, der Ladung oder der antikoagulatorischen Aktivität) auf den Dezidualisierungsprozess ausübten. Hierbei zeigte sich, dass die beobachteten Effekte von Heparin auf die endometriale Dezidualisierung unabhängig von dessen antikoagulatorischer Wirkung sind. Allerdings scheinen diese Effekte durch das Molekulargewicht wie auch das Ausmaß seiner negativen Ladung unterschiedlich stark beeinflusst zu werden.

Die Applikation von Thrombin und Faktor Xa – beides Partner von Heparin in der Gerinnungskaskade – während der Dezidualisierung führte in ähnlicher Weise wie auch Heparin zur Stimulation der IGF-1 Sekretion. Der stimulierende Effekt von Heparin scheint nicht auf dem gerinnungshemmenden Effekt dieser beiden Substanzen zu beruhen und schließt damit eine Implementierung der antikoagulatorischen Wirkung aus.

Dies wurde weiterführend durch den Vergleich mit Dextransulfat, einem polysulfatierten Zuckermolekül, untersucht. Dextransulfat lässt sich im Hinblick auf das Molekulargewicht und der Menge an negativer Ladung mit unfraktioniertem Heparin vergleichen, besitzt allerdings keine antikoagulatorische Wirkung (Greinacher *et al.*,

1992). Heparin und Dextransulfat zeigten *in vitro* denselben Effekt auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen. Beide hemmten die Hochregulation von IGFBP-1 und stimulierten die Sekretion von PRL und IGF-1.

Um zu überprüfen, ob die negative Ladung der Moleküle oder deren Molekulargewicht den Dezidualisierungsprozess modulieren, kamen in Folgeexperimenten NMHs wie auch Fondaparinux und Danaparoid zum Einsatz. Dalteparin, Enoxaparin, Reviparin und Fondaparinux besitzen allesamt ein Molekulargewicht, welches wesentlich unter dem des unfractionierten Heparins gelegen ist. Bei Danaparoid sind sowohl das Molekulargewicht als auch seine negative Ladung geringer als die des unfractionierten Heparins. Die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen blieb durch die Inkubation mit Fondaparinux, dem Molekül mit dem geringsten Molekulargewicht, unverändert. Danaparoid und NMHs hingegen führten zu einer signifikanten Steigerung der IGF-1 Sekretion; diese Sekretionssteigerung fiel allerdings deutlich geringer aus als bei der Inkubation mit unfractioniertem Heparin.

Interessanterweise blieben diese Ergebnisse unverändert, wenn die Substanzen nicht nach ihrer molekularen Konzentration in IU anti-Xa Aktivität/ml, sondern nach deren Gewicht ($\mu\text{g/ml}$) eingesetzt wurden. Hierbei ist zu beachten, dass beim Einsatz der Substanzen nach Gewicht, die vorhandene Gesamtmenge an negativer Ladung bei allen Substanzen gleich groß bleibt. Die Wirkung von Fondaparinux, dem Molekül mit dem geringsten Molekulargewicht, blieb trotz einer solchen Ladungsnormierung aus. Somit scheint nicht nur die Gesamtmenge an negativer Ladung allein, sondern auch das Molekulargewicht der verwendeten Substanz im Hinblick auf die Modulation der Dezidualisierung eine Rolle zu spielen.

Für die endometriale Differenzierung und eine erfolgreiche Implantation ist das exakte Zusammenspiel einer Vielzahl an Zytokinen notwendig (Strowitzki *et al.*, 2006). Die beiden Th-1 Zytokine IFN- γ und TNF- α werden an der fetomaternalen Kontaktzone von dezidualen uNK Zellen produziert. TNF- α reguliert im humanen Endometrium Vorgänge der Apoptose, Proliferation und Differenzierung (Haider und Knöfler, 2009), IFN- γ scheint an der Pathophysiologie von Implantationsversagen und frühen Fehlgeburten beteiligt zu sein (Laird *et al.*, 2003). Die Signalwege der beiden Zytokine können durch Heparin auf unterschiedliche Weise moduliert werden. Heparin verhindert die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor. Nur im Niedrigdosisbereich von IFN- γ wird seine Signaltransduktion durch Heparin unterbunden – die nachfolgende STAT-1 Aktivierung

und die Expressionssteigerung von IRF-1 bleiben aus. Möglicherweise kann Heparin kinetisch betrachtet bei höheren Dosen von IFN- γ nicht alle aktiven IFN- γ Moleküle an der Rezeptorbindung hindern, um die Aktivierung des Signalwegs zu unterbinden. Dies spricht für eine direkte Bindung von Heparin an IFN- γ Moleküle (Hatakeyama *et al.*, 2004). Diese Vermutung lässt sich durch ein Modell des IFN- γ Wirkmechanismus in Endothelzellen untermauern. Hierbei geht man davon aus, dass IFN- γ – bevor es die spezifische Bindung mit dem eigentlichen Rezeptor eingeht – an membranständige Heparansulfate bindet (Douglas *et al.*, 1997). Die Hemmung des Signalwegs könnte daher durch eine Störung der Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor entstehen, indem Heparin mit den membranständigen Heparansulfaten des Rezeptors um die Bindung von IFN- γ kompetiert. Interessanterweise hatte Heparin auf das durch IFN- γ induzierte Gen *Nmi* nicht denselben Effekt wie auf IRF-1, was auf eine mögliche Dosisabhängigkeit oder die Mitbeteiligung eines weiteren Signalwegs hindeuten könnte. Den TNF- α Signalweg hemmt Heparin entweder durch eine Verhinderung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern, oder dadurch, dass es im Zellkern bei der Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an seine konsensuellen DNA-Bereiche zu Interaktionen mit Heparin kommt. Heparin verhindert dabei die Hochregulation der beiden inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, die eine Rolle bei der Leukozytenmigration, der endometrialen Differenzierung sowie bei der Implantation spielen (Dimitriadis *et al.*, 2005).

Die Abspaltung von NF- κ B von seinem Inhibitor I κ B α führt zur Exposition eines Bereiches auf dem Transkriptionsfaktor, der stark positiv geladene Aminosäuren trägt und als so genannte Zellkernlokalisationssequenz bezeichnet wird. Diese ist für die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verantwortlich (Malek *et al.*, 1998). Ein Erklärungsversuch des Heparineffekts wäre, dass es durch die Bindung von negativ geladenem Heparin an die positiv geladene Zellkernlokalisationssequenz zur Unterbindung des Translokationsereignisses von NF- κ B kommen könnte. Denkbar wäre auch, dass Heparin aufgrund seiner negativen Ladung im Zellkern mit der konsensuellen DNA-Sequenz um die Bindung von NF- κ B kompetiert (Lee *et al.*, 2007). Weitere *in vitro* Experimente sind notwendig, um den Heparinmechanismus abschließend zu klären. Zusätzlich zu den elektrostatischen Bindungen von Heparin

sollten auch sterische Aspekte und anderweitige Bindungen von Heparin mit verschiedensten Strukturen diskutiert werden.

Im klinischen Alltag gehören unfractioniertes Heparin und NMHs zu den wichtigsten Medikamenten der Thromboseprophylaxe. Ganz im Gegensatz zur Antikoagulation ist ihre antiinflammatorische Funktionsweise immer noch nicht abschließend geklärt. Heparine können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit – ebenso wie physiologisch präsente Heparansulfate – mit proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen interagieren und deren Wirkungen modulieren (Elsayed *et al.*, 2003). Weiterhin interagiert Heparin mit dem NF- κ B Signalweg und hemmt so die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 (Hochart *et al.*, 2006).

TNF- α und IFN- γ sind inflammatorische Zytokine und werden von Th-1 Zellen gebildet. Sie scheinen an der Pathophysiologie von Implantationsstörungen beteiligt zu sein, denn bei Frauen mit habituellen Aborten zeigt sich im peripheren Blut ein erhöhtes Th-1/Th-2 Zellverhältnis (Raghupathy *et al.*, 2000). Fehlerhafte Implantationen und wiederholte Fehlgeburten gehen mit einem erhöhten Level an TNF- α im Serum einher, der an den pathophysiologischen Ereignissen beteiligt zu sein scheint (Haider und Knöfler, 2009). Durch die Hemmung des TNF- α Signalwegs könnte Heparin bei diesen Patientinnen möglicherweise einen regulatorischen Effekt auf das Ungleichgewicht des Th-1/Th-2 Zytokinmilieus haben.

Wir konnten zeigen, dass Heparin die Dezidualisierung *in vitro* moduliert (Fluhr *et al.*, 2010) und die Signalwege der beiden inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α in ESCs durch unterschiedliche Mechanismen hemmt (Fluhr *et al.*, 2011b, Spratte *et al.*, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Heparin als antiinflammatorisches Molekül ganz unabhängig von seiner antikoagulatorischen Wirkung (Fluhr *et al.*, 2011a). Aus diesen Gründen scheint Heparin im Hinblick auf die Therapie von wiederholten Fehlgeburten unbekannter Ätiologie ein potentiell Präparat zu sein. Dies konnte auch durch verschiedene klinische Studien belegt werden (Rai *et al.*, 1997; Badawy *et al.*, 2008; Fawzy *et al.*, 2008). Dennoch fehlt es vor allem auf dem Gebiet der Grundlagenforschung weiterhin an Wissen über den konkreten Wirkmechanismus von Heparin beim Einsatz in der Therapie von Implantationsstörungen und habituellen Aborten.

5. Zusammenfassung

Etwa 1% der Frauen mit Kinderwunsch leidet an habituellen Aborten. Die Ursachen zur Genese habitueller Aborte sind vielfältig und bei etwa 50 % aller Fälle verbleibt sie unklar (ESHRE Capri Workshop Group, 2008). Im peripheren Blut betroffener Frauen ist ein erhöhtes Th-1/Th-2 Zellverhältnis nachweisbar (Raghupathy *et al.*, 2000). Dieser Umstand lässt eine Implikation immunologischer und inflammatorischer Prozesse in dieses Krankheitsgeschehen vermuten.

Unfraktioniertes Heparin und niedermolekulare Heparine (NMHs) – Substanzen der klassischen Thromboseprophylaxe – kommen immer häufiger in der Behandlung von habituellen Aborten mit und ohne angeborener Gerinnungsstörung zum Einsatz (Rai *et al.*, 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass der Benefit von Heparin dabei nicht durch seine antikoagulatorische Wirkung hervorgerufen wird, sondern auf seinen antiinflammatorischen und somit auch immunmodulatorischen Eigenschaften beruht (Young, 2008).

Vor diesem Hintergrund wurden die in der vorliegenden Arbeit dargestellten *in vitro* Experimente durchgeführt. Die dabei eingesetzten humanen endometrialen Stromazellen stammten aus Hysterektomiepräparaten. Durch die Quantifizierung von IGF-1, cAMP sowie den Dezidualisierungsmarkern IGFBP-1 und PRL konnten wir zeigen, dass unfraktioniertes Heparin und NMHs einen zeit- und dosisabhängigen Effekt auf den Dezidualisierungsprozess *in vitro* ausüben (Fluhr *et al.*, 2010). In weiteren Experimenten verglichen wir die beobachteten Heparineffekte mit denjenigen heparinähnlicher Substanzen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Effekte von Heparin auf die Dezidualisierung von ESCs unabhängig von dessen antikoagulatorischer Wirkung sind. Sie beruhen vielmehr auf dessen Molekulargewicht und der Menge an negativer Ladung (Fluhr *et al.*, 2011a). Die Signalwege der beiden inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α können durch Heparin in mechanistisch unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. Heparin interferiert mit IFN- γ bei der Bindung an seinen Rezeptor und verhindert dadurch die Expression des IFN- γ induzierten Gens IRF-1 (Fluhr *et al.*, 2011b). Weiterhin hemmt Heparin die Expression der beiden TNF- α induzierten Zytokine IL-6 und IL-8, indem es mit dem NF- κ B Signalweg im Zellkern interferiert (Spratte *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Trotz immenser Verbesserungen auf dem Gebiet der Kinderwunschbehandlung in den letzten Jahren, bleibt die Behandlung von Frauen mit habituellen Aborten eine ärztliche Herausforderung. Besonders weil die Datenlage zum Einsatz von Heparin bei Implantationsstörungen und habituellen Aborten nicht eindeutig ist (Badawy *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2010). Auf dem Gebiet der Grundlagenforschung müssen deshalb neue Erkenntnisse gewonnen werden, welche die Basis für weitere klinische Studien mit standardisierten Bedingungen und somit vergleichbaren Ergebnissen darstellen.

6. Literaturverzeichnis

- Bach E, Aguet M, Schreiber R. "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." *Annual Review of Immunology* 15 (1997): 563-91.
- Badawy M et al. "Low-molecular weight heparin in patients with recurrent early miscarriages of unknown aetiology." *Journal of Obstetrics and Gynaecology: the Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 28.3 (2008): 280-4.
- Bradley J R. "TNF-mediated inflammatory disease." *Journal of Pathology* 214 (2008): 149-160.
- Bulmer JN, Rodeck C, Adinolfi M. "Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy." *Prenatal Diagnosis* 15.12 (1995): 1143-53.
- Christian M et al. "Interferon-gamma modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells." *Endocrinology* 142.7 (2001): 3142-51.
- Christopherson KW et al. "Low-molecular-weight heparins inhibit CCL21-induced T cell adhesion and migration." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302.1 (2002): 290-5.
- Clark P et al. "SPIN (Scottish Pregnancy Intervention) study: a multicenter, randomized controlled trial of low-molecular-weight heparin and low-dose aspirin in women with recurrent miscarriage." *Blood* 115.21 (2010): 4162-7.
- Dimitriadis E et al. "Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation." *Human Reproduction Update* 11.6 (2005): 613-30.
- Douglas MS et al. "Examination of the mechanism by which heparin antagonizes activation of a model endothelium by interferon-gamma (IFN- γ)." *Clinical and Experimental Immunology* (1997): 578-584.
- Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. "Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation." *Reproductive BioMedicine Online* 7 (2003): 151-61.
- Elsayed E und Becker RC. "The Impact of Heparin Compounds on Cellular Inflammatory Responses : A Construct for Future." *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 15.1 (2003): 11-18.
- ESHRE Capri Workshop Group. "Genetic aspects of female reproduction." *Human Reproduction Update* 14.4 (2008): 293-307.
- Eyal O et al. "Autocrine prolactin inhibits human uterine decidualization: a novel role for prolactin." *Biology of Reproduction* 76.5 (2007): 777-83.

- Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N. "Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events." *Human Reproduction* 20.11 (2005): 3008-11.
- Fawzy M et al. "Treatment options and pregnancy outcome in women with idiopathic recurrent miscarriage: a randomized placebo-controlled study." *Archives of Gynecology and Obstetrics* 278.1 (2008): 33-8.
- Fluhr H et al. "Human chorionic gonadotropin inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells." *Fertility and Sterility* 86.1 (2006): 236-8.
- . "Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells." *Fertility and Sterility* 90.4 Suppl (2008): 1384-9.
- . "Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells." *Fertility and Sterility* 93.8 (2010): 2581-7.
- . "The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells." *Molecular Human Reproduction* 17.6 (2011a): 354-9.
- . "Heparin inhibits interferon- γ signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon- γ ." *Fertility and Sterility* 95.4 (2011b): 1272-7.
- Ganapathy R et al. "Effect of heparin and fractionated heparin on trophoblast invasion." *Human Reproduction* 22.9 (2007): 2523-7.
- Garzia E et al. "Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study." *Human Reproduction* 19.8 (2004): 1911-6.
- Gellersen B, Brosens I, Brosens J. "Decidualization of the Human Endometrium : Mechanisms, Functions and Clinical Perspectives." *Seminars in Reproductive Medicine* 1.212 (2007): 445-453.
- Giudice LC, Irwin JC. "Roles of the insulinlike growthfactor family in nonpregnant human Endometrium and at the decidual: trophoblast interface." *Seminars in Reproductive Endocrinology* 17 (1999): 13-21.
- Gleeson L et al. "Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 Stimulates Human Trophoblast Migration by Signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86.6 (2001): 2484-2493.
- Greinacher A, Michels I, Mueller-Eckhardt C. "Heparin-associated thrombocytopenia: the antibody is not heparin specific." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 67 (1992): 545-549.

- Gubbay O et al. "Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56(+) natural killer cells of the human endometrium." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87.5 (2002): 2329-35.
- Haider S und Knöfler M. "Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium." *Placenta* 30.2 (2009): 111-23.
- Hatakeyama M et al. "Heparin inhibits IFN-gamma-induced fractalkine/CX3CL1 expression in human endothelial cells." *Inflammation* 28.1 (2004): 7-13.
- Hills F et al. "Heparin prevents programmed cell death in human trophoblast." *Molecular Human Reproduction* 12.4 (2006): 237-43.
- Hochart H et al. "Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes." *British Journal of Haematology* 133.1 (2006): 62-7.
- Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG. "Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology." *Reproductive BioMedicine Online* 9.6 (2004): 692-715.
- Irwin JC, Giudice LC. "Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures." *Growth Hormone & IGF Research* 8 (1998): 21-31.
- Johann S, Zoller C, Haas S, Blumel G, Lipp M, Forster R. "Sulfated polysaccharide anticoagulants suppress natural killer cell activity in vitro." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 74 (1995): 998-1002.
- Kiechel, M (Hrsg.), Gerb R, Kiesel L. "Gynäkologie und Geburtshilfe - Weibliches Hormonsystem" *Elsevier GmbH, München* (2007): 99-110
- Krutzik PO und Nolan GP. "Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events." *Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology* 55.2 (2003): 61-70.
- Krüssel JS et al. "Regulation of embryonic implantation." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 110 (2003): S2-S9.
- Kuhrana S et al. "Heparin-Binding Property of Human Prolactin: A Novel Aspect of Prolactin Biology." *Endocrinology* 140.2 (1999): 1026-1029.
- Kutteh WH. "Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone." *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 174 (1996): 1584-9.
- Laird SM. "A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage." *Human Reproduction Update* 9.2 (2003): 163-174.

- Lee JH, Lee J, Seo GH, Kim CH, Ahn YS. "Heparin inhibits NF-kappaB activation and increases cell death in cerebral endothelial cells after oxygen-glucose deprivation." *Journal of Molecular Neuroscience* 32 (2007): 145-154
- Li TC et al. "An analysis of the pattern of pregnancy loss in women with recurrent miscarriage." *Fertility and Sterility* 78.5 (2002): 1100-6.
- Licht P et al. "Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin." *Fertility and Sterility* 78.2 (2002): 252-8.
- Linhardt RJ et al. "Mapping and quantification of the components of heparin oligosaccharide." *Biochemical Journal* 254 (1988): 781-787.
- Linhardt RJ, Ampofo SA, Fareed J, Hoppensteadt D, Mulliken JB, Folkman J. "Isolation and characterization of human heparin." *Biochemistry* 31 (1992): 12441-12445.
- Livak KJ und Schmittgen TD. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25.4 (2001): 402-8.
- Murphy SP et al. "Interferon Gamma in Successful Pregnancies." *Biology of Reproduction* 80.5 (2009): 848-859.
- Nasu K et al. "Effects of interferon-gamma on cytokine production by endometrial stromal cells." *Human Reproduction* 13.9 (1998): 2598-601.
- Nelson SM und Greer I. "The potential role of heparin in assisted conception." *Human Reproduction Update* 14.6 (2008): 623-45.
- Raghupathy R et al. "Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion." *Human Reproduction* 15.3 (2000): 713-8.
- Rai R et al. "Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies)." *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 314.7076 (1997): 253-7.
- Rai R und Regan L. "Recurrent miscarriage." *Lancet* 368 (2006): 601-611.
- Ranjbaran H et al. "Heparin displaces interferon-gamma-inducible chemokines (IP-10, I-TAC, and Mig) sequestered in the vasculature and inhibits the transendothelial migration and arterial recruitment of T cells." *Circulation* 114.12 (2006): 1293-300.
- Regan L und Rai R. "Epidemiology and the medical causes of miscarriage." *Best Practice and Research Clinical Obstetrics & Gynecology* 14.5 (2000): 839-54.

- Sebire NJ, Backos M, El Gaddal S, Goldin RD, Regan L. "Placental pathology, antiphospholipid antibodies, and pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients." *Journal of Obstetrics & Gynecology* 101 (2003): 258–263.
- Shriver Z et al. "Cleavage of the antithrombin III binding site in heparin by heparinases and its implication in the generation of low molecular weight heparin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.19 (2000): 10365-70.
- Singh M, Chaudhry P, Asselin E. "Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors." *Endocrinology* 210.1 (2011): 5-14.
- Strowitzki T et al. "The human endometrium as a fertility-determining factor." *Human Reproduction Update* 12.5 (2006): 617-30.
- Urman B et al. "Luteal phase empirical low molecular weight heparin administration in patients with failed ICSI embryo transfer cycles: a randomized open-labeled pilot trial." *Human Reproduction* 24.7 (2009): 1640-7.
- Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. "Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy." *New England Journal of Medicine* 340.23 (1999): 1796-9.
- Yamamoto Y and Gaynor RB. "Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer." *Journal of Clinical Investigation* 107.2 (2001): 135-42.
- Young E. "The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds." *Thrombosis Research* 122.6 (2008): 743-52.

7. Publikationen

Fluhr H, **Spratte J**, Ehrhardt J, Steinmüller F, Licht P, Zygmunt M. "Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells." *Fertility and Sterility* 93.8 (2010): 2581-7.

Fluhr H, **Spratte J**, Heidrich S, Ehrhardt J, Greinacher A, Zygmunt M. "The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells." *Molecular Human Reproduction* 17.6 (2011a): 354-9.

Fluhr H, **Spratte J**, Heidrich S, Ehrhardt J, Steinmüller F, Zygmunt M. "Heparin inhibits interferon- γ signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon- γ ." *Fertility and Sterility* 95.4 (2011b): 1272-7.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Marek Zygmunt für die Möglichkeit unter seiner Leitung im Forschungslabor der Frauenklinik zu promovieren, für die wertvollen Erfahrungen, die ich auf Kongressen und Tagungen sammeln durfte und für die Möglichkeit an Publikationen mitwirken zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Herbert Fluhr für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten, für die immer hilfreichen Gespräche und Diskussionen, für die immense Unterstützung und die großzügige Möglichkeit, meine ersten Schritte auf Kongressen und beim veröffentlichen meiner wissenschaftlichen Arbeit unternehmen zu können.

Ein herzliches Dankeschön gilt Stephanie Heidrich und Jens Ehrhardt für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke allen Koautoren für die Zusammenarbeit im Rahmen der Publikationen.

Danken möchte ich auch meiner Familie, die immer an meiner Seite war. Ein großer Dank gilt meiner Schwester Bianca, auf deren Unterstützung und ehrliche Worte ich jeden Tag vertrauen kann und meinem Freund Simon Schäfer, der immer an mich glaubt.