

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor Prof. Dr. med. Marek Zygmunt
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

Heparine modulieren die Chemokinproduktion in humanen endometrialen Stromazellen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2020

vorgelegt von:

Nora Treder

geb. am: 14. Februar 1989

in: Berlin

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter	Prof. Dr. med. Marek Zygmunt
2. Gutachter	Prof. Dr. med. Ulrike Friebe-Hoffmann
Tag der Disputation:	08.12.2021

1. Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Reproduktionsmedizin bleibt die ungewollte Kinderlosigkeit weiterhin ein nur teilweise verstandenes und behandelbares Problem. Unter habituellen Aborten, also drei oder mehr Fehlgeburten in Folge, leiden weltweit etwa 1% aller Paare (Calleja-Agius und Brincat, 2008). In der Behandlung ungewollter Kinderlosigkeit auch unbekannter Ursache nehmen Heparine mittlerweile eine wichtige Rolle ein, auch wenn die Wirkungsweise zur Verbesserung des Schwangerschaftserfolgs oder der Verhinderung von Schwangerschaftskomplikationen nicht endgültig geklärt ist. Wichtige Aspekte sind dabei nicht nur die antikoagulativen Eigenschaften dieser Medikamente, sondern auch immunmodulatorische Effekte, welche in dieser Arbeit anknüpfend an andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht wurden. Das Immunsystem spielt eine herausragende Rolle bei Entstehung und Erhalt von Schwangerschaft. Es ist bekannt, dass sich während der Schwangerschaft das Gleichgewicht zwischen T_H1 - und T_H2 -Zytokinen in Richtung der T_H2 -Zytokine verschiebt (Raghuopathy et al., 1999), wodurch die für den Feten potenziell schädlichen Effekte durch die T_H1 -Immunantwort abgeschwächt werden (Calleja-Agius und Brincat, 2008). Bei Frauen mit ungewollter Kinderlosigkeit scheint das Verhältnis wiederum in Richtung der T_H1 -Zytokine verschoben zu sein (Jenkins et al., 2000). Eine Einflussnahme auf diese Zytokinverschiebung könnte also hilfreich sein.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein in-vitro-Modell endometrialer Stromazellen (ESC) in Zellkultur verwendet. Es wurde dabei mittels ELISA und PCR untersucht, wie die beiden wichtigen Modulatoren der Chemokinproduktion $TNF-\alpha$ (ein proinflammatorisches T_H1 -Zytokin) und Thrombin (wichtiger Partner von Heparin beim Eingriff in die Gerinnungskaskade) die Chemokinproduktion von ESC auf RNA- und Proteinebene beeinflussen und wie unfraktioniertes Heparin (UFH), niedermolekulare

Heparine (LMWH) und Heparin-ähnliche Moleküle diese wiederum verändern können. Untersucht wurden dabei die Chemokine GRO- α , Ena-78, IL-8, MCP-1 und RANTES. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass UFH die von TNF- α hervorgerufene Steigerung der Produktion von IL-8 und RANTES dosisabhängig beeinflusst. Mithilfe des Einsatzes des NF κ B-Inhibitors Parthenolid kann zudem dargestellt werden, dass der TNF- α - und vermutlich auch der Heparineffekt über den Signalweg des Transkriptionsfaktors NF κ B vermittelt wird. Mittels der Heparin-ähnlichen Moleküle Dextransulfat, Danaparoid und ODSH versuchen wir anschließend darzustellen, welche Moleküleigenschaften Heparins für die Einflussnahme auf die von TNF- α verursachte Chemokinexpression und -sekretion von GRO- α , IL-8 und RANTES verantwortlich sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wird zunächst gezeigt, dass Thrombin die Sekretion von GRO- α , IL-8 und MCP-1 durch ESC erhöht, während es auf die RANTES-Expression anders als TNF- α keinen Einfluss hat. UFH ist in der Lage diese gesteigerte Chemokinsekretion von IL-8 und MCP-1 zu verringern. Außerdem hemmen nicht nur UFH, sondern auch LMWHs die Thrombin-induzierte Hochregulation von IL-8 und MCP-1 auf mRNA- und Proteinebene. Thrombin scheint für seine Einflussnahme auf die Chemokinproduktion dabei den MAPK-Signalweg zu nutzen, wie mittels des MAPK-Inhibitors PD98059 dargestellt wird. Diese Arbeit zeigt somit wie Heparine ihre immunmodulatorischen Effekte auf die Chemokinproduktion endometrialer Stromazellen beim Vorliegen eines proinflammatorischen Milieus ausüben. Dadurch wird ein Beitrag geleistet, um die Wirkungsweise von Heparinen beim Einsatz ungewollter Kinderlosigkeit besser zu verstehen und es wird nochmals das Potential dieser Medikamente bei der Anwendung in diesem Bereich unterstrichen. Es sind allerdings weitere Untersuchungen am Tiermodell oder im Rahmen klinischer Studien notwendig, um diese am in-vitro-Modell gewonnenen Erkenntnisse auf ein in-vivo Modell zu übertragen und somit profunderes Wissen für die klinische Anwendung zu gewinnen.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	2
2. Einleitung	11
2.1. Wissenschaftlicher Hintergrund	11
2.2. Anatomische und physiologische Grundlagen	13
2.2.1. Aufbau von Uterus und Endometrium	13
2.2.2. Der weibliche Zyklus und dessen hormonelle Steuerung	13
2.2.3. Die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen	15
2.3. Immunologische Grundlagen	16
2.3.1. T-Helfer-Zellen	16
2.3.2. Zytokine - lösliche Mediatoren des Immunsystems	17
2.3.3. Immunologische Aspekte des weiblichen Genitaltrakts	18
2.3.4. Immunologie und Schwangerschaft	19
2.3.5. Immunologische Aspekte bei unerfülltem Kinderwunsch	21
2.3.6. Chemokine	22
2.3.6.1. Growth regulated oncogen alpha	24
2.3.6.2. Epithelial-derived neutrophil-activating protein 78	25
2.3.6.3. Interleukin 8	26
2.3.6.4. Monocyte chemotactic protein 1	27
2.3.6.5. Regulated upon activation, normally T-cell expressed and secreted	29
2.3.7. Die besondere Rolle von TNF- α	29
2.4. Hämostaseologische Grundlagen	32
2.4.1. Thrombin	32

2.5.	Heparine und ihre Eigenschaften	33
2.5.1.	Weitere Antikoagulantien	36
2.6.	Zielsetzung und Fragestellungen	38
3.	Material und Methoden	39
3.1.	Material	39
3.1.1.	Laborgeräte	39
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien	41
3.1.3.	Reagenzien und Chemikalien	45
3.1.4.	Medien, Puffer und Lösungen	49
3.1.5.	ELISA - Kits	52
3.1.6.	Primer	54
3.1.7.	Programme	55
3.2.	Methodik	56
3.2.1.	Patientenauswahl und Probenmaterial	56
3.2.2.	Steroid-Depletion von fetalem Kälberserum	56
3.2.3.	Zellkultur	57
3.2.4.	Probengewinnung bei endometrialen Stromazellen	60
3.2.5.	RNA-Isolation	61
3.2.6.	Reverse Transkription	62
3.2.7.	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	62
3.2.8.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	64
3.2.9.	Statistische Auswertung	65
4.	Ergebnisse	67
4.1.	Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den TNF- α -Signalweg	67
4.1.1.	Heparin verändert den TNF- α -vermittelten Effekt auf die Chemokinsekretion durch ESC dosisabhängig	67
4.1.2.	Die Effekte durch TNF- α und möglicherweise auch Heparin werden über NF κ B vermittelt	69
4.1.3.	Wirkung Heparin-ähnlicher Moleküle auf den TNF- α -Effekt	72

4.2. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den Thrombinsignalweg	80
4.2.1. Hirudin hemmt die Thrombin-induzierte Hochregulation von IL-8	80
4.2.2. Der Einfluss von Heparin auf die Thrombin-vermittelte Veränderung der Chemokinsekretion	82
4.2.3. Heparin und LMWHs hemmen die Thrombin-induzierte Hochregulation von IL-8 und MCP-1 auf mRNA- und Proteinebene .	85
5. Diskussion	89
5.1. Heparine modulieren TNF- α -Effekte	89
5.2. Heparine modulieren Thrombineffekte	94
5.3. Mögliche Effekte <i>in vivo</i> durch Beeinflussung des Chemokinmilieus . . .	96
5.4. Limitation der Arbeit, klinische Relevanz und Ausblick	97
A. Literaturverzeichnis	101
B. Abkürzungsverzeichnis	121
C. Publikationsliste	124
D. Danksagung	125
E. Symbolverzeichnis	127
E.1. allgemeine Symbole	127
E.2. griechische Buchstaben	127
E.3. Konzentrationsangaben	128

Abbildungsverzeichnis

2.1. Menstruationszyklus	14
4.1. Produktion von GRO- α nach Stimulation mit TNF- α und Heparin in steigender Konzentration	69
4.2. Produktion von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin in steigender Konzentration	70
4.3. Produktion von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin in steigender Konzentration	71
4.4. Expression von GRO- α nach Stimulation mit TNF- α und Heparin und Zugabe von Parthenolid	72
4.5. Expression von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin und Zugabe von Parthenolid	73
4.6. Expression von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin und Zugabe von Parthenolid	74
4.7. Produktion von GRO- α nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen	75
4.8. Produktion von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen	76
4.9. Produktion von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen	77
4.10. Expression von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen	78
4.11. Expression von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen	79

4.12. Expression von IL-8 und RANTES nach Stimulation mit Thrombin alleine und in Kombination mit Hirudin	81
4.13. Produktion von GRO- α nach Stimulation mit Thrombin und Heparin alleine und in Kombination	82
4.14. Produktion von IL-8 nach Stimulation mit Thrombin und Heparin alleine und in Kombination	83
4.15. Produktion von MCP-1 nach Stimulation mit Thrombin und Heparin alleine und in Kombination	84
4.16. Expression und Sekretion von IL-8 nach Stimulation mit Thrombin alleine und in Kombination mit LMWHs	87
4.17. Expression und Sekretion von MCP-1 nach Stimulation mit Thrombin alleine und in Kombination mit LMWHs	88

Tabellenverzeichnis

2.1. Einteilung der Zytokine	18
2.2. Ausgewählte Chemokine und ihre Rezeptoren	23

2. Einleitung

2.1. Wissenschaftlicher Hintergrund

Mit unerfülltem Kinderwunsch bezeichnet man den Zustand des Leidens an Unfruchtbarkeit. Unfruchtbarkeit liegt gemäß der Weltgesundheitsorganisation vor, wenn es trotz regelmäßigen und ungeschützten Geschlechtsverkehrs nach 24 Monaten bei einem Paar zu keiner Schwangerschaft gekommen ist (Strauß et al., 2004).

Der Anteil gewollt und ungewollt kinderloser Frauen in Deutschland hat seit den Geburtenjahrgängen ab 1940 stark zugenommen. Im Geburtsjahrgang 1965 sind etwa 31% der Frauen aus den alten und 26% der Frauen aus den neuen Bundesländern kinderlos (Strauß et al., 2004). Laut einer vom Bundesfamilienministerium in Auftrag gegebenen Studie besteht bei 25% aller kinderlosen Männer und Frauen im Alter zwischen 20 und 50 Jahren in Deutschland ungewollte Kinderlosigkeit (Wippermann, 2014). Nach Angaben des deutschen In-vitro-Fertilisations(IVF)-Registers wurden im Jahr 2015 fast 58.000 Frauen reproduktionsmedizinisch. Nur ein verhältnismäßig geringer Teil dieser Behandlungen führt allerdings zum Erfolg. 2014 führten 29,5% der IVF-Behandlungen zu einer klinischen Schwangerschaft, 21,3% davon endeten im Abort (Behre, 2016).

Die Gründe ungewollter Kinderlosigkeit sind vielfältig, häufig liegen mehrere Ursachen gleichzeitig vor. Die Ursache kann sowohl beim Mann (25% der Fälle), bei der Frau, als auch bei beiden zu finden sein. In 30% der Fälle primärer Sterilität ist keine Ursache auszumachen. Bei Frauen kommen verschiedene Ursachen in Betracht, dazu zählen Störungen der Eileiterfunktion, hormonelle Ursachen, Endometriose (Strauß et al., 2004) oder auch genetische Faktoren, welche auch auf kindlicher Seite eine Rolle spielen können (Garrido-Gimenez und Alijotas-Reig, 2015). Von habituellen Aborten (HA)

2. Einleitung

spricht man, bei drei oder mehr Fehlgeburten hintereinander (Bansala et al., 2011). Davon betroffen sind weltweit bis zu 1% aller Paare (Calleja-Agius und Brincat, 2008). Weitere mögliche Ursachen, die in Betracht gezogen werden müssen, sind Störungen der Blutgerinnung, wie Thrombophilien, oder auch immunologische Faktoren. Zu letzteren zählen einerseits Autoimmunerkrankungen, wie das Antiphospholipid-Syndrom (APS), und andererseits Faktoren, die die immunologische Toleranz zwischen Mutter und Kind beeinflussen (Garrido-Gimenez und Alijotas-Reig, 2015).

Je nach Ursache gibt es verschiedene Behandlungsansätze ungewollter Kinderlosigkeit und habitueller Aborte. Einen wichtigen Stellenwert haben dabei mittlerweile Heparine, auch wenn ihre genaue Wirkungsweise in der Kinderwunschbehandlung weiterhin nur teilweise bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl unfraktioniertes Heparin als auch niedermolekulare Heparine (LMWH) einen positiven Einfluss auf Schwangerschaftserfolg und auftretende Komplikationen haben. So zeigten Kutteh et al. und Rai et al., dass die Behandlung mit Aspirin plus Heparin bei Frauen mit APS und HA zu höheren Schwangerschaftsraten führte, als die Behandlung mit Aspirin alleine (Rai et al., 1997; Kutteh, 1996). Die Erfolge bei Kinderwunschpatientinnen mit Thrombophilie wurden zunächst der Annahme zugeschrieben, plazentare Infarkte und Thrombosen könnten ursächlich sein und eine antikoagulative Therapie würde diese verhindern (Nelson und Greer, 2008). Allerdings profitieren auch Patientinnen mit HA unbekannter Ursache von einer Therapie mit niedermolekularen Heparinen (Fawzy et al., 2008). Zusätzlich senken LMWH das Wiederholungsrisiko von Schwangerschaftskomplikationen, wie Präeklampsie, vorzeitiger Plazentalösung oder intrauterinem Fruchttod (Rath und Thaler, 2013). Auch eine Arbeitsgruppe um A.M. Badawy zeigte, dass LMWH bei Frauen mit HA unbekannter Ursache die Inzidenz früher und später Aborte signifikant senken können (Badawy et al., 2008). Diese Befunde deuten daraufhin, dass Heparine ihre positive Wirkung über einen antikoagulativen Effekt hinaus ausüben. Dazu zählt eine verbesserte Implantation und Plazentation (Rath und Thaler, 2013).

Bisher nur teilweise erforscht sind Effekte von Heparinen auf das Immunmilieu im Endometrium. Sie scheinen dabei antientzündlich und immunmodulatorisch zu wirken. Diese Effekte werden in dieser Arbeit genauer betrachtet werden, da sie großen Nutzen in der reproduktionsmedizinischen Behandlung haben können.

2.2. Anatomische und physiologische Grundlagen

2.2.1. Aufbau von Uterus und Endometrium

Der Uterus befindet sich als Teil der inneren weiblichen Geschlechtsorgane im weiblichen Becken. Seine Aufgaben als Fruchthalter während der Schwangerschaft sind der Schutz und die Versorgung des heranwachsenden Kindes und zudem die Austreibung des Kindes bei der Geburt. Die Wand des Gebärmutterkörpers besteht aus drei Schichten. Die äußerste Schicht ist das Perimetrium, der Peritonealüberzug des Uterus. Es folgt als dickste Schicht aus glatten Muskelzellen das Myometrium. Innen ist die Gebärmutter mit einer Schleimhaut ausgekleidet, dem Endometrium. Im Uteruskörper besteht das Endometrium aus einem fortwährend vorhandenen Stratum basale und dem darauf liegenden Stratum functionale, welches während der Abbruchblutung des weiblichen Zyklus abgestoßen wird (Aumüller et al., 2014). Nach der Abbruchblutung wird das Stratum functionale vom Stratum basale aus wieder aufgebaut. Das Endometrium ist von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel bedeckt. Darunter liegen in zellreiches, faserarmes Stroma eingebettete Arterien und Drüsen, welche das Uterussekret produzieren (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015).

2.2.2. Der weibliche Zyklus und dessen hormonelle Steuerung

Im Vergleich mit anderen Geweben im menschlichen Körper ist das Endometrium höchst ungewöhnlich. Nur wenige andere Zellen proliferieren in solch einer hohen Geschwindigkeit (García-Velasco und Arici, 1999). Während der Fortpflanzungsperiode ist das Endometrium einem hormonell gesteuerten, in der Regel 28 Tage dauernden Zyklus unterworfen. Dabei kommt es zu Veränderungen in allen Anteilen des Stratum functionale. Es werden drei Phasen unterschieden: Desquamations-, Proliferations- und Sekretionsphase. Während der Desquamationsphase in den ersten drei Tagen wird das Stratum functionale als Folge eines Abfalls des Progesteronsspiegels unter Gewebnekrosen und Blutungen abgestoßen. Es folgt die Proliferationsphase, welche bis zum 14.

2. Einleitung

Zyklustag andauert. Unter Östrogeneinfluss proliferieren vom Stratum basale ausgehend die Drüsen und das sie umgebende Bindegewebe. In der anschließenden Sekretionsphase während der zweiten Hälfte des Zyklus kommt es unter Progesteroneinfluss zu einer Ausdifferenzierung des Stratum functionale und damit zur Vorbereitung auf die Einnistung einer möglicherweise vorhandenen befruchteten Eizelle. Die Drüsen produzieren dazu zunehmend Uterussektret. Im Bindegewebe werden verschiedene Nährstoffe eingelagert. Durch ein beginnendes Absinken des Progesteronspiegels gegen Ende des Zyklus verengen sich die Arterien zunehmend. Die daraufhin eintretende Ischämie leitet die Desquamationsphase und somit einen neuen Zyklus ein (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Im unteren Abschnitt der Abbildung 2.1 werden die Phasen, welche das Endometrium während des Menstruationszyklus durchläuft, dargestellt.

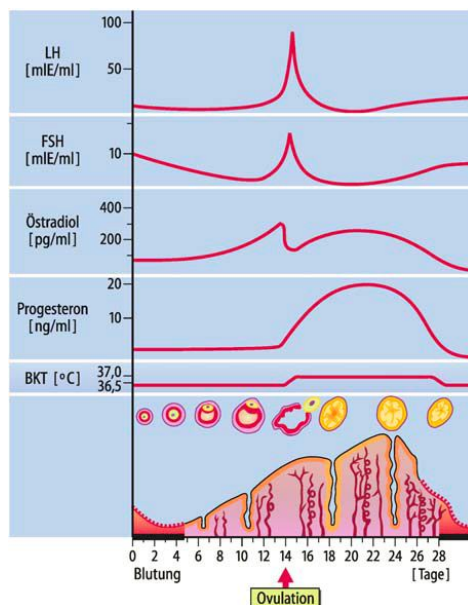


Abbildung 2.1.: Menstruationszyklus (Schmidt und Lang, 2007)

an Hypothalamus und Hypophyse statt. Die Hormonspiegel unterliegen während des Zyklus typischen Schwankungen (siehe Abb. 2.1). FSH fördert dabei besonders das Follikelwachstum und in der Follikelphase die Bildung von Östrogen. Durch den LH-Peak in der Zyklusmitte wird die Ovulation ausgelöst. Zusammen mit FSH steuert LH die Reifung der Follikel (Weyerstahl und Stauber, 2013).

Wie schon erwähnt, unterliegt der Menstruationszyklus einer hormonellen Steuerung durch die in den Ovarien gebildeten Steroidhormone Progesteron und Östrogen. Reguliert wird die Bildung dieser Hormone über den hypothalamisch-hypophysär-ovariellen Regelkreis. Dabei fördert das im Hypothalamus gebildete Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) die Bildung von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) im Hypophysenvorderlappen. LH und FSH üben wiederum stimulierenden Einfluss auf die Hormonbildung in den Ovarien aus. Über die Blutspiegel von Progesteron und Östrogen findet ein Feedback-Mechanismus

2.2.3. Die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen

Die Vorbereitung des bindegewebigen Stromas auf die Einnistung eines Keims während der Sekretionsphase wird auch als Dezidualisierung bezeichnet (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Während der Dezidualisierung verändert sich aber nicht nur das Stroma, sondern auch alle weiteren Anteile des Endometriums, wie Arterien, Drüsen und Immunzellen. Beim Menschen beginnt dieser Prozess schon in der zweiten Zyklushälfte ohne Stimulation durch die Blastozyste und setzt sich im Falle einer Schwangerschaft fort (King, 2000). Das Bindegewebe wird ödematös und die endometrialen Stromazellen, welche Lipide, Proteine und Glykogen einlagern, werden breiter und ihr Kern runder. Um die reifen Bindegewebszellen herum findet sich nun eine spezielle Extrazellulärmatrix. Zusätzlich sezernieren die Zellen verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren, Chemo- und Zytokine, wie beispielsweise Prolaktin, Renin und Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1). In-vitro werden vor allem Prolaktin und IGFBP-1 als Marker zum Nachweis der Dezidualisierung verwendet (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015; King, 2000).

Allerdings erfolgt nicht in jedem Zyklus eine ausreichende Dezidualisierung. Bei fertilen Frauen kommt es in etwa 1 von 3 Zyklen zu keiner ausreichenden Vorbereitung des Endometriums, bei subfertilen Frauen sogar noch häufiger, was Ursache für Infertilität und frühe Aborte sein kann (Beier-Hellwig et al., 2001). Während der Proliferationsphase sind im Stratum functionale nur wenige natürliche Killerzellen (NK-Zellen), T-Zellen und Makrophagen anzutreffen (King, 2000). Durch die zunehmende Sekretion der endometrialen Stromazellen (ESC) kommt es zu vermehrter Einwanderung und Differenzierung von Immunzellen (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Während die Menge an T-Zellen und Makrophagen allerdings während der Dezidualisierung in etwa gleich bleibt, nimmt die Anzahl der NK-Zellen postovulatorisch dramatisch zu (King et al., 1989) und bleibt bei Eintreten einer Schwangerschaft hoch (King, 2000). Diese uterinen NK-Zellen unterscheiden sich sowohl phänotypisch, als auch in ihrer Funktion von den im Blut zirkulierenden natürlichen Killerzellen (King et al., 1998). Aufgrund ihrer Morphologie werden die uterinen NK-Zellen auch als LGL-Zellen (large granular lymphocytes) bezeichnet (Starkey et al., 1988).

2. Einleitung

Die Dezidualisierung ist Voraussetzung für die Implantation, also die Einnistung einer befruchteten Eizelle in das vorbereitete Endometrium (King, 2000). Der Zeitraum, in dem das Endometrium bereit ist eine Blastozyste aufzunehmen, wird auch als Implantationsfenster bezeichnet (Beier-Hellwig et al., 2001). Die Blastozyste nistet sich dabei direkt unterhalb des Epithels in das endometriale Stroma ein (Sadler, 2008).

Die Dezidua beeinflusst nicht nur die Implantation, sondern auch im Zusammenspiel zwischen ESC und uterinen NK-Zellen die Entstehung einer funktionstüchtigen Plazenta und ist somit essentiell für die Entstehung einer intakten Schwangerschaft (King, 2000; Dunn et al., 2002). Die Zeitspanne um die Implantation, also 7-14 Tage nach dem LH-Peak, ist entscheidend für Fortführung der Dezidualisierung oder Einleitung der Abbruchblutung und somit Erhalt oder Verlust von Schwangerschaft; 50% der Aborte erfolgen in diesem Zeitraum (King, 2000).

2.3. Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen ist ein großes und komplexes System, alle dazugehörigen Zellen und Organe machen eine Masse von 2-3 kg aus (Schütt und Bröker, 2011). Das Immunsystem dient dabei einerseits des Schutzes vor von „außen“ angreifenden Krankheitserregern und andererseits vor entarteten Zellen von „innen“. Dazu muss das Immunsystem zwischen „Eigen“ und „Fremd“ unterscheiden und außerdem als fremd erkannte Pathogene effektiv beseitigen können (Vollmar et al., 2013). Auf einige für diese Arbeit relevanten Anteile des Immunsystems wird im Folgenden genauer eingegangen.

2.3.1. T-Helfer(T_H)-Zellen

T_H -Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems und unterstützen andere Immunzellen (Schütt und Bröker, 2011). Anhand der freigesetzten Zytokine (siehe unten) und der von ihnen ausgelösten Immunantwort werden verschiedene T_H -Zellen unterschieden. T_H1 -Zellen produzieren u.a. $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ und Interleukin 2, induzieren damit eine

Entzündungsreaktion und unterstützen eine zelluläre Immunantwort. Durch von T_H2 -Zellen sezernierte Interleukine (IL), wie IL-4, -5, -6 und -10, werden B-Zellen aktiviert und die Abwehr extrazellulärer Erreger unterstützt. Es werden aber auch Funktionen phagozytischer Zellen inhibiert (Vollmar et al., 2013; Mosmann und Coffman, 1989). Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von entweder vermehrt T_H1 - oder T_H2 -Zellen aus naiven T-Zellen spielen die bei der Antigenpräsentation in deren Umgebung vorkommenden Zytokine. Die Differenzierung zu T_H1 -Zellen wird durch $INF-\gamma$ und IL-12 unterstützt, während das Vorkommen von IL-4 zur Bildung von T_H2 -Zellen führt. IL-12 wird v.a. durch Makrophagen als Antwort auf Infektionen produziert, sodass schon subklinische Infektionen zu einer vermehrten IL-12-Bildung und damit einem Übergewicht an T_H1 -Zellen führen können. Genauso führen Infektionen zu einer vermehrten $INF-\gamma$ -Sekretion durch NK-Zellen (Calleja-Agius und Brincat, 2008). Bei der Entstehung von T_H1 -Zellen und bei der Bildung ihrer Zytokine spielt der Signalweg über die Transkriptionsfaktoren T-bet (Szabo et al., 2000) und $NF-\kappa B$ (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) (Corn et al., 2003) eine entscheidende Rolle. Über diesen Signalweg wird das T_H1 -Programm aktiviert und die Expression von T_H2 -Zytokinen unterdrückt (Szabo et al., 2000). Die Hemmung der Aktivierung von $NF\kappa B$ in T-Zellen führt zu einer verminderten Expression von T-bet und somit auch von T_H1 -Zytokinen (McCracken et al., 2007).

2.3.2. Zytokine - lösliche Mediatoren des Immunsystems

Als Teil der humoralen Abwehr, zur lokalen Kommunikation und Beeinflussung von Immunzellen setzt das Immunsystem Zytokine ein. Dies sind lösliche Polypeptide. Sie werden allerdings nicht nur von Zellen des Immunsystems produziert (Schütt und Bröcker, 2011), sondern beispielsweise auch durch ESC. Zytokine werden i.d.R. sezerniert und binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen, wodurch intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Die meisten Zytokine verfügen über die folgenden Eigenschaften: sie sind pleiotrop, können also mehrere Wirkungen hervorrufen, da sie an Rezeptoren auf verschiedenen Zellen binden können. Verschiedene Zytokine können den gleichen Effekt hervorrufen, da sie an die selben Rezeptoren binden können (Re-

2. Einleitung

dundanz). Sie weisen außerdem eine hohe Potenz auf, sodass nur sehr geringe Mengen an Zytokinen notwendig sind, um Effekte zu erzielen. Viele Zytokine arbeiten zudem synergetisch zusammen.

Die Nomenklatur und Einteilung von Zytokinen ist nicht einheitlich. Eine mögliche Einteilung erfolgt anhand der Rezeptoren, an welche die Zytokine binden (Calleja-Agius und Brincat, 2008) (siehe Tabelle 2.1).

Rezeptor	Ausgewählte Zytokine	Gemeinsame Funktion
Hämatopoetin-Rezeptorfamilie	IL 2, 4, 6, 12, EPO, G-CSF	Hämatopoese, Aktivierung von T- und B-Zellen
Interferon(INF)-Rezeptorfamilie	IL-10, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	antiviral
Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie	TNF- α/β	proinflammatorisch
Immunglobulin-Superfamilien-Rezeptoren	IL-1	proinflammatorisch
Tyrosinkinase-Rezeptoren	EGF, IGF	Wachstumsfaktoren
Chemokin-Rezeptoren	Ena-78, GRO- α , IL-8, MCP-1, RANTES, SDF-1	chemotaktisch

Tabelle 2.1.: Einteilung der Zytokine (Calleja-Agius und Brincat, 2008)

2.3.3. Immunologische Aspekte des weiblichen Genitaltrakts

Der weibliche Reproduktionstrakt und somit das dort befindliche Immunsystem sind verschiedenen Erregern ausgesetzt, einige davon gehören zum physiologischen Milieu, andere von ihnen sind potenziell pathogen. Anteil an der Verteidigung gegen diese potenziellen Pathogene haben unter anderem die endometrialen Epithelzellen (EEC) als Teil des angeborenen Immunsystems, einerseits über die Expression verschiedener Rezeptoren zur Erkennung üblicher Pathogene (sog. PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) (Meter et al., 2005), andererseits über die Sekretion bakterizider Stoffe (Fahey und Wira, 2002).

Zudem sind im Endometrium verschiedene Immunzellen zu finden, darunter neutrophile Granulozyten, Makrophagen, deziduale NK-Zellen und verschiedene T-Zellen (Me-

stecky et al., 2005). Im Verlauf des Menstruationszyklus verändert sich die Anzahl und die Zusammensetzung der Leukozyten im Endometrium, wobei die höchste Anzahl in der Mitte der Sekretionsphase, also zum Zeitpunkt einer möglichen Implantation, dort zu finden ist (Bulmer et al., 1991). In der Dezidua finden sich vor allem uterine NK-Zellen, Makrophagen und T-Zellen (Piccinni, 2005).

Sowohl die verschiedenen Leukozyten, als auch die EEC und ESC sind dabei in der Lage unterschiedliche Zytokine und Chemokine zur Verteidigung gegen virale und bakterielle Pathogene zu sezernieren (Tabibzadeh und Sun, 1992). Von ESC sezerniertes IL-15 hat Einfluss auf Reifung und Differenzierung uteriner NK-Zellen (Mingari et al., 1997; Waldmann und Tagaya, 1999). Die uterinen NK-Zellen produzieren selbst verschiedene Zytokine, welche Angiogenese und Gefäßstabilität beeinflussen können (Li et al., 2001). Diese Zytokine scheinen vor allem für die zyklische Erneuerung des Endometriums und die Abbruchblutung eine Rolle zu spielen und weniger für Dezidualisierung und Entstehung von Schwangerschaft (Moffett-King, 2002). Zusätzlich sind die uterinen NK-Zellen in der Lage Zytokine zu sezernieren, welche auch von im Blut zirkulierenden NK-Zellen produziert werden, wie $\text{INF-}\gamma$ oder TNF (Cooper et al., 2001).

2.3.4. Immunologie und Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft nimmt das Immunsystem insgesamt und insbesondere im weiblichen Reproduktionstrakt eine bedeutende Rolle ein. Es muss einerseits aktiv genug sein, um die Immunkompetenz der Mutter zu bewahren und andererseits soweit supprimiert werden, dass allogene Strukturen, wie Spermatozoen, die sich einnistende Blastozyste und fetales Gewebe, nicht abgestoßen werden (Mestecky et al., 2005). Der Uterus als Fruchttträger gilt als „immunologisch privilegierte Region“, wie beispielsweise auch die Augen oder Hoden. Diese weisen zwei grundsätzliche Eigenschaften auf: eine nicht-immunogene Gewebegrenze (im Falle des Uterus der Trophoblast an der maternal-fetalen Grenzfläche) und eine lokal herabgesetzte Immunantwort (Murphy et al., 2012a). Der menschliche Trophoblast ist dabei im Vergleich mit dem anderer Säugetiere besonders invasiv, da er in mütterliche Gefäße in der Uteruswand eindringt und so in direkten Kontakt mit dem mütterlichen Gewebe und Blut sowie dem mütter-

2. Einleitung

lichen Immunsystem kommt, was das Risiko einer Immunantwort der Mutter erhöht. Die Dezidua übernimmt hier eine wichtige Steuerungsfunktion. Sie erlaubt einerseits den Zugang des Trophoblasten zu mütterlichen Nährstoffen, schützt aber auch vor einer zu starken Invasion (Moffett und Loke, 2006).

Insgesamt scheinen es mehrere Mechanismen zu sein, welche das fetale Gewebe vor der Abstoßung bewahren. Der an das mütterliche Blut der Spiralarterien angrenzende Syncytiotrophoblast exprimiert keine MHC-Moleküle (Moffett-King, 2002) und kann somit nicht von mütterlichen T-Zellen als fremd erkannt werden. Der mit den dezidualen Immunzellen in Kontakt stehende extravillöse Trophoblast wiederum exprimiert eine ungewöhnliche Kombination an HLA-Molekülen (Moffett-King, 2002; Murphy et al., 2012a). HLA-G wird in hohem Maße exprimiert, während HLA-A- und -B-Moleküle nicht vorhanden sind, was eine starke Einwanderung von T- und B-Zellen zum Ort der Implantation und eine dadurch begünstigte Abstoßung verhindert (Moffett und Loke, 2006). HLA-G hemmt über Bindung an die inhibitorischen Leukocyte immunoglobulin-like Rezeptoren (LILR) die T-Zellantwort (Shiroishi et al., 2006; Moffett und Loke, 2006). Über Bindung an HLA-E wird zusätzlich die Zytotoxizität uteriner NK-Zellen unterdrückt (King et al., 2000).

Der Fetus weist paternale MHC-Proteinkomplexe und andere Fremdantigene auf, die vom Immunsystem der Mutter eigentlich als fremd erkannt werden müssten. Infolge einer Unterdrückung der lokalen und systemischen T-Zellantwort während der Schwangerschaft erfolgt trotz einer geringen Anzahl im mütterlichen Blut nachweisbarer kindlicher Antigene keine Abstoßungsreaktion (Murphy et al., 2012a).

Kommt es zu einer Schwangerschaft, steigt die Anzahl der Immunzellen im Endometrium und ihre Zusammensetzung verändert sich (Starkey et al., 1988; Piccinni, 2005). Uterine NK-Zellen machen während des 1. Trimesters 50% aller dezidualen Immunzellen aus (Starkey et al., 1988), später sind von ihnen nur noch wenige im Endometrium zu finden (García-Velasco und Arici, 1999). Die Anzahl an T-Zellen und Makrophagen steigt dabei nur leicht (Bulmer et al., 1991).

Während der Schwangerschaft verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen T_H1 - und T_H2 -Zytokinen in Richtung der T_H2 -Zytokine, wie IL-6 und IL-10 (Raghupathy et al., 1999). Dadurch werden die für den Feten potenziell schädlichen Effekte durch die T_H1 -Immunantwort abgeschwächt (Calleja-Agius und Brincat, 2008). Dies gilt für die

Chemokinproduktion durch Trophoblasten (Wegmann et al., 1993; Sacks et al., 2001) und T-Helferzellen (Hadfield et al., 2011). Im Serum von Frauen mit normaler Schwangerschaft im Vergleich zu Nicht-Schwangeren und Schwangeren, welche einen spontanen Abort erlitten, finden sich erhöhte IL-10-Konzentrationen (Jenkins et al., 2000). Auch die Expression von T-bet und NF κ B in T-Zellen ist in normalen Schwangerschaften vermindert (Hadfield et al., 2011), wodurch es zu einer verminderten Sekretion von T_H1-Zytokinen kommt (McCracken et al., 2007). Die These der Verschiebung hin in Richtung verstärkter T_H2-Antwort wird zudem dadurch unterstützt, dass sich während der Schwangerschaft die Symptome vorbestehender Autoimmunerkrankungen verändern können. So verbessern sich beispielsweise die Symptome der T_H1-gesteuerten rheumatoiden Arthritis während der Schwangerschaft bei 75 % der Betroffenen. Andererseits verschlimmern sich die Symptome von Lupus erythematodes, welcher T_H2 gesteuert ist (Ostensen, 1999).

Der leukämiehemmende Faktor (LIF), ein für die Implantation essentielles Zytokin, wird besonders kurz davor im Endometrium exprimiert (Stewart et al., 1992). Bei infertilen Frauen konnte eine verminderte LIF-Produktion nachgewiesen werden (Laird et al., 1997). Es wird dabei in deutlich höherer Menge von T_H2- als von T_H1-Zellen produziert. IL-4, eines der T_H2-Zytokine, und Progesteron fördern zudem die Entstehung LIF-produzierender T-Zellen (Piccinni et al., 1998).

Das Zusammenspiel zwischen unterschiedlichen Zytokinen, teils von T_H2-Zellen produziert, und Hormonen an der mütterlich-fetalen Grenzfläche scheint somit maßgeblichen Einfluss auf eine erfolgreiche Implantation und den Erhalt der Schwangerschaft zu haben.

2.3.5. Immunologische Aspekte bei unerfülltem Kinderwunsch

Anders als bei normal verlaufenden Schwangerschaften, können bei Frauen mit habituellen Aborten unbekannter Ursache höhere Level an T_H1-Zytokinen wie INF- γ und niedrigere Konzentrationen von T_H2-Zytokinen gemessen werden (Jenkins et al., 2000). Hier scheint das Gleichgewicht also in Richtung T_H1 verschoben. Auch intrazellulär ist die Expression von T_H1- im Vergleich zu T_H2-Zytokinen bei Frauen mit wiederholten

2. Einleitung

Fehlgeburten und Implantationsversagen höher. So war besonders das Verhältnis von $\text{TNF-}\alpha$ zu IL-4 und IL-10 in Richtung von Ersterem verschoben. Zudem sind, möglicherweise als Folge der verminderten Expression von $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinen, signifikant mehr aktivierte NK-Zellen im peripheren Blut nachweisbar (Kwak-Kim et al., 2003). Auch außerhalb der Schwangerschaft produzieren endometriale T-Helferzellen von Frauen, welche mehr als 3 Aborten erlitten haben, überwiegend $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokine, wobei bei gesunden Frauen die $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinproduktion überwiegt (Lim et al., 2000). Piccinni et al. zeigten, dass deziduale T-Zellen, anders als periphere T-Zellen, von Frauen mit habituellen Aborten deutlich geringere Mengen an LIF und den $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinen IL-4 und IL-10 produzieren (Piccinni et al., 1998; Piccinni, 2005).

Es wird vermutet, dass $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokine thrombotische und entzündliche Prozesse in den mütterlichen plazentaren Gefäßen mit hervorrufen können (Clark et al., 1998). Die Schädlichkeit eines Überwiegens von $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokinen konnte im Tiermodell gezeigt werden. Die Verabreichung von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ und IL-2 an schwangere Mäuse verursachte bei diesen vermehrt Fehlgeburten (Chaouat et al., 1990). Umgekehrt konnte die Gabe von IL-10 Aborte verhindern (Chaouat et al., 1995).

Wie schon erwähnt, spielen auch NK-Zellen eine Rolle bei habituellen Aborten, da auch diese für den Trophoblasten schädliche Zytokine produzieren können. Deziduale NK-Zellen sezernieren $\text{INF-}\gamma$, wodurch Makrophagen in der Dezidua aktiviert werden, welche wiederum für den Trophoblasten toxische Mengen an $\text{TNF-}\alpha$ und auch Stickoxiden produzieren (Baines et al., 1997; Haddad et al., 1997). $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{INF-}\gamma$ können zu Apoptose von Trophoblastzellen führen, sie kommen allerdings auch physiologischerweise in der humanen Plazenta vor (Yui et al., 1994). Bei Nicht-Schwangeren Frauen mit habituellen Aborten in der Vorgeschichte wurde eine erhöhte NK-Zell-Aktivität nachgewiesen. Diese stand zudem im Zusammenhang mit einer höheren Abortrate in der nächsten Schwangerschaft (Aoki et al., 1995).

2.3.6. Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe positiv chemotaktischer Zytokine, von denen bisher über 50 verschiedene bekannt sind. Sie vermitteln ihre Effekte über G-Protein gekoppel-

te Rezeptoren. Tabelle 2.2 zeigt ausgewählte Chemokine und ihre Rezeptoren. Bei Bindung der Chemokine an die Rezeptoren kommt es in den betroffenen Zellen zu Veränderungen des Zytoskeletts und der Zelladhäsion, wodurch Migration dieser Zellen ausgelöst wird. Diese erfolgt entlang eines Chemokingradienten in Richtung der höchsten Konzentration des Chemokins.

Chemokine werden von einer Vielzahl an Geweben und Zellen produziert und sezerniert, dazu zählen Zellen des Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen oder T-Zellen, aber auch Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und Blutplättchen (Murphy et al., 2012b). Im weiblichen Genitaltrakt werden sie unter anderem von Immunzellen, EEC und ESC produziert und sezerniert (García-Velasco und Arici, 1999).

Chemokine werden anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung hauptsächlich in zwei große Gruppen eingeteilt: CC- und CXC-Chemokine. Erstere fördern vor allem die Migration von Monozyten und Lymphozyten, während CXC-Chemokine besonders auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken. Zudem sind sie an vielen weiteren Prozessen, wie beispielsweise der Angiogenese, beteiligt (Murphy et al., 2012b).

Klasse	Chemokin	Rezeptor	Hauptfunktionen
CXC	CXCL-1 (GRO- α)	CXCR2	Aktivierung Neutrophiler, Angiogenese
	CXCL-5 (Ena-78)	CXCR2	Chemotaxis und Aktivierung Neutrophiler
	CXCL-8 (IL-8)	CXCR1, 2	Mobilisierung und Aktivierung Neutrophiler, Angiogenese
CC	CCL-2 (MCP-1)	CCR2B	Aktivierung von Makrophagen, fördert T_H2 -Immunität
	CCL-5 (RANTES)	CCR1, 3, 5	Aktivierung von T-Zellen, chronische Entzündung

Tabelle 2.2.: Ausgewählte Chemokine und ihre Rezeptoren (Murphy et al., 2012b)

ESC produzieren und sezernieren verschiedene Chemokine, darunter alle in der Tabelle 2.2 aufgeführten. Dies spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Menstruation, Abwehr bakterieller Infektionen, Implantation und Erhalt der Frühschwangerschaft (Arima et al., 2000; Chard, 1995; Tabizadeh, 1994).

Veränderungen der Chemokinproduktion im weiblichen Reproduktionstrakt, besonders erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Zytokine, können diverse negative Effek-

2. Einleitung

te haben. So wurde die bei Endometriosepatientinnen gehäufte Infertilität und damit einhergehende Veränderungen bezüglich des Follikels, der Oozyte, der Tubarfunktion und die verminderte Implantationsfähigkeit des Embryos mit solchen Veränderungen in Verbindung gebracht (Tomassetti et al., 2006).

Im Folgenden wird auf einige im Endometrium relevante Chemokine näher eingegangen und ihre Eigenschaften beschrieben. Diese sind auch bei den durchgeführten Experimenten von großer Bedeutung.

2.3.6.1. Growth regulated oncogen alpha (GRO- α) (CXCL-1)

Nach Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren, wie LPS, IL-1 oder TNF- α wird GRO- α u.a. durch Monozyten (Schröder et al., 1990a,b), Fibroblasten (Golds et al., 1989) und Endothelzellen (Mire-Sluis und Thorpe, 1998) produziert. Oral et al. zeigten zudem, dass auch ESC GRO- α produzieren (Oral et al., 1996). Auch hier steigern LPS, IL-1 und TNF- α Expression und Sekretion. Dezidualisierte ESC exprimieren und produzieren deutlich mehr GRO- α , als nicht-dezidualisierte Zellen (Nasu et al., 2001b). Anders als IL-8, dessen Expression durch INF- γ gehemmt wird (Nasu et al., 1998), hat dieses Zytokin keinen Einfluss auf die GRO- α -Produktion durch ESC (Nasu et al., 2001b).

GRO- α wirkt v.a. chemotaktisch und aktiviert neutrophile Granulozyten (Moser et al., 1990). Zudem ist es in der Lage Monozytenarrest zu induzieren. Die Chemotaxis von Monozyten kann es allerdings nicht auslösen (Smith et al., 2005).

GRO- α ist an der Ovulation beteiligt, da Oral et al. zeigten, dass es sich periovulatorisch in der Follikelflüssigkeit nachweisen lässt (Oral et al., 1997). Zudem ist es physiologischerweise in der Amnionflüssigkeit und in Nabelschnurblut nachweisbar. Mit Fortschreiten der Schwangerschaft nimmt die Konzentration in der Amnionflüssigkeit zu. Im Fall von intrauterinen Infektionen sind erhöhte Konzentrationen messbar (Cohen et al., 1996).

Auch lässt sich GRO- α in der Peritonealflüssigkeit von Frauen nachweisen. Im Falle einer Endometrioseerkrankung finden sich dort erhöhte Konzentrationen, welche umso höher sind, je schwerer die Erkrankung ist (Oral et al., 1996).

2.3.6.2. Epithelial-derived neutrophil-activating protein 78 (Ena-78) (CXCL-5)

Ena-78 ist ein aus 78 Aminosäuren bestehendes und 8 kDa schweres Chemokin und weist sowohl strukturelle, als auch funktionale Ähnlichkeiten zu IL-8 und GRO- α auf (Walz et al., 1991). Seine wichtigsten Zielzellen sind neutrophile Granulozyten (García-Velasco und Arici, 1999). Auf sie wirkt es aktivierend und chemotaktisch. Seine chemotaktische Wirkung ist dabei ebenso stark, wie die von IL-8, allerdings wirkt es weniger stark aktivierend. Ursprünglich wurde Ena-78 aus alveolaren Epithelzellen isoliert (Walz et al., 1991) und es wurde zunächst angenommen, dass nur Zellen der Epithelien es produzieren würden (Nasu et al., 2001a). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass die Induktion durch verschiedene inflammatorische Mediatoren, wie LPS, IL-1 oder TNF- α bei verschiedensten Zellen zur Produktion von Ena-78 führt. Dazu zählen Monozyten, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten (Strieter et al., 1992), glatte Muskelzellen der Gefäße (Lukacs et al., 1995) und Endothelzellen (Strieter et al., 1992; Lukacs et al., 1995). Auch an vielen entzündlichen Prozessen und Erkrankungen ist es beteiligt. Beispielsweise wird es in den Epithelzellen der Darmschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und akuter Appendizitis exprimiert (Walz et al., 1997).

Nasu et al. waren die Ersten, die zeigten, dass Ena-78 vom Endometrium exprimiert wird. Im endometrialen Gewebe wurde es dabei stärker in der Sekretionsphase, als in der Proliferationsphase exprimiert. Die Sekretion von Ena-78 durch ESC ist von der Zugabe von Progesteron, LPS, IL-1 β oder TNF- α abhängig (Nasu et al., 2001a). EEC exprimieren und sezernieren im Gegensatz zu ESC auch im unstimulierten Zustand schon Ena-78 (Bersinger et al., 2008).

Endometriosepatientinnen weisen erhöhte Ena-78-Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit auf. Ena-78 wird sowohl von ektopischen EEC und ESC exprimiert, wie auch von Makrophagen des Peritoneums (Mueller et al., 2003), ein weiterer Hinweis für die Rolle dieses Chemokins bei entzündlichen Prozessen.

2.3.6.3. Interleukin-8 (IL-8) (CXCL-8)

IL-8 wird von einer Vielzahl an Zellen im gesamten Körper produziert. Dort ist es als chemotaktisches Zytokin über die Anlockung neutrophiler Granulozyten an vielen entzündlichen Prozessen beteiligt (Walz et al., 1991). Zusätzlich wirkt es u.a. auf T-Zellen, basophile Granulozyten und Endothelzellen (García-Velasco und Arici, 1999). Nach Stimulation durch TNF- α , Lipopolysaccharid oder IL-1 β wird es beispielsweise durch alveolare Makrophagen (Strieter et al., 1990), Fibroblasten (Golds et al., 1989) und Endothelzellen (Strieter et al., 1989) sezerniert. Auch Monozyten des peripheren Blutes produzieren IL-8 (Yoshimura et al., 1987).

IL-8 wird zusätzlich durch EEC und ESC produziert. Diese Produktion ist dabei abhängig von IL-1 und TNF- α (Arici et al., 1993). INF- γ vermindert allerdings die IL-8-Produktion durch ESC (Nasu et al., 1998). Besonders hohe Mengen an IL-8 finden sich in den endometrialen Drüsenzellen. Die IL-8-Expression ist dabei zyklusabhängig und gegen Ende der Sekretionsphase und zu Beginn und Mitte der Proliferationsphase besonders hoch. Dies deutet auf eine Beteiligung des Chemokins an der Menstruation und Neovaskularisation im Endometrium hin (Arici et al., 1998a). Hohe Progesteronlevel verursachen vermutlich die niedrigen IL-8-Konzentrationen in Großteilen der Sekretionsphase, wodurch die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und somit die Abstoßung des Endometriums zunächst verhindert wird (García-Velasco und Arici, 1999). Kommt es zu einer Schwangerschaft, bleiben die Progesteronlevel erhöht. Dies könnte dazu dienen zum Zeitpunkt der Implantation eine inflammatorische Reaktion und Einwanderung von Leukozyten zu unterdrücken (Jones et al., 1997). Caballero-Campo et al. zeigten allerdings, dass die Anwesenheit einer Blastozyste in vitro zu einer verstärkten IL-8-Expression durch EEC führt, was auf einen wichtigen Einfluss des Embryos auf die Chemokinausschüttung während des Implantationsfensters hinweist. Auf die MCP-1-Produktion (siehe unten) hatte die Blastozyste interessanterweise keinen Einfluss (Caballero-Campo et al., 2002).

IL-8 wirkt nicht nur stark chemotaktisch, sondern fördert auch das Zellwachstum verschiedener Zellen, wie Zellen des Endothels (Koch et al., 1992), der Epidermis (Tuschil et al., 1992) und glatter Muskulatur (Yue et al., 1994). Dies unterstreicht die Rolle von IL-8 bei Angiogenese und Gewebewachstum (García-Velasco und Arici, 1999). Zudem

kann es die Proliferation von ESC induzieren (Arici et al., 1998b), sodass es während der frühen Proliferationsphase am Wachstum des Endometriums beteiligt sein könnte (García-Velasco und Arici, 1999) und hemmt zusätzlich die Apoptose von ESC. Sowohl an der Proliferationsförderung, als auch an der Apoptosehemmung ist der Rezeptor CXCR1 beteiligt. Es gibt Hinweise, dass dabei auch der Akt-Signalweg eine Rolle spielt (Li et al., 2012).

Wie auch GRO- α ist IL-8 in der Follikelflüssigkeit nachweisbar. Es ist vermutlich beteiligt an der periovulatorischen Chemotaxis von u.a. neutrophilen Granulozyten (Chang et al., 1998).

Die mRNA von IL-8 konnte in Amnion, Chorion, Dezidua, Plazentazotten und Nabelschnurgewebe nachgewiesen werden (Fortunato et al., 1995; García-Velasco und Arici, 1999). IL-8 spielt zusätzlich eine Rolle bei der Vorbereitung der Cervix vor der Geburt, in dem es Immunzellen anlockt, welche dafür erforderliche Enzyme wie Kollagenase oder Elastase sezernieren (Sennström et al., 1997).

IL-8 scheint auch eine Rolle bei der Pathogenese von Endometriose zu spielen. In der Peritonealflüssigkeit betroffener Frauen sind erhöhte IL-8-Konzentrationen nachweisbar (Ryan et al., 1995) und zudem ist die Expression von IL-8 und seinem Rezeptor CXCR 1 in ESC bei an Endometriose erkrankten Frauen erhöht (Li et al., 2012).

2.3.6.4. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (CCL-2)

Das proinflammatorische Chemokin MCP-1 induziert Chemotaxis hämatopoetischer Progenitorzellen (García-Velasco und Arici, 1999) und verschiedener Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Basophile, dendritische Zellen, T-Zellen und NK-Zellen (Baggiolini, 1998; Uguccioni et al., 1995; Wuyts et al., 1994; Loetscher et al., 1994). Auch Uterine NK-Zellen im Endometrium weisen den MCP-1-Rezeptor CCR-2 auf (Chantakru et al., 2001). MCP-1 wird an verschiedensten Stellen im menschlichen Körper exprimiert, u.a. von Epithelzellen, Endothelzellen, glatter Muskulatur, Bindegewebszellen, Adipozyten, Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten (Seli et al., 2001; Caballero-Campo et al., 2002; Jung et al., 1995; Meter et al., 2005).

Arici et al. wiesen MCP-1-mRNA in vitro sowohl in EEC, als auch ESC nach. Die Pro-

2. Einleitung

duktion von MCP-1 erhöhte sich unter Einfluss von IL-1 α , TNF- α (Arici et al., 1995) und INF- γ (Nasu et al., 1998). Meter et al. zeigten zudem, dass EEC das Chemokin nach basal und apikal sezernieren und dadurch Chemotaxis bei Monozyten sowohl ins Uteruskavum, als auch ins Endometrium hervorrufen können (Meter et al., 2005). Gegen Ende des Zyklus ist die MCP-1-Konzentration, wie auch die Konzentration von IL-8, im Endometrium erhöht und ist dabei vermutlich an der prämenstruellen Chemotaxis von Leukozyten ins Endometrium beteiligt (Jones et al., 1997). MCP-1 spielt, wie IL-8 und GRO- α , bei der Chemotaxis von Leukozyten in und um den präovulatorischen Follikel eine Rolle (Arici et al., 1997b).

Wie u.a. IL-8 spielt auch MCP-1 eine Rolle bei der Pathogenese von Endometriose. In der Peritonealflüssigkeit betroffener Patientinnen sind umso höhere Konzentrationen nachweisbar, je schwerer die Erkrankung ist (Arici et al., 1997a). Auch in endometrialen Drüsen von Endometriosepatientinnen konnte MCP-1 nachgewiesen werden (Jolicoeur et al., 1998). Akoum et al. zeigten zudem, dass Makrophagen des Peritoneums von Endometriosepatientinnen, sowohl spontan, als auch nach Stimulation durch LIF mehr MCP-1 sezernieren, als bei gesunden Frauen (Akoum et al., 2002). MCP-1 führt zu einer verstärkten Sekretion des angiogenetischen vascular endothelial growth factor (VEGF) durch ESC. Die zusätzliche Stimulation mittels Estradiol erzeugt einen weiteren, synergistischen Effekt. Bei Endometriosepatientinnen sind diese Effekte noch stärker ausgeprägt. Angiogenese spielt beispielweise bei der Implantation endometriotischer Herde eine wichtige Rolle (Lin und Gu, 2005). Ebenso sezernierten EEC unfruchtbarer Patientinnen MCP-1 nach Stimulation mit Estrogen und Progesteron (Caballero-Campo et al., 2002).

MCP-1 wurde auch mit Prozessen wie Implantation (Meter et al., 2005), Erhalt oder Abstoßung von Schwangerschaft (Denison et al., 1998b), Frühgeburt, vorzeitigem Blasenprung (Jacobsson et al., 2003) und Termingeburt (Denison et al., 1998a) in Verbindung gebracht.

2.3.6.5. Regulated upon activation, normally T-cell expressed and secreted (RANTES) (CCL-5)

RANTES nimmt eine Schlüsselrolle in der Initiierung von sowohl physiologischen, als auch pathologischen Entzündungsreaktionen ein (Conti et al., 1999), wie z.B. bei der Implantation und Regeneration des Endometriums während des Menstruationszyklus. Die wichtigsten Zielzellen von RANTES sind Gedächtnis-T-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen (García-Velasco und Arici, 1999) und Monozyten (Schall et al., 1990). Es wird u.a. produziert durch Makrophagen, Endothelzellen (Devergne et al., 1994), mittels Thrombin stimulierten Blutplättchen (Kameyoshi et al., 1992) und Fibroblasten (Rathanaswami et al., 1993).

Im Endometrium ist RANTES an verschiedenen immunologischen Vorgängen beteiligt (Hornung et al., 1997) und kommt besonders im Stroma physiologischerweise während des gesamten Zyklus vor. $\text{TNF-}\alpha$ alleine oder in Kombination mit $\text{INF-}\gamma$ fördert dort die Expression und Sekretion durch ESC, aber nicht durch EEC (Hornung et al., 1997; Arima et al., 2000). Auch Lipopolysaccharid und $\text{IL-1}\beta$ steigern die RANTES-Sekretion und -Expression von ESC, wodurch Chemotaxis von beispielsweise Makrophagen und Lymphozyten in die Dezidua ausgelöst wird (Arima et al., 2000). IL-4 , eines der $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokine, führte hingegen zu einer deutlichen Verminderung der gesteigerten RANTES-Sekretion durch $\text{TNF-}\alpha$ (Arima et al., 2000).

Bei Endometriosepatientinnen sind erhöhte RANTES-Level in der Peritonealflüssigkeit nachweisbar, welche mit dem Krankheitsstadium korrelieren (Khorram et al., 1993). Auch wurde gezeigt, dass Zellen von Endometrioseherden RANTES exprimieren, verstärkt unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{INF-}\gamma$, wodurch es zu einer verstärkten Chemotaxis von Makrophagen und T-Zellen in die Gebärmutter und auch in die Endometrioseherde kommt (Hornung et al., 1997).

2.3.7. Die besondere Rolle von $\text{TNF-}\alpha$

$\text{TNF-}\alpha$ zählt zu den $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokinen. Es wird hauptsächlich durch Zellen des mononukleären-phagozytären Systems produziert, wie Monozyten und Makrophagen, NK-Zellen

2. Einleitung

und nach Antigen-Präsentation stimulierten T-Zellen (Vitoratos et al., 2006). Auch Endothelzellen und Fibroblasten können TNF- α produzieren (Haider und Knöfler, 2009). TNF- α übt seine Funktion entweder in membrangebundener oder löslicher Form aus (Haider und Knöfler, 2009) und bindet an die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 (Locksley et al., 2001). Einer der Signalwege, die durch TNF- α aktiviert werden können, führt dabei über den Transkriptionsfaktor NF κ B (Yang et al., 2001). In Zellen, in denen der NF κ B-Signalweg blockiert ist, ist TNF- α allerdings auch in der Lage Caspase-8 zu aktivieren und darüber Apoptose zu initiieren (Karin und Lin, 2002; Wang et al., 2008).

Die Konzentration von TNF- α scheint darüber zu entscheiden, ob es eher günstige oder schädigende Effekte ausübt. Einerseits ist TNF- α in Prozesse involviert, welche eine Rolle spielen beim Überleben, der Proliferation und Differenzierung von Zellen, wie auch bei der Immunabwehr. Andererseits ist es ein proinflammatorisches, zytotoxisches Zytokin, welches u.a. beteiligt ist an Apoptose und vielen Autoimmunerkrankungen. Die TNF- α -Wirkung ist u.a. auch von den Zellen und Geweben, auf die es wirkt, von der Rezeptorverteilung und der Dauer der Einwirkung abhängig (Haider und Knöfler, 2009).

Im Reproduktionstrakt wird TNF- α von vielen verschiedenen Zellen exprimiert. Dazu zählen im Myometrium die glatten Muskelzellen und im Endometrium u.a. Fibroblasten, Makrophagen, Epithelzellen der Drüsen und Endothelzellen (Chen et al., 1991; Hunt et al., 1992; Yang et al., 2001; Vince et al., 1992; Philippeaux und Piguet, 1993). Während des Zyklus verändern sich dabei die nachweisbaren Konzentrationen in den Drüsenzellen des Endometriums. Zu Beginn der Proliferationsphase ist kaum TNF- α vorhanden, die Konzentration steigt dann zunehmend und bleibt während der Sekretionsphase hoch. ESC produzieren über den Zyklus hinweg nur geringe Mengen an TNF- α (von Wolff et al., 1999). Während der Dezidualisierung konnte TNF- α -mRNA in ESC, Makrophagen (Vince et al., 1992), uterinen NK-Zellen und T-Zellen (Jokhi et al., 1994) nachgewiesen werden. Auch während der Schwangerschaft ist TNF- α nachweisbar, während des ersten Trimesters in allen trophoblastischen Zellen (Yang et al., 1993; King et al., 1995), später v.a. in den Plazentazotten (Hung et al., 2004). Im Endometrium und während der Schwangerschaft werden TNF- α sowohl förderliche als auch schädliche Effekte zugeschrieben. Es ist wichtiger Teil der für die Gesundheit

der werdenden Mutter unerlässlichen Immunabwehr (Haider und Knöfler, 2009). Durch seine proapoptotische Eigenschaft ist TNF- α in der Plazenta beteiligt an der physiologischen Zellerneuerung der Trophoblasten (Haider und Knöfler, 2009) und an der für die Entwicklung des Kindes unerlässlichen Apoptose fetalen Gewebes (Menon et al., 2002). Über die Aktivierung von Prothrombinasen wirkt es prokoagulativ (Knackstedt et al., 2003). Durch seine proinflammatorischen, proapoptotischen und prokoagulativen Eigenschaften wird ihm eine Abort-fördernde Rolle zugeschrieben (Vitoratos et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass bei Schwangeren mit vorherigen wiederholten Aborten unbekannter Ursache erhöhte Serumkonzentrationen von TNF- α zu finden sind (Arslan et al., 2004). Die Gabe von TNF- α -Inhibitoren bei der Behandlung von Frauen mit habituellen Aborten zusätzlich zu Heparin, Aspirin und IgG kann die Geburtenrate steigern (Winger und Reed, 2008).

Auch bei Frühgeburtlichkeit ohne nachweisbare Infektion scheint TNF- α von Wichtigkeit zu sein, da es gemeinsam mit anderen Zytokinen daran beteiligt ist den Uterus aus dem Ruhezustand in einen für die Austreibung bereiten aktiven Zustand zu versetzen (Christiaens et al., 2008). Ebenso finden sich im Serum von Präeklampsiepatientinnen erhöhte TNF- α -Konzentrationen (Cackovic et al., 2008).

Im Endometrium ist TNF- α über den NF κ B-Signalweg (Huber et al., 2007) an der Regulierung von Zytokinen wie IL-8, RANTES und MCP-1 beteiligt und somit an Prozessen wie Angiogenese, Apoptose, Proliferation, Zelldifferenzierung und Chemotaxis (Kayisli et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α den NF κ B-Inhibitor I κ B α hemmt und durch verstärkte Phosphorylierung von NF κ B zu dessen Aktivierung beiträgt (Spratte et al., 2013). Durch seine proapoptotischen Eigenschaften ist TNF- α an der Abbruchblutung zu Beginn des Zyklus beteiligt (Haider und Knöfler, 2009). Andererseits wird ihm aber auch eine Funktion bei der Regeneration des Endometriums zugeschrieben (Chobotova et al., 2002).

Bei ungewollter Kinderlosigkeit ist TNF- α teilweise beteiligt. Bei Frauen mit Endometriose, PCOS oder Eileiterverschluss wurden erhöhte Konzentrationen an verschiedenen Zytokinen, darunter TNF- α , in der Peritonealflüssigkeit gefunden (Iborra et al., 2005). Auch bei primär infertilen Frauen konnte dies nachgewiesen werden (Eisermann et al., 1988).

2.4. Hämostaseologische Grundlagen

Die Hämostase ist ein komplexes System, welches auf dem Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, der Gefäßwand und dem plasmatischen Gerinnungssystem beruht. Zu letztgenanntem gehören neben Gerinnungsaktivatoren und -inhibitoren das Fibrinolyse-system (Renz-Polster und Krautzig, 2013). Blutgerinnung und Fibrinolyse finden dabei ständig statt und stehen im Gleichgewicht zueinander (Löffler et al., 2007). Bei der plasmatischen Gerinnung werden klassischerweise ein intrinsisches und ein extrinsisches System mit einer gemeinsamen Endstrecke zur Aktivierung der Gerinnungskaskade unterschieden. Das intrinsische System wird aktiviert, wenn Blut mit negativ geladenen Oberflächenstrukturen in Kontakt kommt, z.B. der Zellmembran eines aktivierten Thrombozyten. Daraufhin wird eine Kaskade sich gegenseitig aktivierender Gerinnungsfaktoren in Gang gesetzt. Involviert ist dabei u.a. der Faktor VIII, welcher mithilfe von Thrombin in den Faktor VIIIa umgewandelt wird. Das extrinsische System wird bei Schädigung des Endothels und dadurch möglichem Kontakt zu Gewebethromboplastin aktiviert. Beide Systeme führen in ihrer Endstrecke zur Umwandlung von Faktor X (Boron und Boulpaep, 2009) zur Serinprotease Faktor Xa durch Spaltung einer Peptidgruppe der schweren Kette (Scipio et al., 1977). Aus Faktor Xa, Kofaktor Va, für dessen Bildung Thrombin benötigt wird, Phospholipid und Kalzium entsteht der Prothrombinase-Komplex, welcher Prothrombin in Thrombin umwandelt. Thrombin katalysiert nun die Bildung von Fibrinmonomeren aus Fibrinogen, die Voraussetzung für die Entstehung eines stabilen Fibrinthrombus ist (Boron und Boulpaep, 2009).

2.4.1. Thrombin

Wie schon erwähnt spielt Thrombin, eine aus zwei Polypeptidketten bestehende Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 39.000 (Davie et al., 1991), die zentrale Rolle in der Gerinnungskaskade mit den oben genannten Funktionen. Auch kann es seine eigene Bildung katalysieren. Zusätzlich stellt es eine Verbindung zur primären

Hämostase dar, indem es über den G-Protein gekoppelten Rezeptor PAR-1 (Protease-aktivierter Rezeptor-1) Thrombozyten aktiviert (Boron und Boulpaep, 2009). Thrombin ist in der Lage PAR-1, -3 und -4 zu aktivieren (Marcfarlane et al., 2001), wodurch der ERK/MAPK-Signalweg in Gang gesetzt werden kann. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellproliferation und -differenzierung (Marshall, 1995). Thrombin induziert so u.a. die Proliferation von glatten Muskelzellen (Lin et al., 2001), Fibroblasten (Trejo et al., 1996) und Astrozyten (Wang et al., 2002).

Kawano et al. demonstrierten, dass Stimulierung mittels Thrombin zu einer vermehrten Produktion der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 durch ESC führt. Auch dies erfolgt über die Aktivierung von PAR-1, Phosphorylierung von MAP Kinase und darauf folgend Aktivierung von ERK 1 und 2 (Kawano et al., 2011). Experimentell kann der MAPK/ERK1/2-Signalweg mittels PD98059 gehemmt werden.

2.5. Heparine und ihre Eigenschaften

Heparin wurde 1916 von McLean entdeckt (McLean, 1916) und zählt zu den Glykosaminoglykanen. Es besteht aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aus Uronsäure und Aminozucker mit zahlreichen Sulfatgruppen (Casu, 1989). Die Bedeutung des körpereigenen Heparins, gebildet u.a. durch Mastzellen in Leber und Lunge und basophilen Granulozyten, ist bisher nur teilweise verstanden. Bei klinisch verwendeten Heparinen, meist aus Rinderlunge oder Schweinemukosa gewonnen, werden unfraktioniertes Heparin (UFH), ein Molekülgemisch heterogenen Molekulargewichts von 5 bis 30 kDa (Löffler et al., 2007), und niedermolekulare Heparine (LMWH) (4-6 kDa) unterschieden (Mutschler et al., 2008). Beispiele für LMWH sind Reviparin (4,4 kDa) Enoxaparin (4,5 kDa), Dalteparin (6 kDa) oder Tinzaparin (6,5 kDa) (Gray et al., 2008). Schon 1939 wurde erkannt, dass Heparin zur Antikoagulation einen Kofaktor benötigt (Brinkhous et al., 1939). Antithrombin III (AT III), ein in der Leber gebildetes α_2 -Globulin (Mutschler et al., 2008), ist einer der wichtigsten Inhibitoren der Blutgerinnung, welcher durch Komplexbildung nicht nur Thrombin, sondern auch die aktivierten Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa hemmen kann (Löffler et al., 2007). Heparin oder ähnliche sulfatierte Glykosaminoglykane binden über eine Pentasaccharideinheit an AT III

2. Einleitung

(Hirsh und Raschke, 2004), verursachen eine Konformitätsänderung (Mutschler et al., 2008) und führen zu einer stark beschleunigten Reaktion zwischen AT III und einer dieser Serinproteasen, wodurch die Fibrinbildung verhindert wird (Davie et al., 1991). Für die Thrombinhemmung sind Heparine mit einer Mindestkettenlänge von 18 Monomeren erforderlich, während die Faktor-Xa-Hemmung auch durch LMWH möglich ist. LMWH haben eine längere Halbwertszeit und besser vorhersagbare Wirksamkeit, weshalb anders als beim Einsatz von UFH, kein regelmäßiges Monitoring notwendig ist (Mutschler et al., 2008). Zusätzlich zu dem antikoagulativen Effekt über AT III hat Heparin in hoher Konzentration hemmenden Einfluss auf die Plättchenaggregation (Fernandez et al., 1986) und erhöht die Permeabilität von Gefäßwänden (Blajchman et al., 1989). Außerdem hemmt Heparin die Proliferation glatter Muskelzellen (Clowes und Karnowsky, 1977).

Klinisch werden UFH und LMWH v.a. aufgrund ihrer antikoagulativen Wirkung eingesetzt, z.B. zur prä- und postoperativen Prophylaxe und Behandlung von Venenthrombosen und Lungenembolien, bei instabiler Angina pectoris und zur Akuttherapie von akuten Myokardinfarkten (Hirsh, 1991). Sie können aufgrund des hohen Molekulargewichts und der vielen negativen Ladungen nur parenteral verabreicht werden (Mutschler et al., 2008). Heparine eignen sich zur Antikoagulation während der Schwangerschaft und für den Einsatz in der Reproduktionsmedizin, da sie nicht plazentagängig sind und keine teratogenen Effekte zu haben scheinen (Walker et al., 2003).

Zu den möglichen Nebenwirkungen durch eine Heparintherapie zählen Blutungen, wie Haut- und Schleimhautblutungen (Levine und Hirsh, 1986), Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) (Warkentin und Kelton, 1989), Osteoporose nach Langzeittherapie (Ginsberg et al., 1990) und allergische Reaktionen (Curry et al., 1973).

Seit längerem ist bekannt, dass Heparine auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen, auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen nur teilweise verstanden sind. Zu den dabei relevanten möglichen Mechanismen zählt die Bindung an Heparinbindende Proteine, wie einige Akut-Phase-Proteine (Young et al., 1997) und Proteine des Komplementsystems (Weiler et al., 1992). Körpereigene Heparine und verwandte Glykosaminoglykane wie Heparansulfat können über Veränderungen von proinflammatorischen Zytokinen das Immunsystem beeinflussen, indem sie diese binden und somit davon abhalten mit ihren eigentlichen Rezeptoren zu interagieren (Young,

2008). Ein weiterer Mechanismus könnte sein, dass Heparin und LMWH in der Lage sind die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an aktivierte Endothelzellen zu verhindern, wodurch eine Entzündungsreaktion abgemildert werden kann (Bazzoni et al., 1993; Lever et al., 2000). Auch LMWH sind in der Lage die Migration von Leukozyten und die anschließende Adhäsion an die Gefäßwand zu unterdrücken (Christopherson et al., 2002; Manduteanu et al., 2002). Zusätzlich zeigte sich, dass Heparine die Zytotoxizität von NK-Zellen vermindern können (Johann et al., 1995). Auch sind sie in der Lage sowohl in Endothelzellen, als auch in ESC die Zellantwort auf $\text{INF-}\gamma$ zu verhindern (Fritchley et al., 2000; Hatakeyama et al., 2004; Fluhr et al., 2011a).

Einiges deutet darauf hin, dass Heparin mittels des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$, welcher auch in die Regulation von mit Zytokinen und damit Immun- und Entzündungsreaktionen assoziierten Genen involviert ist, seine antiinflammatorische Wirkung entfaltet (Young, 2008). $\text{NF}\kappa\text{B}$ kann durch zahlreiche Faktoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Lipopolysaccharide, freie Radikale oder oxidativen Stress aktiviert werden (Christman et al., 1998). In unstimulierten Zellen befindet es sich im Zytosol gebunden an $\text{I}\kappa\text{B}$ (inhibitors of kappa B) (Wulczyn et al., 1996). Bei Stimulation wird dieser Komplex phosphoryliert, woraufhin $\text{I}\kappa$ abgespalten und inaktiviert wird (Brown et al., 1995; Traenckner et al., 1995; Karin und Ben-Neriah, 2000) und $\text{NF}\kappa$ in den Nukleus transloziert und die Transkription proinflammatorischer Gene, wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 veranlasst (Karin und Ben-Neriah, 2000).

Heparin kann von verschiedenen Zellen gebunden und ins Zytosol aufgenommen werden, z.B. von Endothelzellen (Young et al., 1999) oder glatten Muskelzellen (Letourneur et al., 1995). Heparine und verwandte Moleküle können dort an $\text{NF}\kappa\text{B}$ binden und seine Translokation verhindern. So konnte gezeigt werden, dass Heparin die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung in durch $\text{TNF-}\alpha$ aktivierten Endothelzellen verhindern kann (Thourani et al., 2000) und LMWH dies in T-Zellen erreichen (Hecht et al., 2004). UFH und LMWH sind in der Lage proinflammatorische Zytokine und $\text{NF}\kappa\text{B}$ in Monozyten herunterzuregulieren (Hochart et al., 2006). In ESC greift Heparin in die $\text{NF}\kappa$ -Aktivität im Nukleus ein und verhindert zudem dessen Bindung an die DNA (Spratte et al., 2013).

$\text{NF}\kappa\text{B}$ kann mittels Parthenolid gehemmt werden, da dieses mehrere Komponenten des Signalwegs inhibieren kann, u.a. durch Bindung an Untereinheiten von $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Hewa-

2. Einleitung

mana et al., 2008) und Hemmung von $I\kappa B$ (Diamanti et al., 2013).

Schon 1996 konnte gezeigt werden, dass Heparine auch bei habituellen Aborten hilfreich sein können. In einer von Kutteh durchgeführten Studie wurde demonstriert, dass Patientinnen mit APS ein signifikant besseres Schwangerschaftsoutcome bei einer Behandlung von niedrig-dosiertem Aspirin plus Heparin hatten, als bei der alleinigen Aspiringabe (Kutteh, 1996). Auch bei Patientinnen mit habituellen Aborten und Phospholipid-Antikörpern führt die oben genannte Kombinationstherapie zu signifikant niedrigeren Abort- und höheren Lebendgeburtenraten (Rai et al., 1997). Bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen im Rahmen reproduktionsmedizinischer Behandlungen aber ohne Thrombophilien, die mit LMWH behandelt wurden, zeigten sich nach IVF höhere Implantations- und Geburtenraten. Dies war allerdings statistisch nicht signifikant (Urman et al., 2009).

UFH, wie auch LMWH haben dabei Einfluss auf die Dezidualisierung von ESC, wodurch möglicherweise die Empfänglichkeit des Endometrium beeinflusst wird (Fluhr et al., 2010, 2011b). Ebenso konnte gezeigt werden, dass UFH die durch $TNF-\alpha$ induzierte vermehrte Expression und Sekretion der Zytokine IL-8 und IL-6 durch dezidualisierte und nicht-dezidualisierte ESC vermindert (Spratte et al., 2013).

2.5.1. Weitere Antikoagulantien

Im Folgenden wird auf einige weitere Antikoagulantien und Heparin-ähnliche Moleküle eingegangen, welche in den durchgeführten Experimenten eine Rolle gespielt haben.

Danaparoid-Natrium zählt zu den Heparinoiden, Präparate mit heparinähnlicher Wirkung, und wird v.a. bei Patienten mit HIT II in der Vorgeschichte eingesetzt. Es besteht aus verschiedenen niedermolekularen Glykosaminoglykanen (84% Heparansulfat, 12% Dermatansulfat, 4% Chondroitinsulfat) und hat nur etwa halb so viele negative Ladungen wie Heparin oder Dextransulfat. Ersteres führt dabei zu einer Faktor-Xa-Hemmung, letzteres hemmt Thrombin. Klinisch wird es in der Behandlung und Prophylaxe von Thrombosen angewendet (Mutschler et al., 2008).

Ein sehr potenter direkter Thrombinhemmer, welcher AT-III-unabhängig agiert, ist **Hirudin**. Es wurde ursprünglich aus dem Drüsensekret von Blutegeln gewonnen und

besteht aus 65 Aminosäuren. In Deutschland werden im klinischen Alltag verschiedene Hirudin-Derivate eingesetzt. Diese werden parenteral verabreicht und sowohl zur weiteren Antikoagulation nach HIT II, als auch zur Thromboseprophylaxe angewendet (Mutschler et al., 2008).

Die Einschränkungen, die die Behandlung mit den bisherigen Antikoagulantien, wie Heparinen und Vitamin-K-Antagonisten, mit sich bringen, führten mit zur Entwicklung der sogenannten NOAK (neue orale Antikoagulantien). Dies sind oral verabreichbare, direkte Thrombin- und Faktor-Xa-Hemmer (Weitz, 2010). Einer dieser direkten Faktor-Xa-Inhibitoren ist **Rivaroxaban**, ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 436 (Weitz, 2010). Faktor Xa zu hemmen ist u.a. deshalb so interessant, da ein aktiviertes Faktor-Xa-Molekül zur Generierung von 1000 Thrombin-Molekülen beiträgt (Mann et al., 2003). Außerdem sind direkte Faktor-Xa-Hemmer in der Lage nicht nur freien, sondern auch an Prothrombinase gebundenen Faktor Xa zu hemmen (Perzborn et al., 2005). Rivaroxaban ist in Europa zugelassen zur Prophylaxe venöser Thromboembolien nach elektiven Hüft- oder Kniegelenkersatzoperationen, zur Prävention von Schlaganfällen bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern, in der Sekundärprophylaxe nach akutem Koronarsyndrom und zur Behandlung tiefer Venenthrombosen und Lungenembolien (EMA, 2016). Es ist kontraindiziert in der Schwangerschaft (Sunkara et al., 2016).

Dextransulfat ist ein stark sulfatiertes Polyanion und Polysaccharid, aber ohne antikoagulative Eigenschaften. Wie auch Heparine gehört Dextransulfat zur Familie der Glykosaminoglykane und kommt in unterschiedlichen Molekulargewichten vor (Zeerleder et al., 2002). Dextransulfat mit hohem Molekulargewicht ist in der Lage die Thrombinhemmung durch AT III und Heparin zu beschleunigen (Yamagishi et al., 1984), auch kann es die Thrombozytenfunktion beeinflussen (Reches et al., 1979). Mit einem niedrigen Molekulargewicht übt es einen direkten hemmenden Effekt auf Faktor Xa aus und hemmt zusätzlich die Thrombozytenfunktion (Zeerleder et al., 2002).

2-O, 3-O desulfatiertes Heparin (**ODSH**), welches durch selektive Desulfatierung von UFH hergestellt wird, weist das Molekulargewicht betreffend vergleichbare Eigenschaften wie UFH auf. Es verfügt allerdings über eine geringe Affinität zu AT III und geringe hemmende Eigenschaften gegenüber Faktor Xa und Thrombin (Fryer et al., 1997; Rao et al., 2010).

2.6. Zielsetzung und Fragestellungen

Wie einleitend beschrieben wurde, sind die Zusammenhänge zwischen der positiven Wirkung von Heparinen bei der Verhinderung und Behandlung habitueller Aborte und anderer Schwangerschaftskomplikationen noch nicht eindeutig geklärt. Veränderungen des Immunmilieus und damit einhergehend der Chemokinzusammensetzung im weiblichen Genitaltrakt spielen bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen, wie Implantationsversagen und habituellen Aborten. Dabei sind TNF- α und Thrombin als Modulatoren der Chemokinproduktion von besonderer Bedeutung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand also darin, zu untersuchen, wie die proinflammatorischen und pathophysiologisch relevanten Moleküle TNF- α und Thrombin auf die Zytokinproduktion endometrialer Stromazellen wirken und wie Heparine dies beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen einen besseren Einblick in die immunmodulatorische Wirkungsweise von Heparinen im Endometrium zu erlangen. Unter diesen Gesichtspunkten wurde bei der vorliegenden Arbeit versucht auf folgende Fragen Antworten zu finden:

1. Welchen Einfluss hat Heparin auf die durch das proinflammatorische TNF- α hervorgerufenen Veränderungen der Zytokinproduktion durch endometriale Stromazellen?
2. Wie beeinflusst das proinflammatorische Thrombin die Zytokinproduktion endometrialer Stromazellen und welchen Einfluss haben Heparine darauf?
3. Welche Signalwege sind an der Vermittlung der Effekte durch TNF- α , Thrombin und Heparin beteiligt?
4. Welche Eigenschaften von Heparinen sind wichtig für die von ihnen ausgelöste Wirkung auf endometriale Stromazellen?

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden im Abschnitt 3.1 zunächst die in den Experimenten verwendeten Materialien vorgestellt. Anschließend folgt im Abschnitt 3.2 die detaillierte Beschreibung der Versuchsaufbauten und -abfolgen der durchgeführten Experimente wie auch der statistischen Auswertung.

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Gerät	Gerätenummer	Hersteller
Abzug	Typ 2-453-GAHD	Köttermann, Uetze/Hängsen, Deutschland
Analysewaage	MC1 Analytic AC 210P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	MLS-3750	Sanyo, Moriguchi, Japan
Automatischer Flockeneisbereiter	AF 100	Scotsman Europe, Mailand, Italien
CO ₂ Inkubator	CytoGROW GLP Series CO ₂ , MCO-18 AIC	Sanyo, Moriguchi, Japan
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenleser	FLUOstar Optima	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Handdispenser	Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubationsbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlsystem 4°C	Premiere VKS 25046	Premiere Hausgerätetechnik, Ascheberg, Deutschland
	-20°C	MDF-U333

3. Material und Methoden

Gerät	Gerätenummer	Hersteller
-20°C -80°C	WKS 3200	Liebherr, Bulle, Schweiz
	MDF-Uf3V	Sanyo, Moriguchi, Japan
Mehrkanalpipette	100 µl, 300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroplattenwaschgerät	Asys Atlantis	Biochrom Asys, Salzburg, Österreich
Mikroskop	Nikon TMS	Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland
PCR	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipettierhilfe	pipetus® -akku	Hirschmann, Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
	accu-jet® pro	BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland
Reinigungs- und Desinfektionsautomat	G 7883 CD	Miele und Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Reinstwassersystem	Synergy®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schüttelinkubator	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
	KS-15 CONTROL	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS9	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Thermocycler	Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Reagenzglas mischer	Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Rotilabo® -Mini-Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikelnummer	Artikelbez.	Hersteller
Abdeckfolie für ELISA	100-SEAL-PLT	SealPlate® : 676 070	Excel Scientific, Victorville, USA
Adeckfolie für PCR	676 070	VIEWseal™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Allzweckdosen	2-1587		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Aufbewahrungsrack für PCR-Tubes und -Strips	2-2603		neoLab, Heidelberg, Deutschland
	2-2604		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Einwegskalpell, steril	No.22	Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
ELISA Mikroplatte	DY990	Clear Microplate	R&D Systems, Minneapolis, USA
Membranfilter	291-4520	Nalgene® Rapid-Flow 500ml Bottle Top Filter, 0,2µm	NALGENE, Part of Thermo Fisher Scientific inc., Rochester, USA
	291-4545	Nalgene® Rapid-Flow 500ml Bottle Top Filter, 0,45µm	NALGENE, Part of Thermo Fisher Scientific inc., Rochester, USA
Zellsieb	352340	Cell strainer, 40 µm, Nylon, steril	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Flüssigkeitsreservoir	E830.1	Rotilabo Flüssigkeitsreservoir, PVC	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gestelle	1-5136	Acrylglasgestell 2x12	neoLab, Heidelberg, Deutschland
	1-5138	Acrylglasgestell 4x12	
	1-5139	Acrylglasgestell 6x12	
	2-1630	neoRack® -Röhrchengestell 9x9	

3. Material und Methoden

Produkt	Artikelnummer	Artikelbez.	Hersteller
	2-1631	neoRack® -Röhr- chengestell 7x7	
	5972-0430	Unwire™ Halfracks 3x3	NALGENE Labware/ Thermo Fisher Scienti- fic, Waltham, USA
Handtuchpapier	HE 5402	Zick-Zack Hand- tücher	Heemann OHG, Fal- kensee, Deutschland
Indikatorband	8221.1	Indikatorband für Dampfsterilisati- on	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Klebeband	C6001210	Scotch® Crystal Clear	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Kryo-Aufbewah- rungsboxen	2-2700	mit Deckel	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Kultivierungs- flasche	831813002	75 cm ²	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Labor- und Hy- gienetücher	16515-00	zetBox©	ZVG Zellstoff-Vertriebs GmbH, Troisdorf, Deutschland
Laborglas- flaschen			
50 ml	21 801 17 5		DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
100 ml	21 801 24 5		
250 ml	21 801 36 5		
2000 ml	21 801 63 5		
Messzylinder			
100 ml	21 396 24		DURAN Group GmbH, Wert- heim/Main, Deuts- chland
500 ml	K851.1	Rotilabo® - Messzylinder aus PP	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm	PM-996		Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Streifen	710980	8er-SoftStrips® mit Single Cap, 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Ol- dendorf, Deutschland

Produkt	Artikelnummer	Artikelbez.	Hersteller
PCR-Platte		96 Well Polypropylen Microplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Petrischale	0690.1	Rotilabo® - Petrischalen, Durchmesser 10 cm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pinzette	1-1811	Pinzette, anatomisch	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen			
10 µl ohne Filter	720011	Micro Tips Premium	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
10 µl mit Filter	780012	SafeSeal Tips Premium	
100 µl mit Filter	780102	SafeSeal Tips Premium	
200 µl ohne Filter	70.760.002		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
1000 µl ohne Filter	0030.000-919	epT.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1000 µl mit Filter	076927300		nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
5000 µl ohne Filter	0030.000-978	epT.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Direktverdränger-spitzen, unsteril			
1 ml	0030069.234	Combitips® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2,5 ml	022266306		
5 ml	022266403		
10 ml	022266501		
Direktverdränger-spitzen, steril			
2,5 ml	022496085	Combitips Biopur®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5 ml	022496107		
10 ml	022496123		

3. Material und Methoden

Produkt	Artikelnummer	Artikelbez.	Hersteller
Reaktionsgefäße 1,5 ml	72.690.001		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
	2 ml	0030 123.344	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 1 ml 5 ml 10 ml 25 ml	86.1251.001		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
	86.1253.001		
	86.1254.001		
	86.1685.001.		
Steigeinsatz für Kryoboxen	P898.2		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stoppuhr	0773.1	Rotilabo-Signal-Timer, Modell: SKT338N	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taschenrechner		Modell: KF01605	Q-CONNECT, Gent, Belgien
Tischständer für Vernichtungsbeutel	951.297		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Universelle Beschriftungs-Klebebänder	2-640	10 Rollen + Dispenser	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Untersuchungshandschuhe	13941	Sterling Nitrile, puderfrei, KC300	Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
Vernichtungsbeutel	861.197		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatte 96-Well Mikrotiterplatte	167008	F26 Micro-Well™ Plate	nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	96-Well Mikrotiterplatte, U-Boden	650180	Greiner Bio-One GmbH,

Produkt	Artikelnummer	Artikelbez.	Hersteller
48-Well Zellkulturplatte	677180		Frickenhausen, Deutschland
24-Well Zellkulturplatte	353047		BD Biosciences
12-Well Zellkulturplatte	353043		Franklin Lakes, USA
6-Well Zellkulturplatte	83.1839		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen			
15 ml	62.554.502		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
50 ml	352070		BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

3.1.3. Reagenzien und Chemikalien

Zellbiologische Arbeiten

Produkt	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
Aktivkohle	X865.2	p.a. Pulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antithrombin III (Kybernin P®)	13101.00.00	500 IE	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Dextran T 70	9228.1		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextransulfat-Natrium (Leuconostoc spp.)	D6924	100 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 96 %		vergällt mit Mercaptoethanol	Universitätsapotheke der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Ethanol 99,9 %	2246.1000		Th. Geyer GmbH, Renningen, Deutschland
Faktor Xa	SE-362-0100	2,34 µg/µl, 543 IU/ml	Enzo life Sciences Inc., Farmingdale, USA

3. Material und Methoden

Produkt	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	S0115		Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Gentamicin	PZN: 3928180	80mg/2ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Händedesinfektion	975512	Sterillium® classic pure	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Heparine und Heparinoide			
Dalteparin-Natrium (Fragmin P Forte®)	PZN: 01546244	25.000 IU/ml	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Danaparoid-Natrium (Orgaran®)	PZN: 88897	1250 IU/ml	Essex Pharma GmbH, München Deutschland
Enoxaparin-Natrium (Clexane®)	PZN: 7659558	10.000 IU/ml 40 mg/0,4 ml	Sanofi Deutschland GmbH, Frankfurt-Höchst, Deutschland
Heparin Natriumsalz ODSH	H3149	9000 IU/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
			Klinik für Transfusionsmedizin, Universität Greifswald
Reviparin-Natrium (Clivarin®)	PZN: 4074981	7000 IU/ml	Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Tinzaparin-Natrium (Innohep®)	PZN: 1581080	20.000 IU/ml	LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Hirudin	H7016-100U	from leeches, 100 IU	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Hormone		Molekulargewicht:	
17 β -Estradiol	E2758-250mg	272,4	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Progesteron	P8783-1g	314,5	
Kollagenase	CIV-22		Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Parthenolid	512732	50 mg	Calbiochem/ Merck KG, Darmstadt, Deutschland

Produkt	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
PD98059	9900	1,5 mg	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS, steril)	L1825	[-] Calcium, [-] Magnesium, niedriger Endotoxingehalt	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Rivaroxaban (Xarelto®)	S3002		Selleck Chemicals, Houston, USA
Thrombin	T4393	100IU	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TNF α	PHC3015		Invitrogen/ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypsin EDTA 1x	252000-56	0,25%	Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA

Biochemische Arbeiten

Produkt	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
TWEEN® 20	P1379		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS Trocken-substanz	L 182-50	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
ELISA			
Bovines Serumalbumin (BSA)	A7030	lyophilisiertes Pulver, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Schwefelsäure	17025	96%	Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	DY998		R&D Systems, Minneapolis, USA
Substrat Reagent Pack	DY999	Color Reagent A (Wasserstoffperoxid), Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Molekularbiologische Arbeiten

Produkt	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
RNA-Isolation Ethanol	9065.3	ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth,
Trichlormethan/ Chloroform	3313.2	ROTIPURAN® ≥99 %, p.a.	Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	1.136.100	chemsolute® , min 99.7%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Trifast	30-2020		PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
RT-Reaktion High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor	4374966	10x RT Random Primers, 10x RT Buffer, dNTP Mix (100 mM), RNase Inhibitor (2000 IU, 20 IU/μl), Multi-Scribe™ MuLV reverse transcriptase (50 IU/μl)	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
PCR SYBR® Green PCR Master Mix	4309155	SYBR Green 1 Farbstoff, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Referenz, Pufferkomponenten	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.4. Medien, Puffer und Lösungen

Zellbiologische Arbeiten

70 % Ethanol (zur Oberflächendesinfektion): für 5 Liter: 3,5 l 96 % Ethanol + 1,5 l A.dest

Kultivierungsmedien

Medium	Merkmale	Artikelnummer	Hersteller
DMEM/ F-12 (1X) Medium	[+] L-Glutamin, [+] 15mM HE- PES, ohne Phe- nolrot	11039047	Gibco/Life Technolo- gies, Carlsbad, USA

Angaben für eine Zellkulturflasche (75 cm ²)	
Zellkulturmedium	10 ml Medium + 1 ml dFCS ($\hat{=}$ 10 %) + 13,8 μ l Gentamicin ($\hat{=}$ 50 μ g/ml)
Stopplösung	8 ml PBS (steril) + 200 μ l dFCS + 10,3 μ l Gentamicin
Resuspensionslösung	5 ml PBS (steril) + 250 μ l dFCS + 6,6 μ l Gentamicin
Versuchsmedium	x ml Medium + 5 % dFCS + 50 μ g/ml Gentamicin

Verwendete Mengen an Medium:

- 10 ml je 75 cm² Zellkulturflasche
- 2 ml je well in einer 6-well-Platte
- 1 ml je well in einer 12-well-Platte
- 500 μ l je well in einer 24-well-Platte
- 250 μ l je well in einer 48-well-Platte
- 100 μ l je well in einer 96-well-Platte.

3. Material und Methoden

Stimuli

Bemerkung: Verdünnungen im Medium mit 5 % dFCS und 50 µg/ml Gentamicin

Stimulus	Konzentrationsangaben
Dextransulfat-Natrium	Stammkonzentration: 100 mg/ml Arbeitskonzentration: 5 µg/ml Verdünnung: 1:20.000
Faktor Xa	Stammkonzentration: 543 IU/ml Arbeitskonzentration: 0,5 IU/ml Verdünnung: 1:1.086
Heparine und Heparinoide	
Dalteparin-Natrium (Fragmin P forte®)	Stammkonzentration: 25.000 IU/ml Arbeitskonzentration: 0,18 IU/ml ($\hat{=}$ 5 µg/ml) Verdünnung: 1:31.250
Danaparoid-Natrium (Orgaran®)	Stammkonzentration: 1.250 IU/ml Arbeitskonzentration: 0,7 IU/ml ($\hat{=}$ 5 µg/ml) Verdünnung: 1:17.857
Enoxaparin-Natrium (Clexane®)	Stammkonzentration: 10.000 IU/ml Arbeitskonzentration: 0,55 IU/ml ($\hat{=}$ 5 µg/ml) Verdünnung: 1:18.182
Heparin Natriumsalz	Stammkonzentration: 9.000 IU/ml Arbeitskonzentration: 0,125 IU/ml ($\hat{=}$ 0,6125 µg/ml) (1:72.000) 0,25 IU/ml ($\hat{=}$ 1,25 µg/ml) (1:36.000) 0,5 IU/ml ($\hat{=}$ 2,5 µg/ml) (1:18.000) 1 IU/ml ($\hat{=}$ 5 µg/ml) (1:9.000) 2 IU/ml ($\hat{=}$ 10 µg/ml) (1:4.500) 4 IU/ml ($\hat{=}$ 20 µg/ml) (1:2.250) 8 IU/ml ($\hat{=}$ 40 µg/ml) (1:1.125)
ODSH	Stammkonzentration: 50.000 µg/ml Arbeitskonzentration: 5 µg/ml Verdünnung: 1:10.000
Reviparin-Natrium (Clivarin®)	Stammkonzentration: 7.000 IU/ml Arbeitskonzentration: 0,53 IU/ml ($\hat{=}$ 5 µg/ml) Verdünnung: 1:13.208
Tinzaparin-Natrium (Innohep®)	Stammkonzentration: 20.000 IU/ml

Stimulus	Konzentrationsangaben
	Arbeitskonzentration: 0,48 IU/ml ($\hat{=}$ 5 µg/ml) Verdünnung: 1:41.667
Hormone 17β-Estradiol	Stammkonzentration: 30 mM Arbeitslösung 30 µM Verdünnung: 1:1000
Progesteron	Stammkonzentration: 10 mM Arbeitslösung: 1 mM Zellkultur 1 µM Verdünnung: 1:1000
Rivaroxaban	Stammkonzentration: 5 mg/ml Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
Thrombin	Stammkonzentration: 100 IU/ml Arbeitskonzentration: 1 IU/ml Verdünnung: 1:100
TNF α	Stammkonzentration: 100 µg/ml Arbeitskonzentration: 50 ng/ml Verdünnung: 1:2.000

Inhibitoren

Bemerkung: Verdünnungen im Medium mit 5 % dFCS und 50 µg/ml Gentamicin

Inhibitor	Konzentrationsangaben
Antitrombin III (Kybernin P [®])	Stammkonzentration: 12,5 mg/ml Arbeitskonzentration: 0,25 mg/ml Verdünnung 1:50
Hirudin	Stammkonzentration: 500 IU/ml Arbeitskonzentration: 5 IU/ml Verdünnung 1:100
Parthenolid	Stammkonzentration: 400 mM Arbeitskonzentration: 20 µM Verdünnung 1:20.000
PD98059	Stammkonzentration: 50 mM Arbeitskonzentration: 50 µM Verdünnung 1:1.000

3. Material und Methoden

Biochemische Arbeiten

Reagenz	Angaben
PBS	9,55 g PBS Trockensubstanz + 1 l A.dest
ELISA	
ELISA Stopplösung	1 molare Schwefelsäure, 2 N 13,4 ml 96 % Schwefelsäure + 236,6 ml A.dest
Reagent Diluent (R&D Puffer)	1 % BSA in PBS (unsteril)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	1:200 in R&D Puffer
Substrat	Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 1:2
Waschpuffer ELISA	0,05% Tween in PBS 9 l : 85,95 g PBS Trockensubstanz + 4,5 ml Tween20 + 8,9955 l A.dest
IGFBP-1-Diluent	

Molekularbiologische Arbeiten

Methode	Angaben
RNA Isolation	
75 % Ethanol	75 ml 99,8 % Ethanol 25 ml A. dest.
PCR, Primer	
β -Aktin	
human CCL2/ MCP-1	Stammkonzentration: 250 μ M
human CCL5/ RANTES	Arbeitskonzentration: 6 μ M
human CXCL-1/ GRO α	3 μ l Stocklösung + 122 μ l A. dest.
human CXCL-5/ ENA-78	
human CXCL-8/ IL-8	

3.1.5. ELISA - Kits

Bemerkungen:

- alle verwendeten Fangantikörper (CA) sind polyklonale, anti-humane Antikörper gegen das nachzuweisende Chemokin von der Maus
- alle verwendeten Detektionsantikörper (DA) sind polyklonale, biotinylierte, anti-humane Antikörper gegen das nachzuweisende Chemokin von der Ziege

ELISA Kit	Artikelnummer	Beschreibung	Hersteller
Human CCL2/ MCP-1 DuoSet	DY279	CA: 180 µg/ml DA: 18 µg/ml Standard: re- kombinantes hu- manes MCP-1 (130 ng/ml)	R&D Systems, Min- neapolis, USA
Human CCL5/ RANTES Duo- Set	DY278	CA: 180 µg/ml DA: 3,6 µg/ml Standard: re- kombinantes hu- manes RANTES (120 ng/ml)	R&D Systems, Min- neapolis, USA
Human CXCL-1/ GRO α DuoSet	DY278	CA: 720 µg/ml DA: 7,2 µg/ml Standard: re- kombinantes hu- manes GRO α (90 ng/ml)	R&D Systems, Min- neapolis, USA
Human CXCL-5/ ENA-78 Duo- Set	DY254	CA: 360 µg/ml DA: 18 µg/ml Standard: re- kombinantes hu- manes ENA-78 (90 ng/ml)	R&D Systems, Min- neapolis, USA
Human CXCL-8/ IL-8 DuoSet	DY208	CA: 720 µg/ml DA: 3,6 µg/ml Standard: re- kombinantes hu- manes IL-8 (100 ng/ml)	R&D Systems, Min- neapolis, USA
Human CXCL-12/ SDF-1 α Duo- Set	DY 350	CA: 180 µg/ml DA: 72 µg/ml Standard: re- kombinantes hu- manes SDF-1 α (160 ng/ml)	R&D Systems, Min- neapolis, USA

3. Material und Methoden

ELISA Kit	Artikelnummer	Beschreibung	Hersteller
Human IGFBP-1 Duo-Set	DY871	CA: 720 µg/ml DA: 72 µg/ml Standard: rekombinantes humanes IGFBP-1 (115 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human Prolaktin DuoSet	DY682	CA: 144 µg/ml DA: 72 µg/ml Standard: rekombinantes humanes Prolaktin (95 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA

3.1.6. Primer

Bemerkungen:

- alle unten angegebenen Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express® Primer Design Software v2.0 der Firma Allpied Biosystems, USA erstellt
- die Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland synthetisierte die Primer

Primer	Vorwärts-/Rückwärtssequenz
human β -Aktin	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3' 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
human ENA-78	5'-TTCGCCATAGGCCACAG-3' 5'-CAAATTTCTTCCCCTTCTTCA-3'
human GRO- α	5'-CCCAAACCGAAGTCATAGCCA-3' 5'-GATGCAGGATTGAGGCAAGCT-3'
human IL-8	5'-TCTTGGCAGCCTTCTGATT-3' 5'-TTAGCACTCCTTGGCAAACCTG-3'
human MCP-1	5'-AAAGTCTCTGCCGCCCTTCT-3' 5'-GATTGCATCTGGCTGAGCG-3'
human RANTES	5'-CTCGCTGTCATCCTCATTGCT-3' 5'-TGTGGTGTCCGAGGAATATGG-3'
human SDF-1 α	5'-GATTGTAGCCCGGCTGAAGAA-3' 5'-AAGTCCTTTTTGGCTGTTGTGC-3'

3.1.7. Programme

Programm	Verwendung	Hersteller
7300 System Sequence Detection Software v1.4.0	Datenerhebung Real-Time-RT PCR	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
GraphPad Prism 5.01	Statistische Auswertung, Grafiken	GraphPad Software Ins., San Diego, USA
LaTeX	Textverarbeitung	
Microsoft Excel 2003 und 2007	Datenverarbeitung	Microsoft Co, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2003	Bildbearbeitung	Microsoft Co, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft Word 2003	Textverarbeitung	Microsoft Co, Unterschleißheim, Deutschland
OPTIMA Software v2.10	Datenerhebung ELISA	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland
Primer Express® Software Version 3.0	Primerdesign	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA

3.2. Methodik

3.2.1. Patientenauswahl und Probenmaterial

Die in den Experimenten verwendeten endometrialen Gewebeproben wurden aus Hysterektomiepräparaten gewonnen. Voraussetzungen zur Verwendung waren dabei nachgewiesene Fertilität und ein regelmäßiger Zyklus bei den Patientinnen, sowie Ausschluss von Malignität. Dies wurde durch pathologische Begutachtung bestätigt. Die Frauen, deren Gewebe verwendet wurde, galten als gesund. Alle Patientinnen wurden vor der Operation ausführlich über die Studienbedingungen und die Verwendung der Gewebeproben aufgeklärt und es wurde ihr schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Ethikkommission der Universität Greifswald hat dem Protokoll dieser Studie zugestimmt.

3.2.2. Steroid-Depletion von fetalem Kälberserum (FCS) mit Aktivkohle

Wie auch bei der Kultivierung vieler anderer Zellen, ist fetales Kälberserum in der Zellkultur endometrialer Stammzellen notwendig, um ihnen für ihr Wachstum benötigte Proteine und Wachstumsfaktoren zu liefern. Das verwendete FCS wurde dabei vor der Verwendung mittels Aktivkohle steroid-depletiert, um mögliche hormonelle Bestandteile zu entfernen.

Das FCS wurde dazu zuallererst mit Aktivkohle und Dextran T 70 vermischt. Zu 100 ml FCS wurden dabei je 5 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran hinzugegeben. Die Lösung wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 10 min lang bei 8.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und dann bei gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde jeweils dreimal zuerst durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm großen Poren und anschließend durch einen 0,22 µm-Filter gegeben. Das so depletierte FCS konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.2.3. Zellkultur

Die Arbeit mit den endometrialen Stromazellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Präparation endometrialer Stromazellen

Die Präparation der endometrialen Stromazellen (ESC) erfolgte wie in Artikeln von Fluhr et al. beschrieben (Fluhr et al., 2006, 2008). Die Hysterektomiepräparate wurden direkt nach der Operation den Pathologen übergeben, welche Endometrium entnahmen. Das entnommene Gewebe wurde dann in bei 4 °C gekühlte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit 50 µg/ml Gentamicin überführt und unverzüglich weiterverarbeitet.

In einer sterilen Petrischale wurde das Endometrium mit einem sterilen Skalpell vorsichtig von den Myometriumteilen abgeschabt und mittels des Skalpells gründlich mechanisch zerkleinert. Die Myometriumteile wurden verworfen. Mithilfe von 0,5 %iger Kollagenase wurde das Gewebe verdaut und dazu eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde das Gewebe alle 15 min mittels einer serologischen Pipette mehrfach auf- und abpipettiert, um die Zerkleinerung des Gewebes zu unterstützen. Die Inkubation wurde durch Unterbinden der Enzymaktivität der Kollagenase mit 5 ml ESC-Kulturmedium gestoppt.

Der gesamte Gewebeverdaulichkeit wurde danach durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm gegeben. Die Gewebeteile im Sieb wurden nach Spülen mit 10 ml PBS verworfen, der Durchfluss in einem Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 300 Umdrehungen pro Minute (rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes, wurde das Pellet in ESC-Kulturmedium gelöst und in Zellkulturflaschen (75 cm²) ausgesät.

Nach 45 minütiger Inkubation im CO₂-Inkubator erfolgte ein erster Mediumswechsel zur Reduktion der Verunreinigung durch Epithelzellen, Leukozyten und Erythrozyten, nach lichtmikroskopischer Sicherstellung der Adhärenz der Stromazellen.

Versorgung endometrialer Stromazellen

Mediumswechsel Bis zur Konfluenz wurden die ESC in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C kultiviert. Zur Gewährleistung einer idealen Nährstoffversorgung und um anfallende Stoffwechselprodukte zu entfernen, wurde das Nährmedium bis dahin alle 3-4 Tage gewechselt. Das verbrauchte Medium wurde abgeschüttet (aus Zellkulturflaschen) beziehungsweise mithilfe von einer Pipette vorsichtig entnommen (aus Zellkulturplatten). Daraufhin wurde wieder frisches Medium in Raumtemperatur, bestehend aus der benötigten Menge DMEM/F12 ohne Phenol-Rot mit 10% depletiertem FCS und 50 µg/ml Gentamicin, zugegeben.

Subkultivierung Nach Abschütten des verbrauchten Mediums und Spülung mittels PBS wurde Trypsin-EDTA zur Ablösung der ESC zu den Zellen gegeben. Dabei wurden 2 ml Trypsin-EDTA je 75 cm² Zellkulturflasche verwendet. Zum Abstoppen der Enzymaktivität wurden nach 10 min Inkubation im CO₂-Inkubator und lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellablösung 8 ml Stopplösung je Zellkulturflasche, bestehend aus 8 ml PBS mit 2,5% depletiertem FCS und 50 µg/ml Gentamicin, hinzugegeben. Die gesamte Lösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in der je nach Zellzahl benötigten Menge an ESC-Kulturmedium gelöst und in Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät. Dabei wurde folgende Zellzahl je Well in der Zellkulturplatte verwendet:

- 200.000 Zellen in je 2 ml Medium in der 6-well-Platte
- 100.000 Zellen in je 1 ml Medium in der 12-well-Platte
- 50.000 Zellen in je 500 µl Medium in der 24-well-Platte
- 25.000 Zellen in je 250 µl Medium in der 48-well-Platte
- 10.000 Zellen in je 100 µl Medium in der 96-well-Platte.

Versuche an endometrialen Stromazellen in Zellkultur

Nach der Aussaat der Zellen in Zellkulturplatten wurde zunächst Konfluenz abgewartet. Wenn nach der Dezidualisierung und Stimulation der Zellen nur PCRs durchgeführt werden sollten, wurden 96-well-Platten verwendet. Bei Planung von ELISAs wurde die Größe der Zellkulturplatte je nach benötigter Menge an Überständen ausgewählt. Zumeist kamen dabei 48-well-Platten zum Einsatz.

Dezidualisierung in vitro Nach erreichter Konfluenz wurden die endometrialen Stromazellen für neun Tage zur Dezidualisierung mit 17β -Estradiol und Progesteron stimuliert. Dabei wurde der erste Tag dieser Dezidualisierung in vitro als Tag 0 festgelegt. An den Tagen 3 und 6 erfolgte ein Mediumswechsel und am Tag 9 wurde die eigentliche Stimulation der Zellen durch Zugabe verschiedener Stimuli durchgeführt (siehe nächster Absatz). Für die Dezidualisierung wurde ESC-Kulturmedium bestehend aus DMEM/F-12 ohne Phenol-Rot mit 5% depletiertem FCS und $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Dazu kamen je $1 \mu\text{mol}/\text{l}$ Progesteron und $30 \text{ nmol}/\text{l}$ 17β -Estradiol. Zur Kontrolle wurden auch immer Zellen mitgeführt, deren Medium in gleicher Konzentration nur das Lösungsmittel der Hormone (96% Ethanol) beigegeben worden war, ohne tatsächlich Hormone zu enthalten. Dies ermöglichte die Reaktion von dezidualisierten (EP) und nicht dezidualisierten (KO) ESCs auf verschiedene Stimuli zu erfassen und diese miteinander zu vergleichen.

Um zu überprüfen, ob die Stimulation mit 17β -Estradiol und Progesteron tatsächlich zu einer Dezidualisierung geführt hatte, wurden beim Mediumswechsel an Tag 9 Überstände von mit Hormonen-stimulierten und von den zur Kontrolle mitgeführten Zellen abgenommen und mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Menge an von den ESC sezerniertem Prolaktin (PRL) und Insulin-like growth factor 1 (IGFBP-1) bestimmt. Die Dezidualisierung ist erfolgreich, wenn ein signifikanter Anstieg der Sekretion dieser Proteine nachweisbar ist (Fluhr et al., 2006), (Fluhr et al., 2011a).

Stimulation der Zellen mit verschiedenen Stimuli oder Inhibitoren Nach der neun Tage dauernden Dezidualisierung *in vitro* folgte eine Stimulierung mit verschiedenen Stimuli oder Inhibitoren. Diese wurden in Versuchsmedium bestehend aus DMEM/-F12 ohne Phenolrot, 5 % dFCS und 50 µg/ml zur jeweils notwendigen Konzentration verdünnt. Auch in diesem Medium befanden sich wieder Progesteron und 17β-Estradiol beziehungsweise in den zum Vergleich von dezidualisierten und nicht dezidualisierten Zellen mitgeführten Kontrollzellen das jeweilige Lösungsmittel. Die Zellen wurden 6 Stunden lang bei 37 °C mit den Stimuli oder Inhibitoren inkubiert bevor, wie unten beschrieben, Proben für ELISA und/oder real-time PCR gewonnen wurden. Als einzige Ausnahme wurde mit in Versuchsmedium verdünntem Parthenolid eine einstündige Vorinkubation durchgeführt, bevor die weiteren Reagenzien dazugegeben wurden und dann wiederum 6 Stunden auf die ESC wirken konnten. Die verwendeten Konzentrationen der Stimuli und Inhibitoren können dabei der Materialliste entnommen werden (Abschnitt 2.1.4.1 Zellbiologische Arbeiten; Stimuli und Inhibitoren; Arbeitskonzentration).

3.2.4. Probengewinnung bei endometrialen Stromazellen

Probengewinnung für ELISA

Für ELISA wurden Zellkulturüberstände verwendet. Dabei wurde nach der Stimulation der gesamte Zellkulturüberstand (250 µl bei 48-well-, 500 µl bei 24-well- und 1 ml bei 12-well-Platten) mittels einer Pipette aus dem jeweiligen Well der Zellkulturplatte abgezogen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Überstände bei -80 °C aufbewahrt.

Probengewinnung für RNA-Isolation

Zunächst wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und entweder, wie oben beschrieben, aufbewahrt oder, wenn sie nicht benötigt wurden, verworfen. Auf den Zellrasen wurden 250 µl TriFast™ (sowohl bei 96-well-, 48-well-, als auch 24-well-Platten)

gegeben. TriFast™ bewirkt eine Denaturierung und damit Inaktivierung von Proteinen und somit auch RNasen. Nach einer Einwirkzeit von etwa 5 min wurde die gesamte Lösung abgezogen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden vor der weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.5. RNA-Isolation

Alle für die RNA-Isolation verwendeten Reagenzien wurden auf 4 °C gekühlt verwendet. Nachdem das bei -80 °C in 250 µl TriFast™ eingefrorene Zellmaterial bei Raumtemperatur aufgetaut war, wurden in jedes Reaktionsgefäß 50 µl reines Chloroform gegeben. Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde gründlich mit Hilfe eines Vortex-Reagensglasmischers durchmischt und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation mit 12.000 rpm bei 4 °C. Nach der Zentrifugation hatten sich eine obere wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist, eine Interphase, darin befinden sich DNA und Proteine, und eine untere Phenol-Chloroform-Phase gebildet. Die oberste Phase wurde vorsichtig abgezogen, wobei Verunreinigung durch die Interphase vermieden werden musste, und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, während die anderen Phasen verworfen wurden. Nach Zugabe von 125 µl Isopropanol als Präzipitationsmittel wurden die Reaktionsgefäße gründlich gemischt und dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min mit 12.000 rpm und bei 4 °C. Danach wurde der Überstand abgeschüttelt und der Gefäßrand vorsichtig trocken getupft. Nun wurden 250 µl 75%iges Ethanol hinzugegeben und ohne vorheriges Mischen eine weitere Zentrifugation mit 8.000 rpm bei 4 °C für 6 min durchgeführt. Der dabei entstandene Ethanol-Überstand wurde dann mittels einer Pipette vorsichtig abgenommen und das im Reaktionsgefäß befindliche Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 42 µl bidestilliertem Wasser gelöst und für 15 min im auf 60 °C erwärmten Thermomixer bei minimaler Schüttelstärke inkubiert. Nach diesem letzten Inkubationsschritt wurden die Reaktionsgefäße mit der nun darin befindlichen RNA sofort auf Eis gestellt und konnten dann bei -80 °C gelagert werden.

3. Material und Methoden

Diese Methode erbringt relativ konstante Mengen an RNA. Somit wurde auf auf RNA-Konzentrationsbestimmungen und Mengenanpassungen verzichtet.

3.2.6. Reverse Transkription (RT)

Mit Hilfe der reversen Transkription konnte aus der in der RNA-Isolation gewonnenen RNA die für die real-time PCR benötigte komplementäre DNA (cDNA) gebildet werden. Dies geschieht mittels des Enzyms reverse Transkriptase. Dazu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit mit RNase Inhibitor von Applied Biosystems verwendet. Dies besteht aus RT Puffer, einer Mischung zufälliger Primer als Startmolekülen, Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP), einem RNase-Inhibitor, welcher die RNA vor Ribonukleasen schützt, und reverser Transkriptase (MultiScribe™). Die RNA-Proben wurden zunächst vorsichtig auf Eis aufgetaut. Auch alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Für jede Probe mussten 16 µl Master-Mix hergestellt werden, welcher sich folgendermaßen zusammensetzte: 9,2 µl bidestilliertes Wasser, 2 µl RT Puffer, 2 µl der im Kit enthaltenen Primer, 0,8 µl dNTPs und je 1 µl RNase-Inhibitor und reverse Transkriptase. 16 µl des Master-Mixes wurden jeweils in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und je 4 µl RNA-Probe hinzugefügt. Die RT-Reaktion wurde dann mithilfe des Thermocyclers und dem Programm RT ABI 2007 durchgeführt. Dabei wurden die Proben zunächst für 10 min auf 25 °C erwärmt, dann wurde die Temperatur für 120 min bei 37 °C gehalten, für 5 Sekunden auf 85 °C erhitzt und dann auf 4 °C herabgekühlt. Nach beendeter RT-Reaktion wurden zu jeder Probe 70 µl bidestilliertes Wasser hinzugegeben und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.7. Real-time quantitative PCR - Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe des quantitativen Verfahren der real-time PCR wurde im Anschluss an die reverse Transkription die dort gewonnene cDNA vervielfältigt und durch Fluoreszenzmessung deren jeweilige Menge bestimmt. β -Aktin wurde dabei als housekeeping-Gen

verwendet, um Schwankungen in der gewonnenen RNA-Menge bzw. cDNA-Menge zu erkennen und rechnerisch auszugleichen.

Es wird dabei das Verfahren der Polymerasekettenreaktion angewendet, welches 1984 durch K. Mullis entwickelt wurde (Deepak et al., 2007). Dieses besteht typischerweise aus drei sich mehrfach wiederholenden Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei 95 °C trennen sich die Stränge der Ausgangs-DNA (template), sie denaturiert. Anschließend wird die Temperatur gesenkt und die im Überschuss vorhandenen Primer lagern sich an die DNA-Stränge an. Während der Elongation verlängert anschließend eine Polymerase die Primer, dadurch wird die Ausgangs-DNA je Zyklus zumindest in der Theorie verdoppelt. Der durchschnittliche Multiplikationsfaktor liegt i.d.R. je Zyklus bei 1,6 bis 1,7. Bei der real-time quantitativen PCR erfolgt die Quantifizierung der DNA-Menge in Echtzeit durch Messung fluoreszierender Signale. Dafür wird ein fluoreszierender Farbstoff, verwendet, in diesem Fall SYBR® Green I. Dieser lagert sich an die entstehenden DNA-Stränge an. Die Menge des messbaren Farbstoffs steigt dabei proportional mit der Menge der entstehenden DNA. Problematisch ist, dass der Farbstoff nicht zwischen korrekten DNA-Produkten und Artefakten unterscheiden kann. Von besonderer Wichtigkeit ist deshalb die Kontrolle der für den jeweiligen Primer spezifischen Schmelzkurve, welche sich aus der von der Fragmentlänge abhängigen Schmelztemperatur ergibt. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe des sog. C_T -Werts (cycle threshold). Dies ist die Zykluszahl, zu dessen Zeitpunkt die Fluoreszenzintensität sich im exponentiellen Bereich befindet und dabei einen bestimmten Grenzwert (threshold) übersteigt. Durch Einbeziehung des C_T -Werts des housekeeping-Gens β -Aktin kann auf die amplifizierte DNA-Menge geschlossen werden (Mülhardt, 2013).

Die real-time PCR wurde mittels des SYBR® Green PCR Master Mix Kits von Applied Biosystems durchgeführt. Dazu wurden zunächst die cDNA-Proben und die jeweils benötigten Vorwärts- und Rückwärtsprimer bei Raumtemperatur aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Die benötigten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express® Primer Design Software v2.0 erstellt. Die Firma Invitrogen synthetisierte die Primer.

Für jede Probe wurden 7 μ l Master-Mix mit Primern bestehend aus je 5 μ l SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ l bidestilliertem Wasser und je 0,5 μ l Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer gegeben. Zu den 7 μ l Master-Mix pro Well in der PCR-Platte wurden 3 μ l der cDNA-Probe hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren

3. Material und Methoden

gut durchmischt. Nachdem die PCR-Platte mit einer Abdeckfolie verschlossen und kurz anpipettiert worden war, wurde die PCR-Reaktion durchgeführt. Das dafür verwendete Programm ABI PRISM 7000 Standard erhitzt die Proben zunächst für 2 min auf 50 °C , dann für 10 min auf 95 °C und dann insgesamt in 40 Zyklen für 15 Sekunden auf 95 °C und 1 min auf 60 °C .

3.2.8. ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Nachweisverfahren für Antigene, beispielsweise Proteine wie Antikörper oder Hormone. Es wurde ein Sandwich-ELISA-Verfahren verwendet. Dafür werden zwei verschiedene Antikörper benötigt, die beide an das nachzuweisende Molekül binden, allerdings an unterschiedlichen Stellen. Fangantikörper werden dabei zunächst auf eine Mikrotiterplatte gegeben, an der sie haften. Bei darauffolgender Zugabe der zu untersuchenden Probe, binden die darin enthaltenen, für die Antikörper spezifischen Moleküle an die Antikörper. Es werden dann Detektionsantikörper zugegeben, welche wiederum spezifisch an die Moleküle binden. Daraufhin zugegebenes Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase) bindet an den Detektionsantikörpern. Die Peroxidase ist ein Enzym, welches dann hinzugefügtes Substrat umwandeln kann. Dabei entsteht als Produkt ein Farbstoff, welcher quantitativ nachgewiesen werden kann. Die entstehende Menge an Farbstoff ist dabei proportional zur in der Probe enthaltenen, nachzuweisenden Substanz.

Die ELISAs wurden mithilfe des DuoSet ELISA Kits von R&D an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Teil dieses Kits sind die Fangantikörper (CA), Detektionsantikörper (DA) und ein Standard der jeweils nachzuweisenden Substanz.

Am ersten Tag wurde zunächst die Arbeitslösung der Fangantikörper vorbereitet. Zu phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde dabei der jeweilige CA in einer Verdünnung von 180 Teilen PBS zu 1 Teil CA gegeben. Anschließend wurden je Well 100 µl des Ansatzes auf die ELISA Mikroplatte gegeben und diese über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

An Tag 2 wurden alle Wells der Platte zunächst dreimal mithilfe einer automatischen ELISA-Waschmaschine mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden 200 µl Reagent Diluent

in jedes Well gegeben und die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Standardreihe und die Proben in die Wells pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde wieder ein Waschschrift durchgeführt und dann in jedes Well 100 µl Arbeitslösung der Detektionsantikörper gegeben. Diese wurde wie die Arbeitslösung der Fangantikörper hergestellt, die Verdünnung erfolgte allerdings mit Reagent Diluent und nicht mit PBS. Nach einer weiteren Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur und einem Waschschrift wurden je 100 µl von 1:200 in Reagent Diluent verdünntem Streptavidin-HRP auf die Mikroplatte gegeben. Es erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht, bevor die Platte wieder gewaschen wurde. Abschließend wurden je 100 µl Substrat, welches in einem Verhältnis von 1:2 aus Reagenz A und B hergestellt wurde, in die Wells gegeben. Nach einer letzten lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur für 10 bis 20 Minuten wurde die Farbreaktion mit je 50 µl ELISA-Stopplösung aus 1 molarer Schwefelsäure abgestoppt.

Die quantitative Farbmessung erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesers und der OPTIMA Software v2.10.

Zum Nachweis von IGFBP-1 wurden der Detektionsantikörper, der Standard und die Streptavidin-HRP mit IGFBP-1-Diluent anstatt von Reagent Diluent verdünnt.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die Durchführung der verschiedenen Experimentbedingungen erfolgte jeweils in Triplikaten bis Quintuplikaten mit Zellkulturen, die von drei bis fünf unterschiedlichen Patientinnen stammten. Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad PRISM Version 5 verwendet (GraphPad, San Diego, CA, USA). Die Signifikanz wurden mit one-way ANOVAs und multiplen Vergleichstests nach Dunnett und Bonferroni getestet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert zu- bzw. abzüglich der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). Zwei Werte werden als signifikant unterschiedlich gesehen, wenn $p < 0,05$ war.

4. Ergebnisse

In den durchgeführten Experimenten wurde jeweils der Effekt auf unstimulierte (Ko) und dezidualisierte (EP) endometriale Stromazellen (ESC) untersucht. Um eine Dezidualisierung *in vitro* zu erreichen, wurden die Zellen dazu je 9 Tage lang mit Progesteron und 17β -Estradiol stimuliert, bevor die weiterführenden Experimente durchgeführt wurden. Die unstimulierten Zellen wurden in dieser Zeit nur mit dem Lösungsmittel der Hormone behandelt. Der Erfolg der Dezidualisierung aller verwendeter Zellen wurde mittels Messung der bekannten Dezidualisierungsmarker Prolaktin und IGFBP-1 im ELISA kontrolliert. Nur bei ausreichendem Vorhandensein dieser Marker wurden die Zellen verwendet. Die unstimulierten Zellen wurden dabei jeweils als Referenzgruppe herangezogen.

4.1. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den TNF- α -Signalweg

In den folgenden Experimenten sollte der Effekt von TNF- α auf die Chemokinproduktion undifferenzierter und dezidualisierter endometrialer Stromazellen und der Einfluss von Heparinen auf diesen Effekt untersucht werden.

4.1.1. Heparin verändert den TNF- α -vermittelten Effekt auf die Chemokinsekretion durch ESC dosisabhängig

Zunächst sollte einerseits der Effekt durch Stimulierung mittels des proinflammatorischen TNF- α auf die Sekretion dreier bei Entzündungsreaktionen relevanter Che-

4. Ergebnisse

mokine und andererseits die dosisabhängige Wirkung von Heparin auf diesen Effekt untersucht werden. In der Arbeitsgruppe war zuvor bereits gezeigt worden, dass TNF- α die Sekretion der Chemokine GRO- α , IL-8 und RANTES steigert. Zudem war ermittelt worden, dass dazu eine TNF- α -Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ am besten geeignet ist, da dadurch eine eindeutige Steigerung der Zytokinproduktion erfolgt.

Für das Experiment wurden ESC in 48-well-Platten nach Dezidualisierung für 6 Stunden mit TNF- α alleine oder mit TNF- α zusammen mit aufsteigenden Konzentrationen UFH stimuliert. Zusätzlich wurde auch eine Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen UFH alleine und zusätzlich eine Kontrolle gänzlich unstimulierter Zellen (Ko - unbehandelt) und nach der Dezidualisierung nicht zusätzlich stimulierter Zellen (EP - unbehandelt) mitgeführt. Es wurden die Heparinkonzentrationen 0,6125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Nach der Stimulation wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA die darin enthaltenen Mengen an sezerniertem GRO- α , IL-8 und RANTES ermittelt.

Wie schon bekannt, konnte gezeigt werden, dass TNF- α die Sekretion des Chemokins GRO- α in dezidualisierten ESC im Vergleich mit der Basalsekretion durch unstimulierte ESC signifikant erhöht. Die Zugabe von Heparin verändert diesen Effekt unabhängig von der Konzentration nicht. Heparin alleine hat keine Wirkung auf die GRO- α -Sekretion, auch nicht in hohen Dosierungen (Abb. 4.1, siehe Seite 69).

Auch die Sekretion von IL-8 erhöht TNF- α signifikant im Vergleich zur basalen Sekretion. Hier zeigte sich allerdings eine andere Wirkung durch Heparin, als im Falle von GRO- α . UFH vermindert den durch TNF- α hervorgerufenen Effekt in allen angewandten Dosierungen, allerdings sinkt die Sekretion nicht auf das Niveau der basalen Sekretion ab. Ab 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ UFH stellt sich ein Plateau ein, wonach der Effekt nicht weiter vermindert wird. Auch hier zeigt Heparin alleine keine Auswirkung auf die IL-8-Produktion (Abb. 4.2, siehe Seite 70).

Im Falle des Chemokins RANTES ist ein umgekehrter Effekt zu erkennen. Die durch TNF- α gesteigerte Sekretion wird durch Heparin noch weiter erhöht. Auch hier geschieht dies bereits ab der kleinsten Dosierung, ab 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist dies signifikant. Ab 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stellt sich hier ebenso ein Plateau ein (Abb. 4.3, siehe Seite 71).

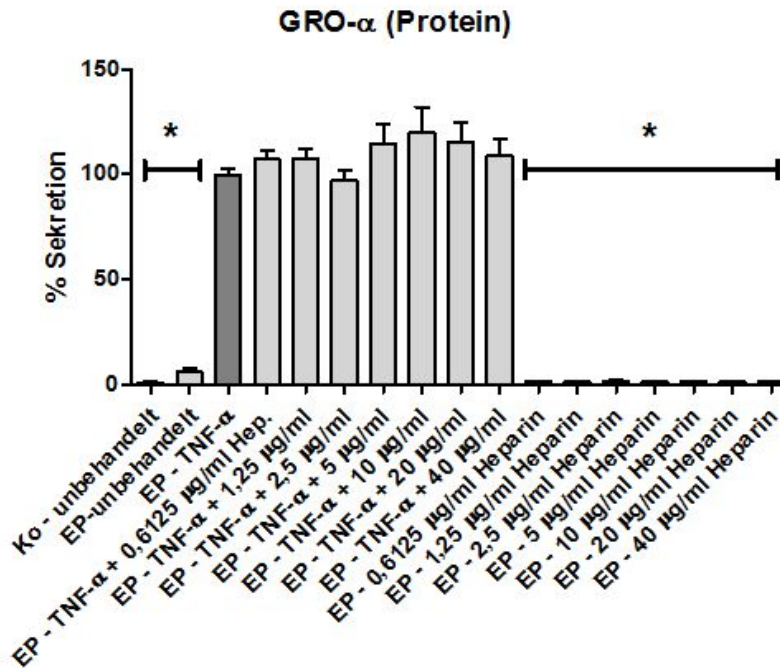


Abbildung 4.1.: **Produktion von GRO- α nach Stimulation mit TNF- α und Heparin in steigender Konzentration**

Differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α und aufsteigenden Konzentrationen unfraktioniertem Heparin bzw. einer Kombination aus beiden Stoffen inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen undifferenzierter (Ko) und differenzierter (EP) Zellen mitgeführt.

Messungen der GRO- α -Produktion auf Proteinebene zeigen, dass Heparin unabhängig von der Dosierung keinen Effekt auf die durch TNF- α hervorgerufene Steigerung der Sekretion ausübt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 5 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde.

$p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

4.1.2. Die Effekte durch TNF- α und möglicherweise auch Heparin werden über NF κ B vermittelt

Spratte et al. aus der Arbeitsgruppe hatten zuvor gezeigt, dass die von TNF- α hervorgerufenen Effekte auf ESC über NF κ B vermittelt werden. Dies geschieht einerseits dadurch, dass TNF- α die Menge des inhibierenden I κ B vermindert und andererseits durch verstärkte Phosphorylierung von NF κ B (Spratte et al., 2013). Wir untersuchten nun, ob die unter 4.2.1 gesehenen TNF- α - und Heparineffekte auch auf Expressionsebene nachweisbar sind und ob diese über NF κ B vermittelt werden. Dazu kam der NF κ -Inhibitor Parthenolid zum Einsatz.

Wir inkubierten undifferenzierte und dezidualisierte ESC für 6 Stunden mit 50 ng/ml

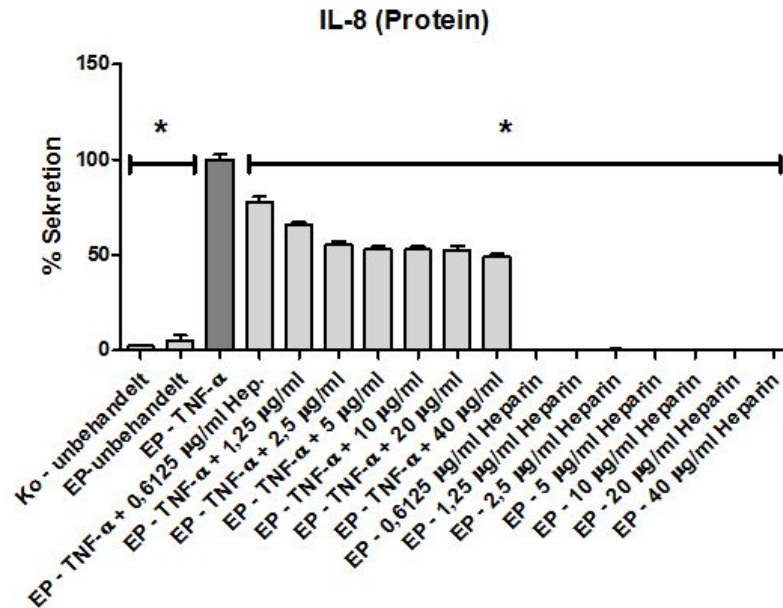


Abbildung 4.2.: **Produktion von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin in steigender Konzentration**

Differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α und aufsteigenden Konzentrationen unfraktioniertem Heparin bzw. einer Kombination aus beiden Stoffen inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen undifferenzierter (Ko) und differenzierter (EP) Zellen mitgeführt.

Messungen der IL-8-Produktion auf Proteinebene zeigen, dass Heparin dosisabhängig die durch TNF- α hervorgerufene Steigerung der Sekretion inhibiert.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

TNF- α , 1 IU/ml Heparin, 20 μ M Parthenolid oder Kombinationen dieser drei Stoffe. Mit Parthenolid erfolgte zuvor eine einstündige Vorinkubation.

GRO- α (Abb. 4.4, siehe Seite 72) Auf Expressionsebene zeigte sich ebenfalls, dass TNF- α die Produktion des Chemokins GRO- α erhöht im Vergleich zur basalen Expression. Dieser Effekt ist durch die Zugabe von Parthenolid komplett hemmbar. Die Zugabe von Heparin zu TNF- α verändert den TNF- α -Effekt auch auf mRNA-Ebene nicht. Die zusätzliche Inkubation von Parthenolid mit diesen beiden Stoffen führt wieder zu einer Absenkung der Expression des Chemokins. Diese Effekte sind sowohl bei undifferenzierten, als auch bei differenzierten ESC zu beobachten.

4.1. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den TNF- α -Signalweg

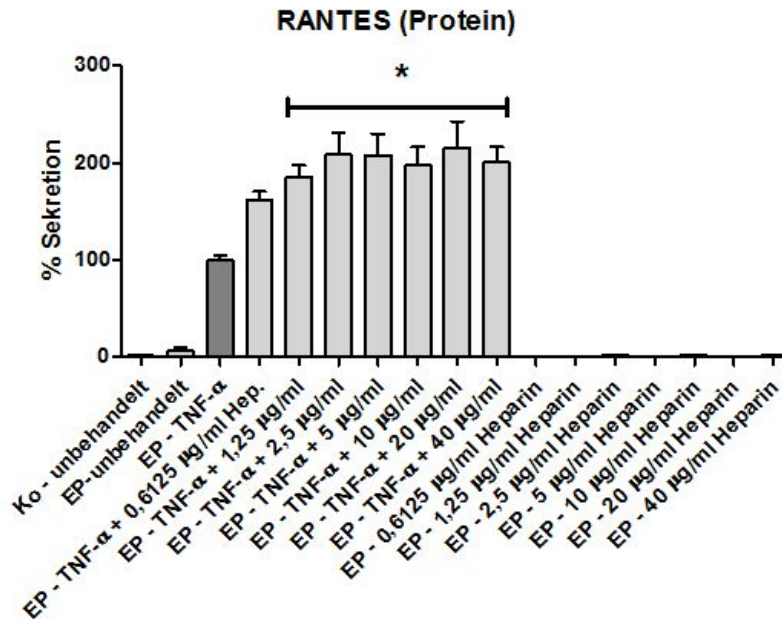


Abbildung 4.3.: **Produktion von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin in steigender Konzentration**

Differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α und aufsteigenden Konzentrationen unfraktioniertem Heparin bzw. einer Kombination aus beiden Stoffen inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen undifferenzierter (Ko) und differenzierter (EP) Zellen mitgeführt.

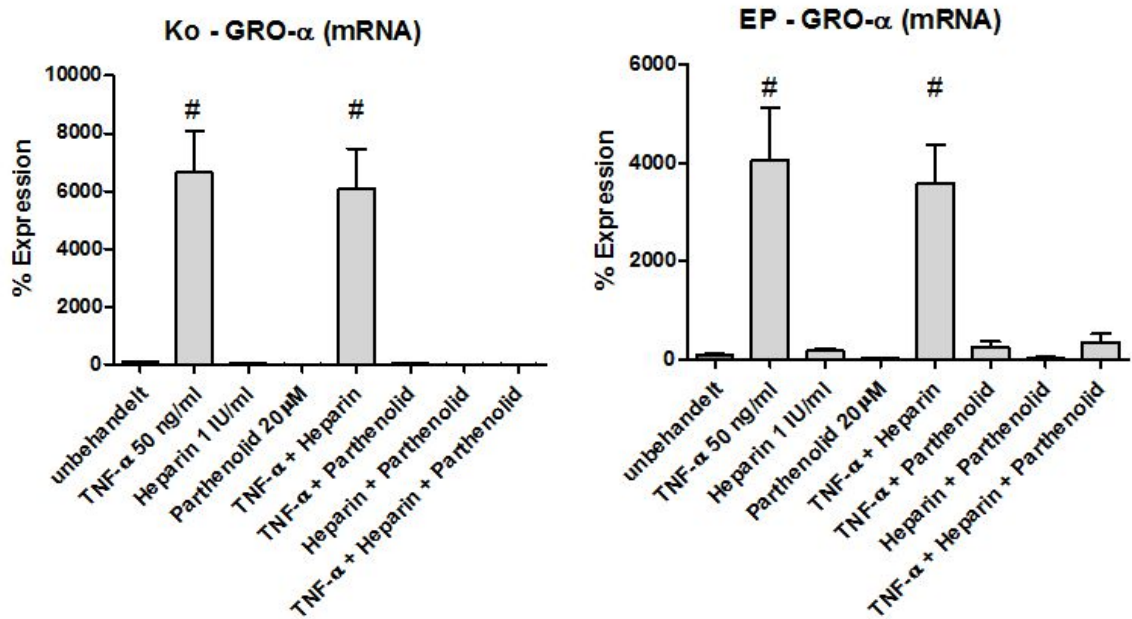
Messungen der RANTES-Produktion auf Proteinebene zeigen, dass Heparin dosisabhängig die durch TNF- α hervorgerufene Steigerung der Sekretion zusätzlich verstärkt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 5 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

IL-8 (Abb. 4.5, siehe Seite 73) Die auf Proteinebene gesehenen Effekte auf die IL-8 Produktion durch TNF- α und Heparin bestätigen sich auf Expressionsebene. TNF- α führt zu einer Erhöhung der IL-8-Expression im Vergleich zur basalen Expression, Heparin vermindert diese Wirkung signifikant. Auch hier zeigt sich der gleiche Effekt durch Parthenolid, wie bei der GRO- α -Expression: Parthenolid senkt sowohl in Kombination mit TNF- α alleine, als auch mit TNF- α und Heparin die IL-8-Expression auf das Niveau unbehandelter Zellen. Auch hier können diese Effekte bei undifferenzierten und dezidualisierten Zellen gezeigt werden.

RANTES (Abb.4.6, siehe Seite 74) Auf Expressionsebene steigert TNF- α wie schon auf Sekretionsebene gesehen die Produktion von RANTES. Heparin verstärkt diesen Effekt zusätzlich bei undifferenzierten und dezidualisierten Zellen. Auch hier

4. Ergebnisse



(a) GRO- α -Expression undifferenzierter Zellen (b) GRO- α -Expression dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.4.: Expression von GRO- α nach Stimulation mit TNF- α und Heparin und Zugabe von Parthenolid

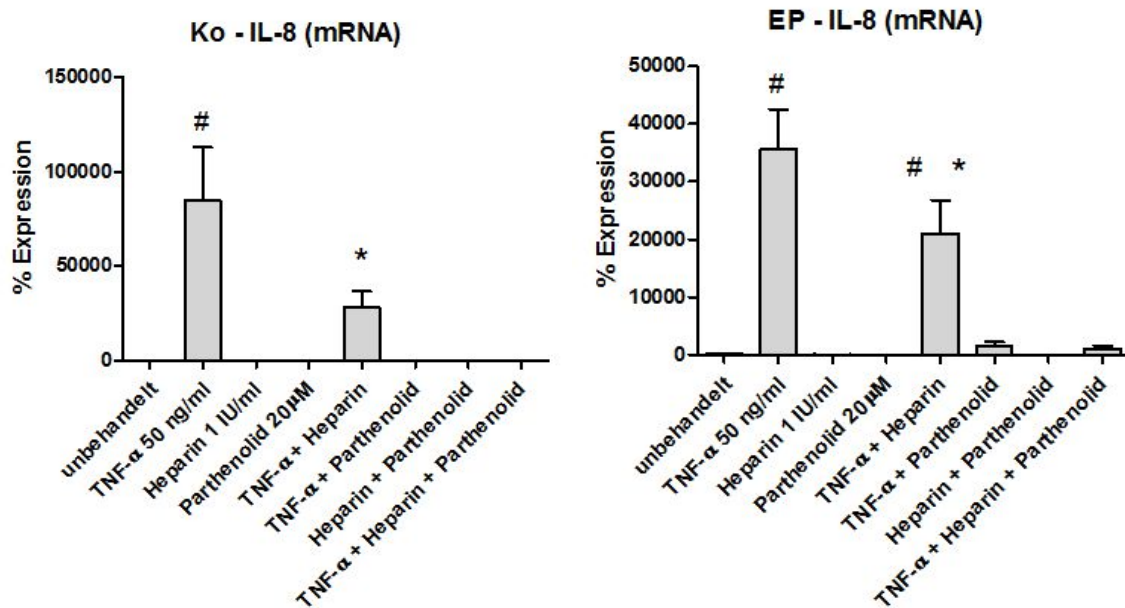
Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α und 1 IU/ml Heparin inkubiert. Die mit 20 μ M Parthenolid behandelten Zellen wurden zuvor 1 Stunde vorinkubiert. TNF- α steigert auch auf mRNA-Ebene die GRO- α -Produktion undifferenzierter und differenzierter ESC. Die Zugabe von Heparin verändert diese Produktion nicht. Parthenolid inhibiert den TNF- α -Effekt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 3 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. # $p < 0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

führt die Zugabe von Parthenolid zu einer vollständigen Hemmung der gesehenen Effekte.

4.1.3. Wirkung Heparin-ähnlicher Moleküle auf den TNF- α -Effekt

Um zu ermitteln welche Eigenschaften der Heparinmoleküle die gezeigten Effekte auslösen, untersuchten wir die Wirkung von Heparin-ähnlichen Molekülen auf die durch TNF- α hervorgerufene Wirkung auf die Chemokinsekretion von GRO- α , IL-8 und RANTES. Dazu wurden die undifferenzierten und differenzierten ESC zusätzlich mit je 5 μ g/ml Dextransulfat, Danaparoid und ODSH inkubiert, entweder alleine oder in

4.1. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den TNF- α -Signalweg



(a) IL-8-Expression undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Expression dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.5.: Expression von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin und Zugabe von Parthenolid

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α und 1 IU/ml Heparin inkubiert. Die mit 20 μ M Parthenolid behandelten Zellen wurden zuvor 1 Stunde vorinkubiert.

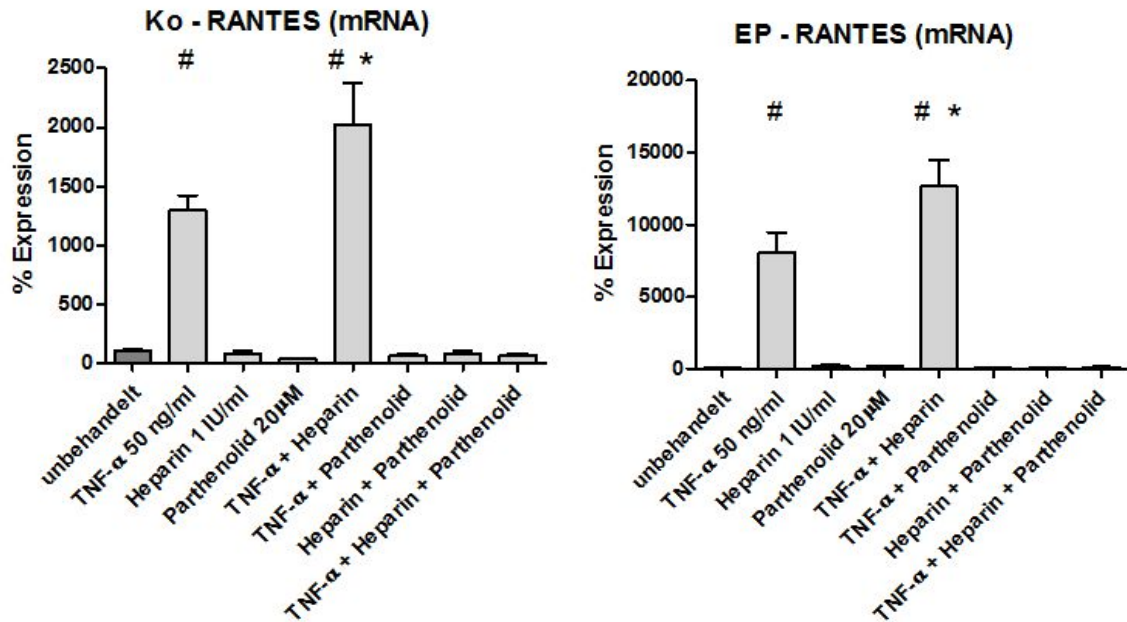
TNF- α steigert auch auf mRNA-Ebene die IL-8-Produktion undifferenzierter und differenzierter ESC. Die Zugabe von Heparin vermindert diese Produktion. Parthenolid inhibiert den von TNF- α alleine und in Kombination mit Heparin hervorgerufenen Effekt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. # $p < 0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

Kombination mit TNF- α . Dextransulfat ist ein stark sulfatiertes Polyanion und Polysaccharid mit einer ähnlichen Verteilung des Molekulargewichts wie Heparin, aber ohne antikoagulative Eigenschaften. Danaparoid zählt zu den Heparinoiden. Es weist anti-Faktor-Xa Aktivität auf und hat nur etwa halb so viele negative Ladungen wie Heparin oder Dextransulfat. ODSH ist ein Zucker mit gleicher Molekülgröße wie Heparin, aber ohne gerinnungshemmende Eigenschaften.

GRO- α (Abb. 4.7, siehe Seite 75) Bei undifferenzierten ESC zeigen die Heparin-ähnlichen Substanzen, wie auch Heparin, keinen Einfluss auf den TNF- α -Effekt. Ohne zusätzliche Inkubation mit dem Tumornekrosefaktor verändern sie die Basalsekretion des Chemokins GRO- α nicht. Die durch Heparin alleine erzeugte Sekretion war

4. Ergebnisse



(a) RANTES-Expression undifferenzierter Zellen (b) RANTES-Expression dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.6.: Expression von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin und Zugabe von Parthenolid

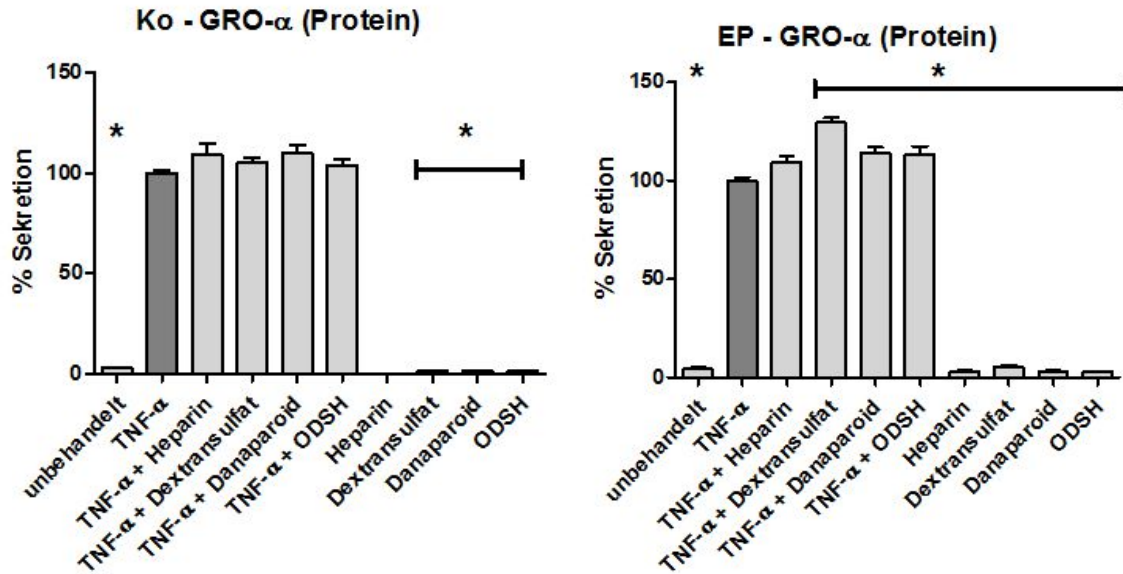
Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α und 1 IU/ml Heparin inkubiert. Die mit 20 μ M Parthenolid behandelten Zellen wurden zuvor 1 Stunde vorinkubiert. TNF- α steigert auch auf mRNA-Ebene die RANTES-Produktion undifferenzierter und differenzierter ESC. Die Zugabe von Heparin verstärkt diese Produktion bei undifferenzierten und dezidualisierten ESC. Parthenolid inhibiert den von TNF- α alleine und in Kombination mit Heparin hervorgerufenen Effekt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. # $p < 0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

so gering, dass sie nicht messbar war. Aus diesem Grund war es nicht möglich eine Signifikanz zur von TNF- α bewirkten Chemokinproduktion zu ermitteln.

Anders stellt es sich bei den dezidualisierten Zellen dar. Hier verursachen Dextran-sulfat, Danaparoid und auch ODSH alle eine zwar nur leichte, aber signifikante Verstärkung der Chemokinsekretion in Kombination mit TNF- α . Alleine haben auch sie keinen Effekt.

IL-8 (Abb. 4.8, siehe Seite 76) Auch bei der Sekretion des Zytokins IL-8 zeigen sich bei undifferenzierten und differenzierten endometrialen Stromazellen unterschiedliche Effekte. Heparin und sämtliche getestete Heparin-ähnliche Substanzen vermin-

4.1. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den TNF- α -Signalweg



(a) GRO- α -Produktion undifferenzierter Zellen (b) GRO- α -Produktion dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.7.: Produktion von GRO- α nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α , 1 IU/ml Heparin, 5 μ g/ml Dextransulfat, Danaparoid oder ODSH alleine und einer Kombination aus TNF- α mit einer der anderen Substanzen inkubiert.

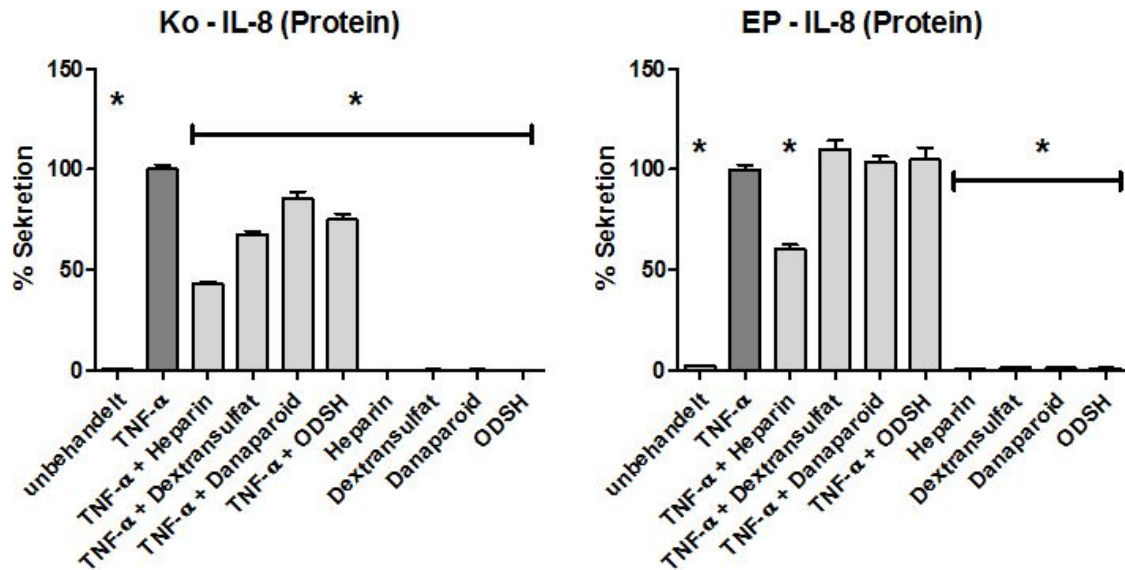
Bei undifferenzierten ESC verursacht weder die Zugabe von Heparin noch einer der anderen Substanzen zu TNF- α eine Veränderung der GRO- α -Produktion. Bei differenzierten Zellen verändert Heparin den TNF- α -Effekt nicht, Dextransulfat, Danaparoid und ODSH verstärken ihn leicht.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 (Ko) bzw. 5 (EP) verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

den bei ESC, welche zuvor nicht mit Hormonen stimuliert wurden, die durch TNF- α -vermittelte Steigerung der IL-8-Sekretion signifikant. Diese Wirkung wird am stärksten durch Heparin hervorgerufen, Danaparoid zeigt den schwächsten Effekt. Heparin, Dextransulfat, Danaparoid und ODSH erhöhen allesamt alleine nicht die Basalproduktion des Chemokins.

Wurden die ESC zuvor mit Hormonen behandelt und sind somit dezidualisiert, zeigt sich der schon bekannte Effekt, dass Heparin die von TNF- α -vermittelte Erhöhung der IL-8-Sekretion verringert. Hier zeigt die Zugabe der Heparin-ähnlichen Substanzen allerdings keine Veränderung der Chemokinsekretion hervorgerufen durch TNF- α . Alleine haben auch hier weder Heparin noch die anderen drei Stoffe Einfluss auf die Basalsekretion von IL-8.

4. Ergebnisse



(a) IL-8-Produktion undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Produktion dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.8.: Produktion von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α , 1 IU/ml Heparin, 5 μ g/ml Dextransulfat, Danaparoid oder ODSH alleine und einer Kombination aus TNF- α mit einer der anderen Substanzen inkubiert.

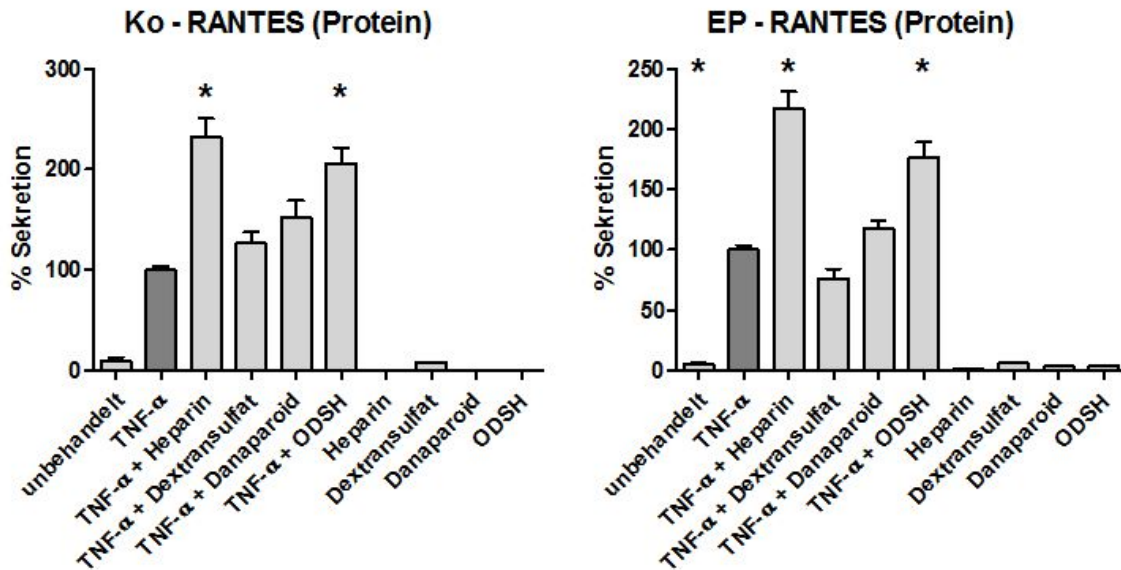
Bei undifferenzierten ESC verursachen alle 4 getesteten Substanzen eine Minderung der durch TNF- α bedingten IL-8-Produktion. Bei differenzierten Zellen zeigt nur UFH diesen Effekt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 (Ko) bzw. 5 (EP) verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

RANTES (Abb. 4.9, siehe Seite 77) Die Sekretion des Chemokins RANTES betreffend zeigen sich bei undifferenzierten und dezidualisierten ESC hier die gleichen Auswirkungen. Heparin verstärkt zusätzlich die TNF- α -vermittelte RANTES-Sekretion. Auch nach der zusätzlichen Inkubation mit ODSH ist dieser Effekt zu sehen. Danaparoid und Dextransulfat, zumindest bei undifferenzierten ESC, scheinen eine ähnliche Wirkung zu haben, signifikant ist dies allerdings nicht. Alleine haben auch hier weder Heparin noch die anderen drei Stoffe Einfluss auf die Basalsekretion von RANTES.

Anschließend untersuchten wir die bezüglich der Chemokinproduktion von IL-8 und RANTES gesehenen Effekte auch auf mRNA-Ebene mittels PCR. Dazu führten wir nochmals die gleichen Bedingungen wie zuvor herbei. Zusätzlich wurden die ESC auch

4.1. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den TNF- α -Signalweg



(a) RANTES-Produktion undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Produktion dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.9.: Produktion von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α , 1 IU/ml Heparin, 5 μ g/ml Dextransulfat, Danaparoid oder ODSH alleine und einer Kombination aus TNF- α mit einer der anderen Substanzen inkubiert.

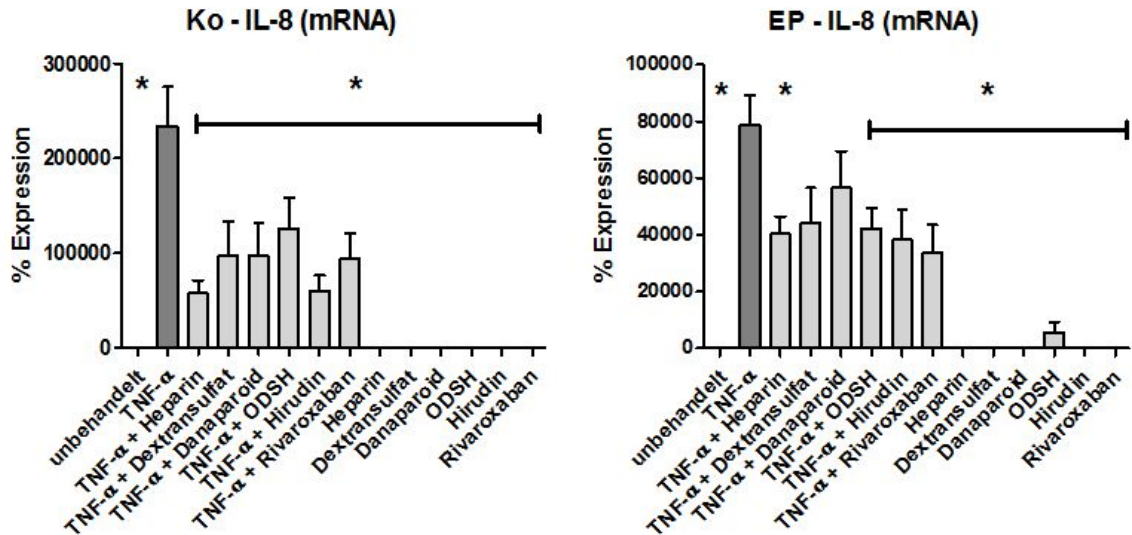
Sowohl bei undifferenzierten, als auch dezidualisierten ESC verstärken Heparin und ODSH die durch TNF- α -vermittelte RANTES-Sekretion signifikant.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 (Ko) bzw. 5 (EP) verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

noch mit Hirudin und Rivaroxaban alleine und in Kombination mit TNF- α inkubiert. Hirudin ist ein direkter Thrombinhemmer. Rivaroxaban vermittelt seine antikoagulative Wirkung über direkte Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa.

In Bezug auf die Produktion von IL-8 zeigen sich auch auf Expressionsebene die schon beschriebenen Effekte der Sekretionsebene. Heparin und die untersuchten Heparin-ähnlichen Substanzen verringern die TNF- α -vermittelte Chemokinexpression. Interessanterweise erzeugen auch Hirudin und Rivaroxaban in Kombination mit dem Tumornekrosefaktor diesen Effekt. Dies ist besonders bei den undifferenzierten ESC erkennbar, wo dieser Effekt stets signifikant ist. Bei den dezidualisierten Zellen war nach Zugabe von Dextransulfat und Danaparoid zu TNF- α keine Signifikanz erreicht, wobei sich auch hier eine Verminderung der Chemokinexpression andeutet. Heparin, ODSH,

4. Ergebnisse



(a) IL-8-Expression undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Expression dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.10.: Expression von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α , 1 IU/ml Heparin, 5 μ g/ml Dextransulfat, Danaparoid oder ODSH, 5 IU/ml Hirudin oder 100 ng/ml Rivaroxaban alleine und einer Kombination aus TNF- α mit einer der anderen Substanzen inkubiert.

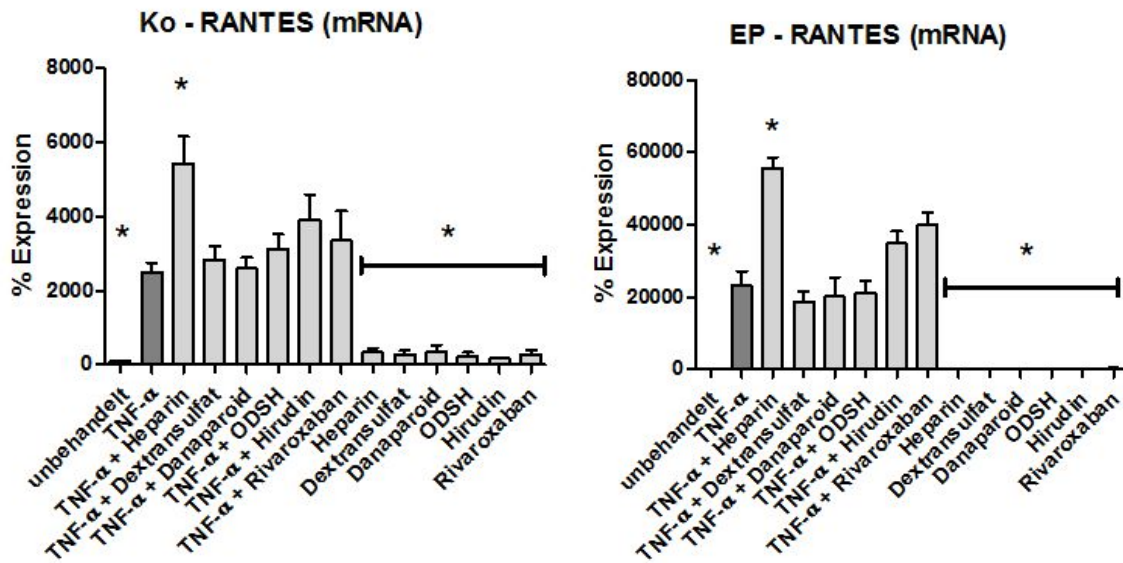
Sowohl bei undifferenzierten als auch dezidualisierten ESC vermindern alle verwendeten Substanzen die durch TNF- α vermittelte Erhöhung der IL-8-Expression. Mit zwei Ausnahmen (EP - Dextransulfat und Danaparoid) ist dies überall signifikant.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

Hirudin und Rivaroxaban verringern die Expression von IL-8 in Kombination mit TNF- α . Ohne TNF- α hatte auch hier keine der untersuchten Substanzen eine Auswirkung auf die basale Chemokinexpression (siehe Abbildung 4.10).

Heparin, Dextransulfat und Danaparoid zeigen die schon auf Proteinlevel beobachteten Effekte zusätzlich auf mRNA-Ebene. Die beiden letztgenannten haben auch hier keinen Einfluss auf die durch TNF- α vermittelte Expression von RANTES. Der im ELISA messbare Effekt von ODSH lässt sich hier allerdings weder bei undifferenzierten noch dezidualisierten ESC erkennen. Auch Hirudin und Rivaroxaban haben in Kombination mit TNF- α keinen signifikanten Einfluss auf die Chemokinexpression. Ohne den Tumornekrosefaktor beeinflusst keine der weiteren untersuchten Substanzen die Expression von RANTES im Vergleich zur basalen Expression (siehe Abbildung

4.11).



(a) RANTES-Expression undifferenzierter Zellen (b) RANTES-Expression dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.11.: **Expression von RANTES nach Stimulation mit TNF- α und Heparin oder Heparin-ähnlichen Substanzen**

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 50 ng/ml TNF- α , 1 IU/ml Heparin, 5 μ g/ml Dextransulfat, Danaparoid oder ODSH, 5 IU/ml Hirudin oder 100 ng/ml Rivaroxaban alleine und einer Kombination aus TNF- α mit einer der anderen Substanzen inkubiert.

Sowohl bei undifferenzierten als auch dezidualisierten ESC verstärkt nur UFH die durch TNF- α hervorgerufene Erhöhung der RANTES-Expression noch zusätzlich. Der auf Proteinebene gesehene Effekt durch ODSH ist hier nicht nachweisbar.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α .

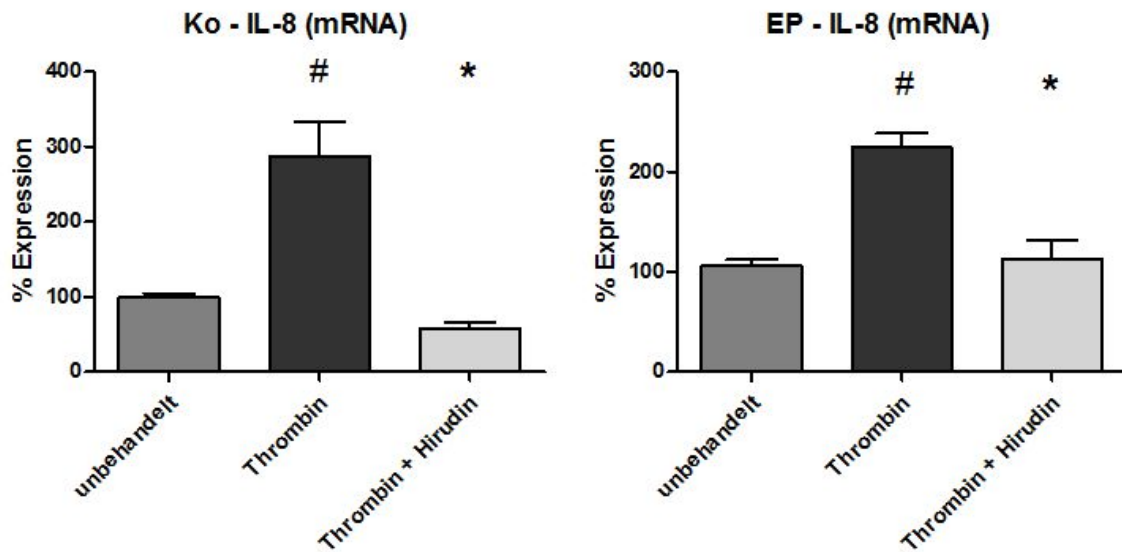
4.2. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den Thrombinsignalweg

In den folgenden Experimenten sollte der Effekt von Thrombin auf die Chemokinproduktion undifferenzierter und dezidualisierter endometrialer Stromazellen und der Einfluss von Heparinen auf diesen Effekt untersucht werden.

4.2.1. Hirudin hemmt die Thrombin-induzierte Hochregulation von IL-8

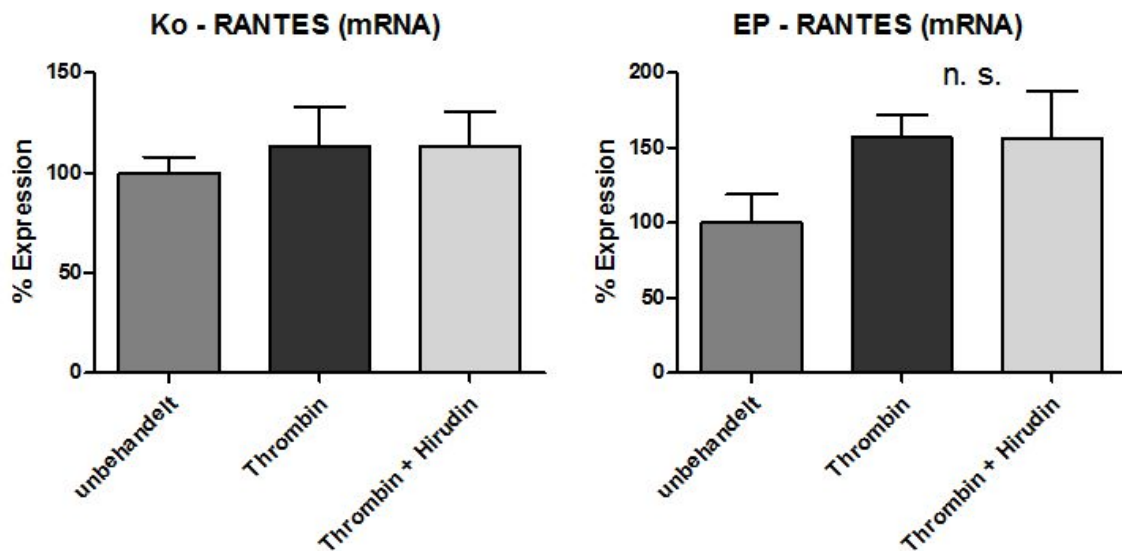
Zunächst wurden dazu ESC für 6 Stunden mit Thrombin alleine und in Kombination mit dem Thrombin-Inhibitor Hirudin inkubiert. Mittels Echtzeit-PCR wurde daraufhin die Expression der Chemokine IL-8 und RANTES untersucht. Thrombin führt, wie auch $\text{TNF-}\alpha$, im Vergleich zum unbehandelten Zustand zu einer vermehrten Expression des Chemokins IL-8 in den ESC. Dieser Effekt ist bei undifferenzierten und dezidualisierten Zellen zu beobachten und in beiden Fällen durch Hirudin hemmbar. Auf die Expression von RANTES hat Thrombin wiederum keinen signifikanten Effekt. Bei den mit Hormonen vorbehandelten Zellen ist zwar eine Steigerung der Chemokinexpression erkennbar, dieser Effekt ist allerdings nicht signifikant. Die zusätzliche Inkubation mit Hirudin verändert die Expression dabei nicht. (Siehe Abbildung 4.12, siehe Seite 81)

4.2. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den Thrombinsignalweg



(a) IL-8-Expression undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Expression dedifferenzierter Zellen



(c) RANTES-Expression undifferenzierter Zellen

(d) RANTES-Expression dedifferenzierter Zellen

Abbildung 4.12.: Expression von IL-8 und RANTES nach Stimulation mit Thrombin alleine und in Kombination mit Hirudin

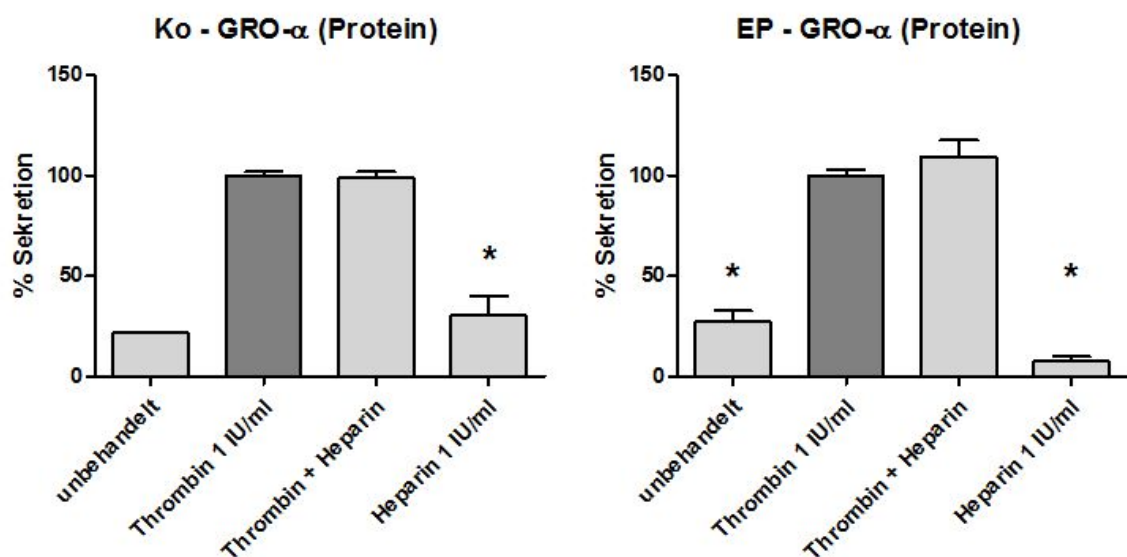
Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 1 IU/ml Thrombin alleine oder in Kombination mit 5 IU/ml Hirudin inkubiert.

Thrombin steigert auf Expressionsebene die IL-8-Produktion undifferenzierter und dedifferenzierter ESC. Hirudin inhibiert diesen Effekt. Bezüglich der RANTES-Expression führen weder Thrombin noch Thrombin plus Hirudin zu einem signifikanten Effekt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit Thrombin.

4.2.2. Der Einfluss von Heparin auf die Thrombin-vermittelte Veränderung der Chemokinsekretion

Folgend sollte der Einfluss von Thrombin auf die Sekretion weiterer für Entzündungsreaktionen relevanter Chemokine untersucht und zusätzlich der Einfluss von unfraktioniertem Heparin darauf beobachtet werden. Dazu wurde wieder die in den Überständen von dezidualisierten ESC und im Vergleich von undifferenzierten ESC vorhandenen Chemokinmengen mittels ELISA ermittelt, nachdem die Zellen für 6 Stunden inkubiert worden waren.



(a) GRO- α -Produktion undifferenzierter Zellen (b) GRO- α -Produktion dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.13.: Produktion von GRO- α nach Stimulation mit Thrombin und Heparin alleine und in Kombination

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 1 IU/ml Heparin oder 1 IU/ml Thrombin alleine oder in Kombination inkubiert.

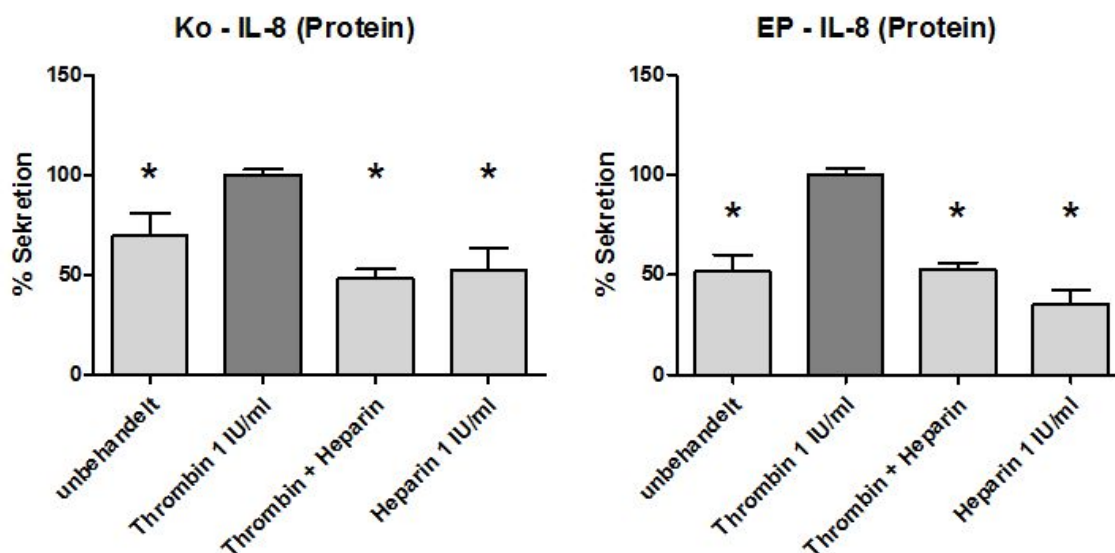
Thrombin verursacht eine Erhöhung der GRO- α -Sekretion durch undifferenzierte und dezidualisierte ESC. Die Zugabe von Heparin beeinflusst diesen Effekt nicht.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit Thrombin.

GRO- α (Abb. 4.13, siehe Seite 82) Werden undifferenzierte und dezidualisierte endometriale Stromazellen mit Thrombin stimuliert, führt dies im Vergleich mit der

4.2. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den Thrombinsignalweg

Basalsekretion dazu, dass die Zellen höhere Mengen GRO- α sezernieren. Die gleichzeitige Inkubation mit Thrombin und Heparin verändert diesen Effekt nicht. Heparin alleine führt zu keiner Änderung der Sekretion von GRO- α im Vergleich zum unbehandelten Zustand.



(a) IL-8-Produktion undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Produktion deduzierter Zellen

Abbildung 4.14.: Produktion von IL-8 nach Stimulation mit Thrombin und Heparin alleine und in Kombination

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 1 IU/ml Heparin oder 1 IU/ml Thrombin alleine oder in Kombination inkubiert.

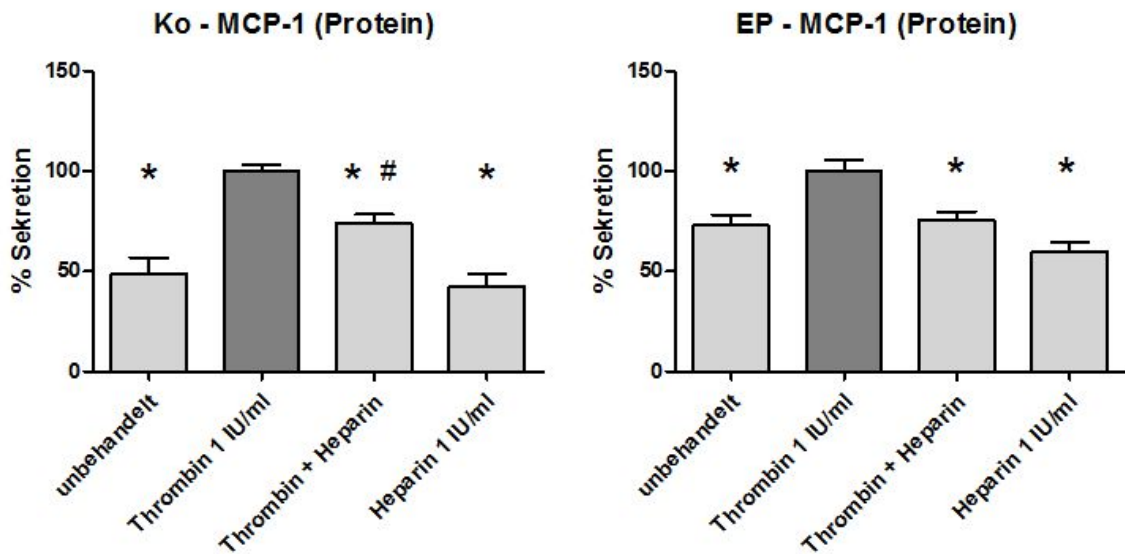
Thrombin verursacht auch auf Sekretionsebene eine Erhöhung der IL-8-Produktion. Dieser Effekt wird bei undifferenzierten und deduzierten ESC durch Heparin gehemmt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit Thrombin.

IL-8 (Abb. 4.14, siehe Seite 83) Die im vorherigen Experimente gesehene Steigerung der IL-8-Produktion auf Expressionsebene vermittelt durch Thrombin bestätigt sich auch in Bezug auf die Proteinsekretion. Dies gilt sowohl für undifferenzierte, als auch deduzierte ESC. Hier zeigt die zusätzliche Inkubation mit Heparin nun allerdings Wirkung: Heparin senkt die durch Thrombin hervorgerufene IL-8-Sekretion auf das Niveau unbehandelter Zellen ab. Heparin alleine, hat wie zuvor schon beschrieben, keinen Effekt auf die Chemokinproduktion.

4. Ergebnisse

MCP-1 (Abb. 4.15, siehe Seite 84) Zusätzlich untersuchten wir die Wirkung auf die Sekretion eines weiteren relevanten Chemokins: MCP-1. Die Stimulation mit Thrombin führt, wie bei der IL-8-Sekretion beobachtet, dazu, dass undifferenzierte und dezidualisierte ESC größere Mengen an MCP-1 sezernieren. Die gleichzeitige Inkubation mit Thrombin und Heparin führt dazu, dass dieser Effekt signifikant vermindert wird. Auch im Falle von MCP-1 ruft die alleinige Zugabe von Heparin keine Veränderung der Chemokinsekretion im Vergleich mit unbehandelten Zellen hervor.



(a) MCP-1-Produktion undifferenzierter Zellen (b) MCP-1-Produktion dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.15.: Produktion von MCP-1 nach Stimulation mit Thrombin und Heparin alleine und in Kombination

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 1 IU/ml Heparin oder 1 IU/ml Thrombin alleine oder in Kombination inkubiert.

Thrombin verursacht auch auf Sekretionsebene eine Erhöhung der IL-8-Produktion. Dieser Effekt wird bei undifferenzierten und dezidualisierten ESC durch Heparin gehemmt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit Thrombin. # $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit „unbehandelt“.

RANTES, Ena-78 und SDF-1 α Es wurden des weiteren Experimente die Chemokinsekretion von RANTES, Ena-78 und SDF-1 α betreffend durchgeführt. Die Mengen dieser in die Überstände sezernierten Chemokine waren allerdings zumeist so gering, dass sie mit den von uns verwendeten Methoden nicht messbar waren.

4.2.3. Heparin und LMWHs hemmen die Thrombin-induzierte Hochregulation von IL-8 und MCP-1 auf mRNA- und Proteinebene

Zum Abschluss sollte untersucht werden, ob die Molekülgröße von Heparin seine Wirkung auf die durch Thrombin vermittelten Effekte beeinflusst. Exemplarisch wurde hierzu die Beobachtung der Chemokinexpression und -sekretion von IL-8 und MCP-1 ausgewählt, da bei den vorangegangenen Untersuchungen hier die stärksten Beeinflussungen erkennbar waren. Dazu wurden die ESC mit UFH, Tinzaparin, Dalteparin, Enoxaparin und Reviparin alleine und in Kombination mit Thrombin inkubiert. Die vier letztgenannten sind niedermolekulare Heparine (LMWH). Bei diesem Experiment wurden sie ihrer Molekülgröße nach absteigend verwendet (Tinzaparin 6,5 kDa, Dalteparin 6 kDa, Enoxaparin 4,5 kDa und Reviparin 4,4 kDa) .

Um zu testen, ob die Effekte von Thrombin auf ESC über den MAPK-Signalweg vermittelt werden, erfolgte bei der Untersuchung auf Sekretionsebene zusätzlich die Inkubation mit dem MAPK-Inhibitor PD98059.

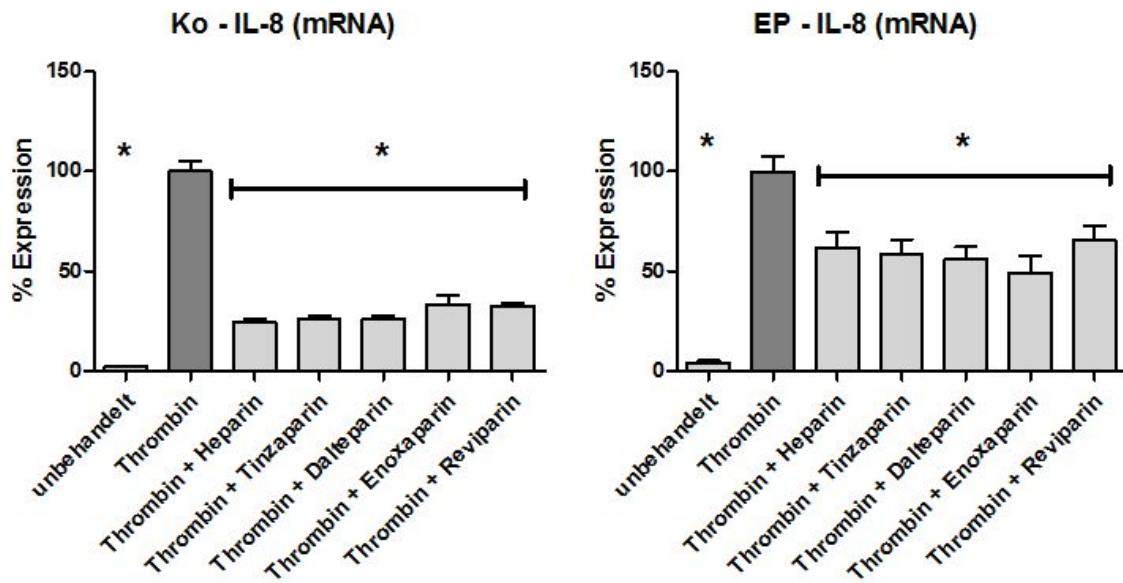
IL-8 (Abb. 4.16, siehe Seite 87) Die durch Thrombin vermittelte Steigerung der IL-8-Sekretion wird nicht nur durch UFH inhibiert. Sämtliche untersuchte LMWHs erzeugen die gleiche hemmende Wirkung auf den Thrombineffekt. Die Molekülgröße scheint dabei keine große Rolle zu spielen, auch wenn es so aussieht, als würde mit abnehmender Größe des Heparins der Inhibitionseffekt ein klein wenig geringer ausfallen. Diese Effekte lassen sich auch auf mRNA-Ebene mittels PCR nachweisen. UFH und LMWHs hemmen die durch Thrombin hervorgerufene vermehrte Chemokinproduktion signifikant. Anders als auf Proteinebene erfolgt diese Hemmung auf Expressionsebene allerdings nicht bis auf das Niveau un behandelter ESC.

Bei Inkubation mit Thrombin und PD98059 gleichzeitig ist keine Erhöhung der IL-8-Sekretion mehr nachweisbar, weder bei undifferenzierten, noch bei dezidualisierten Zellen.

MCP-1 (Abb. 4.17, siehe Seite 88) Vergleichbare Effekte, wie bei der IL-8-Produktion gesehen, sind auch in Bezug auf die MCP-1-Produktion nachweisbar. Neben UFH inhibieren auch alle 4 untersuchten LMWHs die durch Thrombin hervorgerufene Steigerung der Sekretion von MCP-1 durch undifferenzierte und dezidualisierte endometriale Stromazellen. Die Molekülgröße der Heparine scheint hier aber keine besondere Rolle zu spielen, da diese Inhibition nicht abhängig vom Molekulargewicht stärker oder schwächer ausfällt. Bei der Zugabe von Dalteparin zu Thrombin zu dezidualisierten ESC ist zwar eine Verminderung der Zytokinsekretion erkennbar, diese ist allerdings nicht signifikant. Die Expression von MCP-1 betreffend zeigen sich ähnliche Effekte. Undifferenzierte ESC exprimieren nach Inkubation mit Thrombin in Kombination mit UFH oder einem der LMWHs signifikant geringere Mengen des Chemokins, als wenn sie alleine mit Thrombin behandelt werden. Der Effekt durch LMWHs scheint dabei noch stärker zu sein, als durch UFH. Dies ist aber auf Proteinniveau nicht zu beobachten. Bei dezidualisierten Zellen rufen nur Dalteparin, Enoxaparin und Reviparin eine signifikante Minderung des Thrombineffekts hervor. Heparin und Tinzaparin scheinen die MCP-1-Expression auch zu vermindern, allerdings nicht ausreichend, um Signifikanz zu erreichen.

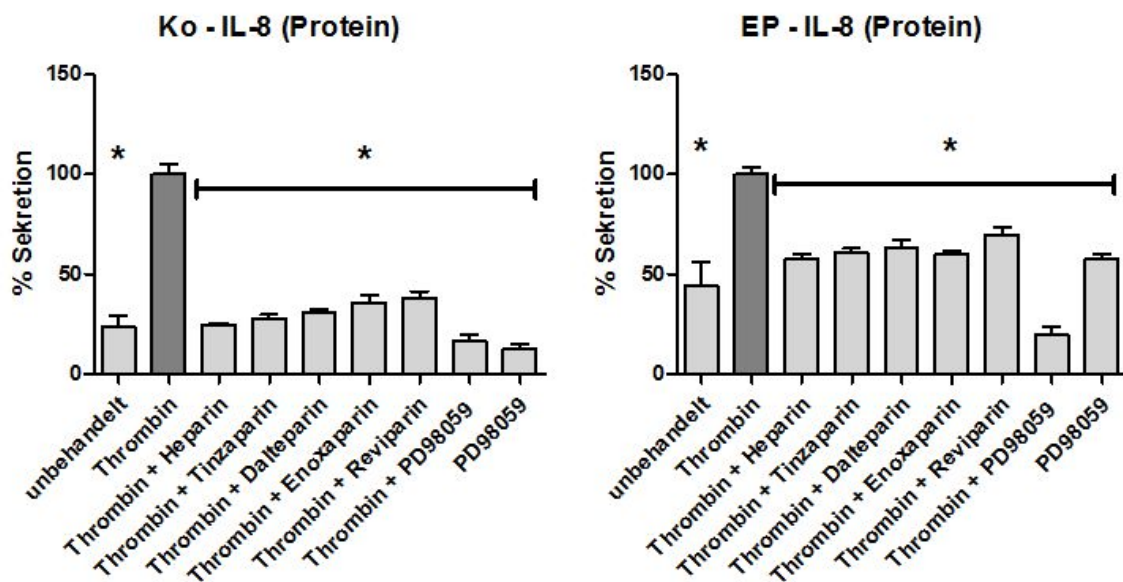
Wie auch bei der Sekretion von IL-8 ist die Thrombin-vermittelte Erhöhung der MCP-1-Sekretion durch die Zugabe von PD98059 inhibierbar. Der Inhibitor alleine verändert die Chemokinproduktion nicht.

4.2. Einfluss von Heparin und verwandten Molekülen auf den Thrombinsignalweg



(a) IL-8-Expression undifferenzierter Zellen

(b) IL-8-Expression dezidualisierter Zellen



(c) IL-8-Sekretion undifferenzierter Zellen

(d) IL-8-Sekretion dezidualisierter Zellen

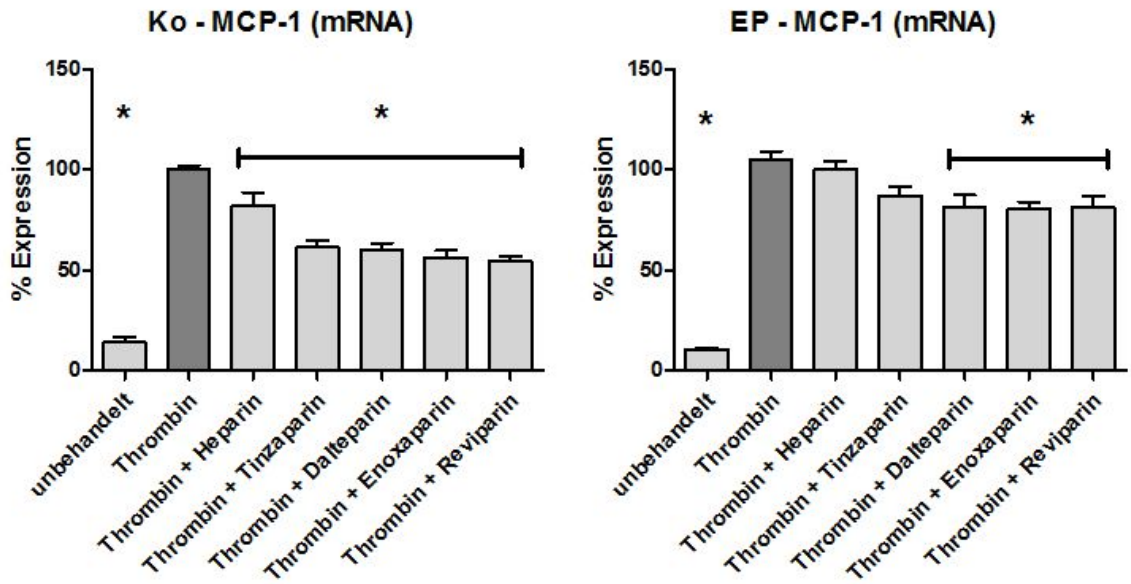
Abbildung 4.16.: Expression und Sekretion von IL-8 nach Stimulation mit Thrombin alleine und in Kombination mit LMWHs

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 1 IU/ml Thrombin alleine oder in Kombination mit 5 µg/ml Heparin, Tinzaparin, Dalteparin, Enoxaparin oder Reviparin inkubiert. Für die Messung der Sekretion erfolgte zusätzlich eine Inkubation mit 50 µmol PD98059.

Neben UFH inhibieren auch die untersuchten LMWHs die durch Thrombin vermittelte gesteigerte IL-8-Produktion auf Protein- und mRNA-Ebene. PD98059 hemmt den Thrombin-Effekt komplett.

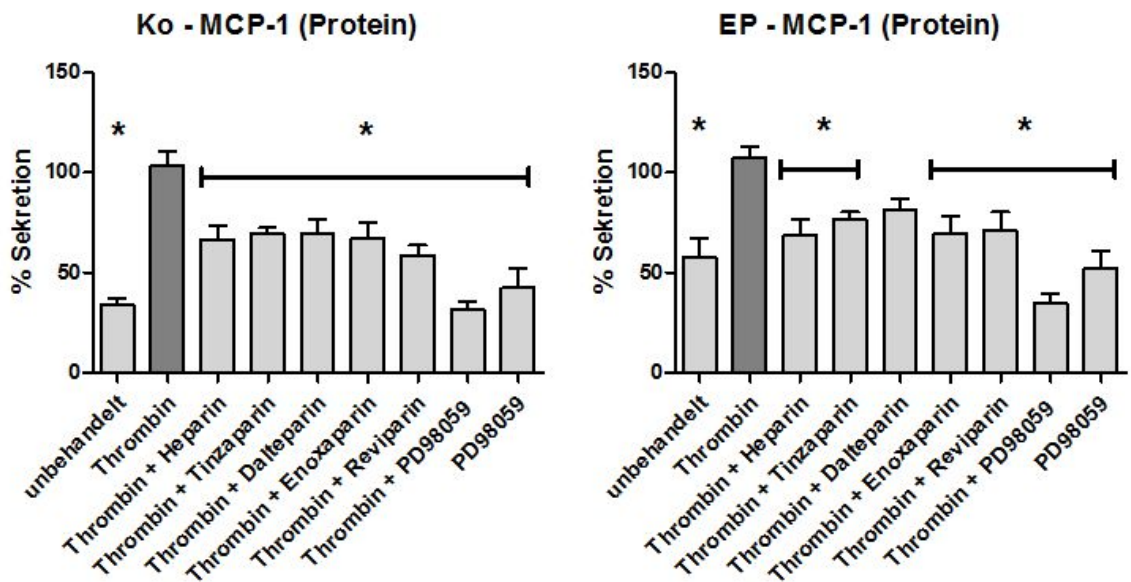
Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert von 4 (Sekretion) bzw. 3 (Expression) verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * p < 0,05 im Vergleich zur Inkubation mit Thrombin.

4. Ergebnisse



(a) MCP-1-Expression undifferenzierter Zellen

(b) MCP-1-Expression dezidualisierter Zellen



(c) MCP-1-Sekretion undifferenzierter Zellen

(d) MCP-1-Sekretion dezidualisierter Zellen

Abbildung 4.17.: Expression und Sekretion von MCP-1 nach Stimulation mit Thrombin alleine und in Kombination mit LMWHs

Undifferenzierte und differenzierte ESC wurden über 6 Stunden mit 1 IU/ml Thrombin alleine oder in Kombination mit 5 µg/ml Heparin, Tinzaparin, Dalteparin, Enoxaparin oder Reviparin inkubiert. Für die Messung der Sekretion erfolgte zusätzlich eine Inkubation mit 50 µmol PD98059.

Neben UFH inhibieren auch die untersuchten LMWHs die durch Thrombin vermittelte gesteigerte IL-8-Produktion auf Protein- und mRNA-Ebene, dies ist bei den dezidualisierten ESC allerdings nicht überall signifikant. PD98059 hemmt den Thrombin-Effekt komplett.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von 4 (Sekretion) bzw. 3 (Expression) verschiedenen Zellkulturen, wobei jede Behandlung als Quadruplikat durchgeführt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inkubation mit Thrombin.

5. Diskussion

In diesem Kapitel werden die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Ergebnisse diskutiert. Dabei wird zunächst auf die Modulation der durch TNF- α hervorgerufenen Effekte durch Heparin eingegangen, anschließend auf die Modulation der Thrombin-effekte. Folgend werden mögliche *in vivo* Einflüsse besprochen und abschließend mit den Limitationen der hier vorgestellten Arbeit und der klinischen Relevanz geendet.

5.1. Heparine modulieren TNF- α -Effekte

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α auf endometriale Stromazellen und wie Heparine diese Wirkung beeinflussen können. TNF- α zählt zu den T_H1-Zytokinen und wird im Endometrium, wie auch an der feto-maternalen Grenzfläche, vornehmlich durch deziduale NK-Zellen produziert. ESC, Makrophagen und Epithelzellen der endometrialen Drüsen können dieses Zytokin allerdings auch bilden (Hunt et al., 1992; Vince et al., 1992). Ihm werden dabei im Endometrium und während der Schwangerschaft förderliche und schädliche Effekte zugeschrieben (Haider und Knöfler, 2009). Einerseits ist das Vorhandensein einer gewissen Menge an TNF- α im Endometrium und eine damit einhergehende Beeinflussung des Immunmilieus und dadurch entstehende Entzündungsreaktion förderlich für die Implantation (Gnainsky et al., 2010), andererseits wird ihm, wenn es in zu hohen Konzentrationen vorhanden ist, eine Abort-fördernde Rolle zugeschrieben (Vitoratos et al., 2006) und es ist beteiligt an Schwangerschaftskomplikationen, wie habituellen Aborten, Frühgeburtslichkeit und Präeklampsie (Arslan et al., 2004; Christiaens et al.,

5. Diskussion

2008; Cackovic et al., 2008). Zudem ist bekannt, dass bei Frauen mit habituellen Aborten das Verhältnis zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen in Richtung Ersterer verschoben ist (Raghupathy et al., 1999). Wenn Heparin in der Lage ist den Signalweg von $TNF-\alpha$ zu beeinflussen, könnte dies für die betroffenen Patientinnen auch positive Auswirkungen auf das Ungleichgewicht zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen haben und somit einen fördernden Einfluss bei der Therapie habitueller Aborte haben.

In unserer Arbeitsgruppe war bereits zuvor der Einfluss des proinflammatorischen $TNF-\alpha$ auf die Chemokinproduktion von endometrialen Stromazellen untersucht worden und zusätzlich waren Experimente erfolgt, um den Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die $TNF-\alpha$ -vermittelten Effekte zu ermitteln. Die Ergebnisse, dass $TNF-\alpha$ u.a. die Sekretion von $GRO-\alpha$, IL-8 und RANTES im Vergleich zur basalen Sekretion durch ESC steigert (Spratte et al., 2013, 2015a,b), decken sich dabei mit den Erkenntnissen aus anderen Studien (Oral et al., 1996; Kayisli et al., 2002; Arici et al., 1993; Arima et al., 2000). Im Falle von RANTES waren andere Arbeitsgruppen anders als in den von uns durchgeführten Experimenten nicht in der Lage gewesen eine basale Sekretion des Chemokins durch ESC nachzuweisen (Hornung et al., 2001). In unserer Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass die Zugabe von UFH auf die Sekretion dieser drei Chemokine jeweils unterschiedlichen Einfluss hat. Die gesteigerte $GRO-\alpha$ -Sekretion wird nicht weiter beeinflusst, die IL-8-Sekretion gemindert und die Sekretion von RANTES noch weiter verstärkt.

Zur Untersuchung, ob die Beeinflussung dieser Effekte durch Heparin dosisabhängig erfolgt, führten wir eine Heparintitration durch. Im Falle von $GRO-\alpha$ führte keine der verwendeten Dosierungen, auch nicht die supratherapeutischen, zu einer Beeinflussung des $TNF-\alpha$ -Effekts durch Heparin. Hier ist somit keine Dosisabhängigkeit gegeben. Die im Fall von IL-8 Sekretions-inhibierenden und bei RANTES Sekretions-steigernden Effekte durch Heparin waren allerdings dosisabhängig. Ein Plateau stellte sich dabei ab $5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $2,5 \mu\text{g/ml}$ ein und blieb auch bei höheren Dosen konstant. Dies deutet darauf hin, dass die durch Heparin hervorgerufenen Effekte eher über eine direkte Bindung, als über Komplexbildung mit beteiligten Molekülen erfolgen, da bei letzterem typischerweise eine Glocken-förmige Kurve entsteht (Greinacher et al., 1994, 1995) und kein konstantes Plateau, wie hier gesehen. Die Erkenntnis, dass keine supratherapeutischen Dosierungen von Heparin zum Hervorrufen der Effekte vonnöten sind, ist dabei

für die klinische Anwendung vorteilhaft, da bei der Anwendung von Heparinen außerhalb der Indikation als Gerinnungshemmer natürlich gerade dieser Effekt nicht aus den Augen gelassen werden darf.

Heparin moduliert in unseren Experimenten jeweils nur die durch TNF- α hervorgerufene Chemokinsekretion. Alleine hat UFH keinen Einfluss auf die basale Chemokinsekretion der ESC. Auch dies könnte für den klinischen Einsatz durchaus von Vorteil sein, da es bedeuten könnte, dass Heparin nur bei Vorhandensein einer Entzündungsreaktion, bei uns dargestellt durch die Zugabe von TNF- α , seine Wirkung auf das Immunmilieu im Endometrium entfaltet und somit das physiologischerweise vorhandene Chemokinmilieu bei Nicht-Vorhandensein einer Entzündungsreaktion nicht beeinflusst.

Es ist bekannt, dass TNF- α seine Wirkung auf ESC über den NF κ B-Signalweg vermittelt (Huber et al., 2007). In der Arbeitsgruppe war untersucht worden, wie TNF- α diesen Signalweg beeinflusst. Spratte et al. zeigten, dass TNF- α den NF κ B-Inhibitor I κ B α hemmt und durch verstärkte Phosphorylierung von NF κ B zu dessen Aktivierung beiträgt (Spratte et al., 2013). In den hier vorliegenden Experimenten zeigen wir, dass nicht nur die TNF- α -Wirkung durch den NF κ B-Inhibitor Parthenolid vollständig hemmbar ist, sondern auch, dass die Effekte durch die Kombination aus TNF- α und Heparin vermutlich über den NF κ B-Signalweg vermittelt werden, da auch die Zugabe von Parthenolid zu TNF- α plus UFH zu einer Hemmung der Chemokinsekretion von GRO- α , IL-8 und RANTES auf das Basalniveau führt. Wie genau es zum Einfluss auf diesen Signalweg kommt, wird durch die von uns durchgeführten Experimente dabei nicht explizit geklärt. Man könnte mutmaßen, dass Heparin dafür mit Untereinheiten von NF κ B oder mit Koaktivatoren der Transkription interagiert, wie es von der Interaktion anderer Moleküle, beispielsweise anderer Transkriptionsfaktoren, mit NF κ B bekannt ist (Hoesel und Schmid, 2013). So binden z.B. die Transkriptionsfaktoren STAT3 (signal transducers and activators of transkription 3), p53 oder der Östrogen-Rezeptor direkt an NF κ B und aktivieren es dadurch. Teils binden mehrere Transkriptionsfaktoren auch gleichzeitig an NF κ B und beeinflussen sich dadurch gegenseitig. Andere Möglichkeiten der Aktivierung von NF κ B sind, wie oben schon angedeutet, die Einflussnahme auf Inhibitoren von NF κ B, wie z.B. I κ B α oder I κ B β . Diese können z.B. phosphoryliert und dadurch von NF κ B abgespalten werden. Dies

5. Diskussion

geschieht durch Kinasen, wie die I κ B-Kinase, welche wiederum über Rezeptoren, z.B. von TNF- α oder IL-1 β aktiviert wird (Hoesel und Schmid, 2013). Im Gegensatz zu dem Mechanismus, welcher für den Einfluss des Heparins auf die INF- γ -Wirkung und damit den verknüpften Signalweg verantwortlich ist (Fluhr et al., 2011a), kann man bei den Beobachtungen bezüglich TNF- α eher eine Interaktion von Heparin mit nachfolgenden Signalmolekülen und nicht mit TNF- α direkt vermuten. Wird NF κ B von seinem Inhibitor I κ B α abgespalten, wird dabei die sogenannte Zellkernlokalisationssequenz auf NF κ B freigelegt, welche die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern steuert. Dort befinden sich viele positiv geladene Aminosäuren (Mallek et al., 1998). Heparin könnte als polyanionisches Molekül beispielsweise an diese Sequenz binden und dadurch die Translokation verhindern. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Heparin im Zellkern die Bindung von NF κ B an die DNA unterbindet, wie es in Endothelzellen gezeigt werden konnte (Lee et al., 2007).

Anschließend untersuchten wir die Heparinwirkung auf die TNF- α -vermittelte Chemokinsekretion im Vergleich zu Heparin-ähnlichen Molekülen, um Aufschluss über die Eigenschaften des Heparins zu erhalten, die wichtig für den von ihm vermittelten Effekt sind. Dabei kamen Substanzen zum Einsatz, welche Heparin ähneln, aber Unterschiede bezüglich der Ladung, des Molekulargewichts oder der antikoagulatorischen Wirkung aufweisen. Auch hier kam es bei allen verwendeten Substanzen nur zu Modulationen des stimulierenden Effekts durch den proinflammatorischen Mediator TNF- α . Die basale Chemokinsekretion der endometrialen Stromazellen blieb davon unberührt. Dies bestätigt noch mal den Befund, dass Heparine und Heparin-ähnliche Moleküle nur beim Vorliegen einer inflammatorischen Reaktion eine Wirkung auf die ESC haben, was vorteilhaft in der klinischen Anwendung sein kann.

Wie oben bereits beschrieben erhöht die Zugabe von UFH die durch TNF- α hervorgerufene Sekretion von GRO- α nicht zusätzlich. Aus welchem Grund dies bei dezidualisierten Zellen aber die drei verwendeten Heparin-ähnlichen Substanzen im Gegensatz zu UFH selber tun, konnten wir nicht klären. Es sei aber darauf hingewiesen, dass die zusätzliche Steigerung der Chemokinsekretion in diesem Fall zwar signifikant, aber gering ausfällt. In Experimenten mit größeren Fallzahlen wäre dieser Effekt möglicherweise nicht zu beobachten gewesen. Die IL-8-Sekretion dezidualisierter ESC betreffend führen

die Heparin-ähnlichen Substanzen nicht zu dem inhibierenden Effekt von UFH. Anders stellt sich dies bei den undifferenzierten Zellen dar, wo sämtliche Substanzen die durch TNF- α gesteigerte IL-8-Sekretion verringern. Diese wurden zwar als Kontrollgruppe in den Experimenten verwendet, in Hinblick auf die Effekte von Heparinen während der Implantation und Schwangerschaft sind sie allerdings nicht von Bedeutung. Dort liegen die ESC dezidualisiert vor. Hier scheinen also bei den differenzierten Stromazellen sowohl die Molekülgröße des Heparins, seine Menge an negativen Ladungen und auch der antikoagulative Effekt eine Rolle für die Heparinwirkung auf die IL-8-Sekretion zu spielen. Im nicht dezidualisierten Zustand scheinen diese Eigenschaften des UFH in den Hintergrund zu rücken. Auf Expressionsebene zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Nur bei den undifferenzierten ESC führen sowohl UFH, als auch die verwendeten Heparin-ähnlichen Substanzen zu einer signifikanten Senkung der TNF- α -vermittelten IL-8-Expression. Interessanterweise rufen sowohl der direkte Thrombin-Hemmer Hirudin, als auch der Faktor-Xa-Inhibitor Rivaroxaban, zwei Gerinnungshemmer mit im Vergleich zu Heparin also unterschiedlicher Wirkungsweise und Struktur, diesen Effekt hervor und das, obwohl dieser durch TNF- α und nicht durch ihre eigentlichen Interaktionspartner der Gerinnungskaskade, Thrombin und Faktor Xa, hervorgerufen worden war. Dezidualisierte ESC betreffend zeigt sich zwar durch alle verwendete Substanzen eine Verminderung der Chemokinexpression, signifikant ist dies aber nur bei UFH, ODSH, Hirudin und Rivaroxaban. Die teils nicht erreichbare Signifikanz kann dabei in der verhältnismäßig geringen Fallzahl ($n=5$) begründet sein.

Im Hinblick auf die RANTES-Sekretion sind die Ergebnisse eindeutiger. Sowohl bei undifferenzierten, als auch bei dezidualisierten ESC führt nur ODSH wie UFH zu einer signifikanten Verstärkung der Chemokinsekretion. Das spricht dafür, dass hier insbesondere die Molekülgröße und die Anzahl der Ladungen von Bedeutung sind. ODSH hat allerdings durch zweifache Desulfatierung verminderte antikoagulative Eigenschaften, diese scheinen für den Effekt demnach nicht entscheidend zu sein. Das Heparinoid Danaparoid erzeugt auch eine geringe Verstärkung des TNF- α -Effekts, diese ist allerdings nicht signifikant. Danaparoid weist deutlich weniger negative Ladungen, als UFH auf. Zudem ist sein Molekulargewicht geringer. Diese beiden Unterschiede zu UFH scheinen hier von Bedeutung zu sein. Auf mRNA-Ebene lassen sich die Effekte durch ODSH und Danaparoid allerdings nicht bestätigen.

5.2. Heparine modulieren Thrombineffekte

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir den Einfluss Thrombins, Partner von Heparin in der Gerinnungskaskade, auf die Chemokinproduktion endometrialer Stromazellen und wie dieser Einfluss durch Heparine moduliert wird. Durch den in der Sekretionsphase und während einer Schwangerschaft verstärkten Blutfluss im Endometrium und eine gleichzeitig erhöhte Permeabilität der Blutgefäße ist Thrombin, wie auch andere Faktoren der Gerinnungskaskade, zu diesen Zeiten vermehrt im Endometrium vorhanden (Lockwood et al., 2002). Thrombin ist, wie auch TNF- α , beteiligt an Prozessen wie habituellen Aborten und hat zudem maßgeblichen Einfluss auf das lokale Immunmilieu (Vincent et al., 1998; Kawano et al., 2011; Matta et al., 2007). Wie auch zuvor bei den Experimenten mit TNF- α gesehen, zeigte sich hier, dass Heparine nur durch Thrombin hervorgerufene Effekte beeinflussen. Im nicht inflammatorischen Milieu haben sie keinen Einfluss auf die Chemokinproduktion der ESC. Wie schon erwähnt, könnte dies für den klinischen Einsatz durchaus vorteilhaft sein, da ein physiologischerweise vorhandenes und notwendiges Zytokinmilieu durch Heparine nicht verändert wird.

Dass Thrombin neben seiner klassischen Aufgabe in der Gerinnungskaskade eine Wirkung auf ESC ausüben kann, war bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden. Während der Dezidualisierung führte Thrombin zu einem signifikanten Anstieg der Sekretion von IGF-1 (Insulin-like growth factor) (Fluhr et al., 2011b).

Wir zeigen nun, dass Thrombin auch die Chemokinproduktion der ESC beeinflussen kann. Zunächst untersuchten wir, wie Thrombin auf mRNA-Ebene die Expression von IL-8 und RANTES verändert, die beiden Chemokine, bei denen in den vorangegangenen Experimenten sowohl durch TNF- α , als auch durch die Kombination von TNF- α und Heparin, Effekte zu sehen waren. Wie auch TNF- α steigert Thrombin die Expression von IL-8 durch ESC signifikant. Dieser Effekt ist durch den direkten Thrombin-Inhibitor Hirudin komplett inhibierbar, was den Einfluss Thrombins nochmal unterstreicht. RANTES betreffend führt Thrombin nur zu einer leichten, nicht signifikanten Steigerung der Chemokinexpression, diese Steigerung wird allerdings durch Hirudin nicht beeinflusst. Mit einer höheren Fallzahl hätte hier möglicherweise Signifikanz er-

reicht werden können.

Auf Proteinebene zeigen wir, dass Thrombin die Sekretion der Chemokine IL-8, MCP-1 und GRO- α signifikant steigert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Kawano et al. (Kawano et al., 2011). Wir untersuchten nun zusätzlich, wie UFH diesen Effekt beeinflusst. Bemerkenswert ist dabei, dass analog zu den TNF- α vermittelten Effekten, Heparin nicht auf die Produktion aller Chemokine Einfluss nimmt. Die gesteigerte Sekretion des Chemokins GRO- α bleibt auch hier durch die Zugabe von Heparin unbeeinflusst, während UFH sowohl die Thrombin-vermittelte Sekretion von IL-8, als auch MCP-1 signifikant vermindert. Im Falle von IL-8 hatten wir bei der durch TNF- α vermittelten Chemokinproduktion den gleichen Effekt beobachten können.

Dieser Einfluss auf die IL-8-, wie auch MCP-1-Produktion wird allerdings nicht nur durch UFH hervorgerufen. Auch Niedermolekulare Heparine unterschiedlicher Molekülgröße (Reviparin - 3,9 kDa, Enoxaparin - 4,2 kDa, Tinzaparin - 4,5 kDa, Dalteparin 6,1 kDa) zeigen diesen Effekt sowohl auf Expressions-, als auch auf Sekretionslevel. Die Stärke des Effekts erfolgt dabei unabhängig von der Molekularmasse. Die Molekülgröße des Heparins scheint für den Heparin-vermittelten Effekt also keine wichtige Rolle zu spielen. Dies ist für den klinischen Alltag von Bedeutung, da dort aufgrund der einfacheren Handhabung und der geringeren Anzahl möglicher Nebenwirkungen häufig LMWH anstatt von UFH angewendet werden. Auf mRNA-Ebene ist auffällig, dass UFH und die verwendeten LMWH die durch Thrombin gesteigerte Chemokinexpression zwar inhibieren, dies aber nicht dazu führt, dass die Expression auf das Niveau der Basalexpression absinkt. Dies ist als starker Hinweis zu werten, dass die beobachteten Effekte durch Heparine nicht auf die klassische Interaktion zwischen Thrombin und Heparin in der Gerinnungskaskade beruhen. Es wäre sonst eine komplette Inhibition der Thrombin-Effekte zu erwarten gewesen.

Thrombin aktiviert den Signalweg über MAPK und Erk1/2 in verschiedenen Zelltypen, beispielsweise in Astrozyten (Wang et al., 2002) und ESC (Kawano et al., 2011). In Übereinstimmung mit diesen Studien beobachteten wir, dass auch die Effekte Thrombins auf die IL-8- und MCP-1-Sekretion durch die Hemmung des MAPK-Signalwegs mittels PD98059 vollständig inhibiert werden konnten. Dass auch Heparin Erk1/2 beeinflussen kann, wurde bereits in Bezug auf humane Trophoblastenzellen und B-Zell-

Progenitorzellen festgestellt (Hills et al., 2006; Milne et al., 2008). Auch hier kann gemutmaßt werden, dass dies den zugrunde liegende Mechanismus der modulatorischen Heparineffekte auf die Thrombinwirkung darstellt.

5.3. Mögliche Effekte *in vivo* durch Beeinflussung des Chemokinmilieus

Folgend soll betrachtet werden, wie sich die beobachteten Effekte auf die Chemokinexpression und -sekretion *in vivo* auswirken könnten.

GRO- α ist physiologischerweise an verschiedenen Prozessen im weiblichen Reproduktionstrakt beteiligt. So lässt es sich periovulatorisch in der Follikelflüssigkeit (Oral et al., 1997), wie auch während der Schwangerschaft in Amnionflüssigkeit und Nabelschnurblut (Cohen et al., 1996) nachweisen. Das Vorhandensein dieses Chemokins scheint somit während der Ovulation und Schwangerschaft von Bedeutung zu sein. Da Heparine die Produktion von GRO- α durch ESC nicht beeinflussen, weder im nicht entzündlichen, noch im inflammatorischen Milieu, erscheinen sie in der klinischen Anwendung diesbezüglich weder fördernde, noch schädliche Effekte auszuüben. Allerdings ist auch bekannt, dass erhöhte GRO- α -Konzentrationen, wie sie durch TNF- α und Thrombin hervorgerufen werden können, mit pathologischen Geschehnissen, wie beispielsweise Endometriose (Oral et al., 1996), in Verbindung gebracht werden können. Die von uns untersuchten Substanzen können diesem Effekt nicht entgegenwirken.

Auch IL-8 ist an physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Einerseits ist es von Bedeutung während der Menstruation (Arici et al., 1998a), der Ovulation (Chang et al., 1998) und Implantation (Caballero-Campo et al., 2002). Während des Implantationsfensters wird das IL-8-Level allerdings auch unter Progesteroneinfluss niedrig gehalten, wodurch möglicherweise eine verstärkte inflammatorische Reaktion verhindert wird (Jones et al., 1997). Somit kann es sich als vorteilhaft erweisen, dass Heparine zwar die TNF- α - und Thrombin-vermittelte Steigerung der IL-8-Produktion inhibieren, dabei i.d.R. aber zu keiner vollständigen Inhibition der Chemokinproduktion führen.

Ähnlich stellt es sich bei MCP-1 dar. Auch dieses Chemokin ist physiologischerweise präovulatorisch in der Follikelflüssigkeit nachweisbar (Arici et al., 1997a) und spielt eine Rolle bei der Implantation (Meter et al., 2005). Bei zu hohen Konzentrationen hat es allerdings schädliche Auswirkungen und kann beteiligt sein an beispielsweise Frühgeburt oder vorzeitigem Blasensprung (Jacobsson et al., 2003). Dass Heparin die Erhöhung der MCP-1 Produktion verhindert, diese aber gleichzeitig nicht unter die basale Sekretion durch dezidualisierte ESC absenkt, kann somit in der Kinderwunschbehandlung von Vorteil sein.

Dass Heparine die RANTES-Produktion noch zusätzlich steigern, könnte sich in der klinischen Anwendung wiederum als nachteilig erweisen. Es kommt zwar physiologischerweise im Endometrium während des gesamten Zyklus vor (Hornung et al., 1997). Die Tatsache, dass T_H2-Zytokine hingegen zu einer Verminderung der RANTES-Sekretion führen (Arima et al., 2000), deutet allerdings daraufhin, dass zu hohe RANTES-Level negative Auswirkungen haben könnten.

Alle genannten Chemokine sind an der Pathogenese von Endometriose beteiligt. Einerseits konnten sie in erhöhten Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen nachgewiesen werden, andererseits produziert das Endometrium erhöhte Chemokinmengen (Oral et al., 1996; Ryan et al., 1995; Li et al., 2012; Arici et al., 1997b; Jolicoeur et al., 1998; Khorram et al., 1993; Hornung et al., 1997). Besonders der Einfluss des Heparins auf die Produktion von IL-8 und MCP-1 könnte auch für eine klinische Anwendung bei diesen Patientinnen sprechen. Die zusätzliche Erhöhung der RANTES-Produktion könnte sich allerdings nachteilig auswirken.

5.4. Limitation der Arbeit, klinische Relevanz und Ausblick

Bei Betrachtung der hier vorgestellten Untersuchungen sollte bedacht werden, dass sie mithilfe von Zellkultur *in vitro* und nur an endometrialen Stromazellen erfolgten. In wie weit sie sich deshalb auf die weitaus komplexere Situation *in vivo* übertragen lassen, ist ungewiss. Dort spielen im Endometrium nicht nur ESC, sondern u.a. auch

5. Diskussion

Epithelzellen und Gefäße eine erhebliche Rolle. Das gerade auch für die Implantation und verschiedene Schwangerschaftskomplikationen, wie habituelle Aborte, so wichtige Immunmilieu entsteht dabei nicht nur aufgrund der Chemokinproduktion von ESC. Verschiedene im Endometrium vorkommende Immunzellen, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, T-Zellen und in besonderer Weise auch die dezidualen NK-Zellen sind hierbei gemeinsam mit den EEC von maßgeblicher Bedeutung. Um diesbezüglich ein genaueres Bild zu erhalten, sind Untersuchungen beispielweise am Tiermodell und im Rahmen klinischer Studien von Nöten.

Eine weitere Schwäche der Arbeit ist, dass die verwendeten Zellen jeweils lediglich von drei bis fünf Frauen und somit einer recht kleinen Anzahl stammten. Die Experimente mit ESC einer größeren Anzahl von Frauen durchzuführen, hätte sicherlich ein repräsentativeres Bild ergeben und teilweise auch zu eindeutigeren Ergebnissen geführt.

In vorherigen Experimenten in der Arbeitsgruppe konnten bereits verschiedene Effekte von Heparinen auf endometriale Stromazellen dargestellt werden. So modulieren UFH und LMWH die Dezidualisierung von ESC (Fluhr et al., 2010). Zudem ist Heparin in der Lage sowohl die Wirkung von $\text{INF-}\gamma$ (Fluhr et al., 2011a), wie auch von $\text{TNF-}\alpha$ (Spratte et al., 2013) zu modulieren. Durch diese Ergebnisse konnte schon gezeigt werden, dass Heparin in der Lage ist über seinen üblichen antikoagulatorischen Effekt hinaus eine Wirkung auf ESC auszuüben (Fluhr et al., 2011b). Die in der hier vorgelegten Arbeit dargestellten Experimente unterstreichen die Bedeutung der antiinflammatorischen Wirkung Heparins noch zusätzlich. Wir zeigten, dass Heparin sowohl die Effekte von $\text{TNF-}\alpha$, als auch Thrombin, *in vitro* beeinflussen kann. Diese immunmodulatorischen Effekte durch Heparin können von Bedeutung während der Implantation und dem Erhalt von Frühschwangerschaft sein. Sie heben somit seine Rolle als potenzielles Präparat zur Behandlung und Vorbeugung habitueller Aborte unbekannter Ursache und Implantationsstörungen durch Beeinflussung proinflammatorischer Effekte von $\text{TNF-}\alpha$ und Thrombin nochmals hervor. Dass Heparin in diesem Gebiet wirksam sein kann, wurde schon in mehreren klinischen Studien belegt (Rai et al., 1997; Badawy et al., 2008).

Bezüglich der klinischen Wirksamkeit gibt es allerdings auch widersprüchliche Angaben. In einer 2009 durchgeführten Studie wurden Frauen mit habituellen Aborten und

einer Thrombophilie, Antiphospholipid-Antikörpern oder antinukleären Antikörpern eingeschlossen. Diese fand keinen Vorteil bezüglich der Geburtsraten zwischen einer alleinigen Aspirinbehandlung und einer Behandlung mit Aspirin plus LMWH (Laskin et al., 2009). Anzumerken ist hier allerdings, dass es sich nicht um Frauen mit habituellen Aborten unbekannter Ursache handelte. Fawzy et al. wiederum verglichen das LMWH Enoxaparin alleine mit der Kombinationstherapie aus Prednison, Aspirin und Progesteron zur Behandlung von Patientinnen mit idiopathischen habituellen Aborten. Hier konnte zwischen beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Geburtenrate oder Schwangerschaftskomplikationen festgestellt werden. Die Abortrate in beiden Gruppen war allerdings deutlich geringer als in der Placebogruppe und beide Behandlungsregime somit ebenbürtig (Fawzy et al., 2008). Eine aktuelle Analyse der Cochrane Collaboration zu diesem Thema stammt aus dem Jahr 2014. Dort wurden 9 randomisierte und quasi-randomisierte, kontrollierte Studien analysiert, welche den Effekt einer antikoagulativen Behandlung mit Aspirin, UFH oder LMWH, bzw. Kombinationen davon an Frauen mit habituellen Aborten mit oder ohne Thrombophilie untersucht hatten. Dabei konnte auf Daten von 1228 Patientinnen zurückgegriffen werden. Hier zeigten sich bei keiner der verwendeten antikoagulativen Substanzen signifikante positive Effekte bezogen auf die Geburtenrate. Auch hatten die Behandlungen keine signifikante Auswirkung auf die Rate an Schwangerschaftskomplikationen. Die Autoren weisen darauf hin, dass das Studiendesign der verglichenen Studien heterogen war. Zudem existiert bisher nur eine begrenzte Anzahl an Studien zu dem Thema, besonders mangelt es an Placebo-kontrollierten Studien. Weitere randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien sind somit notwendig, um die klinische Wirksamkeit oder Nicht-Wirksamkeit von Heparinen und Aspirin in diesem Bereich abschließend zu klären (Jong et al., 2014).

Die hier vorliegenden Ergebnisse ergänzen die schon vorhandenen Erkenntnisse bezüglich des Wirkmechanismus von Heparinen beim Einsatz in der Reproduktionsmedizin. Weitere Grundlagenforschung wird aber notwendig sein, um dieses Verständnis zu vervollständigen, besonders bezüglich der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Effekte Heparins und der Eigenschaften Heparins, welche für diese Effekte verantwortlich sind. Dies würde ermöglichen Heparine möglichst gezielt einzusetzen und gegebenenfalls Heparin-ähnliche Substanzen mit ausgewählten Eigenschaften zu entwickeln.

5. Diskussion

Dabei sollten die Molekülgröße, Ladungen und auch antikoagulative Eigenschaften der Substanzen bedacht werden. Letzteres spielt insbesondere in Bezug auf Blutungen als Nebenwirkung der Heparinbehandlung eine Rolle. Auch bedacht werden sollten sterische Eigenschaften und damit einhergehende mögliche Bindungen, beispielweise an den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$.

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung von Frauen mit idiopathischen habituellen Aborten, welche auch von unseren Ergebnissen unterstützt wird, ist die Anwendung von $\text{TNF-}\alpha$ -Inhibitoren. Winger und Reed zeigten, dass die Kombinationsbehandlung aus Antikoagulation mit entweder nur i.v. Immunglobulinen oder mit Immunglobulinen plus $\text{TNF-}\alpha$ -Inhibitoren der alleinigen antikoagulativen Behandlung überlegen war (Winger und Reed, 2008). Dies ist ein weiterer spannender Bereich in der Therapie habitueller Aborte, welcher weiterer Forschung bedarf.

A. Literaturverzeichnis

- (Akoum et al., 2002) A. Akoum, J. Kong, C. Metz und M.C. Beaumont. *Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis. Fertility and Sterility*, Ausgabe 77, Nr. 5, Seiten 989–994, Mai 2002.
- (Aoki et al., 1995) K. Aoki, S. Kajirura, Y. Matsumoto, M. Ogasawara, S. Okada, Y. Yagami und N. Gleicher. *Preconceptual natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. Lancet*, Ausgabe 345, Nr. 8961, Seiten 1340–1342, Mai 1995.
- (Arici et al., 1993) A. Arici, J.R. Head, P.C. Mac Donald und M.L. Casey. *Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. Molecular and Cellular Endocrinology*, Ausgabe 94, Seiten 195–204, 1993.
- (Arici et al., 1995) A. Arici, P.C. MacDonald und M.L. Casey. *Regulation of monocyte chemotactic protein-1 gene expression in human endometrial cells in cultures. Molecular and cellular endocrinology*, Ausgabe 107, Nr. 2, Seiten 189–197, Februar 1995.
- (Arici et al., 1997a) A. Arici, E. Oral, E. Attar, S.I. Tazuke und D.L. Olive. *Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. Fertility and Sterility*, Ausgabe 67, Nr. 6, Seiten 1065–1072, Juni 1997a.
- (Arici et al., 1997b) A. Arici, E. Oral, O. Bukulmez, S. Buradagunta, O. Bahtiyar und E.E. Jones. *Monocyte chemotactic protein-1 expression in human preovulatory follicles and ovarian cells. Journal of reproductive immunology*, Ausgabe 32, Seiten 201–219, 1997b.
- (Arici et al., 1998a) A. Arici, E. Seli, L.M. Senturk, L.S. Gutierrez, E. Oral und H.S. Taylor. *Interleukin-8 in the Human Endometrium. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Ausgabe 83, Nr. 5, Seiten 1783–1787, 1998a.
- (Arici et al., 1998b) A. Arici, E. Seli, H.B. Zeyneloglu, L.M. Senturk, E. Oral und D.L. Olive. *Interleukin-8 Induces Proliferation of Endometrial Stromal Cells: a Potential Autocrine Growth Factor. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Ausgabe 83, Nr. 4, Seiten 1201–1205, 1998b.
- (Arima et al., 2000) K. Arima, K. Nasu, H. Narahara, K. Fujisawa, N. Matsui und I. Miyakawa. *Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 6, Nr. 3, Seiten 246–251, 2000.
- (Arslan et al., 2004) E. Arslan, M. Colakoglu, C. Celik, K. Gezginc, A. Acar, M. Capar, M. Aköz und C. Akyürek. *Serum TNF- α , IL-6, lupus anticoagulant and antocardiolipin antibody in women with and without a past history of recurrent miscarriage. Archives of gynecology and obstetrics*, Ausgabe 270, Nr. 4, Seiten 227–229, Dezember 2004.

A. Literaturverzeichnis

- (Aumüller et al., 2014) G. Aumüller, G. Aust, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger und H.-G. Zilch. *Anatomie*, Kapitel Innere weibliche Genitalorgane - Gebärmutter (Uterus), Seiten 799 – 804. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 3. Edition, 2014.
- (Badawy et al., 2008) A.M. Badawy, M. Khiary, L.S. Sherif, M. Hassan, A. Ragab und I. Abdelall. *Low-molecular weight heparin in patients with recurrent early miscarriages of unknown aetiology. Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Ausgabe 28, Nr. 3, Seiten 280–284, April 2008.
- (Baggiolini, 1998) M. Baggiolini. *Chemokines and leukocyte traffic. Nature*, Ausgabe 392, Nr. 6676, Seiten 565–568, April 1998.
- (Baines et al., 1997) M.G. Baines, A.J. Duclos, E. Anteckä und E.K. Haddad. *Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. American journal of reproductive immunology*, Ausgabe 37, Nr. 6, Seiten 471–477, Juni 1997. Abstract.
- (Bansala et al., 2011) A. S. Bansala, B. Bajardeen und M. Y. Thum. *The basis and value of currently used immunomodulatory therapies in recurrent miscarriage. Journal of Reproductive Immunology*, Ausgabe 93, Seiten 41–51, 2011.
- (Bazzoni et al., 1993) G. Bazzoni, A. Beltrán Nunes, G. Mascellani, P. Bianchini, E. Dejana und A. Del Maschio. *Effect of heparin, dermatan sulfate and related oligo-derivates on human polymorphonuclear leukocyte function. The Journal of laboratory and clinical medicine*, Ausgabe 121, Nr. 2, Seiten 268–275, Februar 1993. Abstract.
- (Behre, 2016) H. M. Behre. *Jahrbuch 2015 des deutschen IVF Registers. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, 2016.
- (Beier-Hellwig et al., 2001) K. Beier-Hellwig, J. Alfer, F. Müller-Schöttle, D. Crommelinck, C. Karl, K. Sterzik und H. M. Beier. *Das Endometrium und sein Implantationsfenster. Reproduktionsmedizin*, Ausgabe 17, Seiten 30–41, 2001.
- (Bersinger et al., 2008) N.A. Bersinger, F. Frischknecht, R.N. Taylor und M.D. Mueller. *Basal and cytokine-stimulated production of epithelial neutrophil activating peptide-78 (ENA-78) and interleukin-8 (IL-8) by cultured human endometrial epithelial and stromal cells. Fertility and Sterility*, Ausgabe 89, Nr. 3, Seiten 1530–1536, Mai 2008.
- (Blajchman et al., 1989) M.A. Blajchman, E. Young und F.A. Oforu. *Effects of unfractionated heparin, dermatan sulfate and low molecular weight heparin on vessel wall permeability in rabbits. Annals of the New York Academy of Sciences*, Ausgabe 556, Seiten 245–254, 1989.
- (Boron und Boulpaep, 2009) W.F. Boron und E.L. Boulpaep. *Medical Physiology: a cellular and molecular approach*, Kapitel Hemostasis and fibrinolysis, Seiten 458–466. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2. Edition, 2009.
- (Brinkhous et al., 1939) K.M. Brinkhous, H.P. Smith, E.D. Warner und W.H. Seegers. *The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. American Journal of Physiology*, Ausgabe 125, Seiten 683–687, März 1939. Abstract.

- (Brown et al., 1995) K. Brown, S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso und U. Siebenlist. *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. *Science*, Ausgabe 267, Nr. 5203, Seiten 1485–1488, März 1995.
- (Bulmer et al., 1991) J.N. Bulmer, L. Morrison, M. Longfellow, A. Ritson und D. Pace. *Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies*. *Human Reproduction*, Ausgabe 6, Nr. 6, Seiten 791–798, Juli 1991. Abstract.
- (Caballero-Campo et al., 2002) P. Caballero-Campo, F. Domínguez, J. Coloma, M. Meseguer, J. Remohí, A. Pellicer und C. Simón. *Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation*. *Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 8, Nr. 4, Seiten 375–384, 2002.
- (Cackovic et al., 2008) M. Cackovic, C.S. Buhimschi, G. Zhao, E.F. Funai, E.R. Norwitz, E. Kuczynski, C.J. Lockwood und I.A. Buhimschi. *Fractional excretion of tumor necrosis factor alpha in women with severe preeclampsia*. *Obstetrics and Gynecology*, Ausgabe 112, Nr. 1, Seiten 93–100, Juli 2008.
- (Calleja-Agius und Brincat, 2008) J. Calleja-Agius und M.P. Brincat. *Recurrent miscarriages: What is the role of cytokines?* *Gynecological Endocrinology*, Ausgabe 24, Nr. 12, Seiten 663–668, December 2008.
- (Casu, 1989) B. Casu. *Structure of heparin and heparin fragments*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Ausgabe 556, Seiten 1–17, 1989.
- (Chang et al., 1998) R.J. Chang, A. Gougeon und G.F. Erickson. *Evidence of a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Ausgabe 178, Nr. 4, Seiten 650–657, April 1998. Abstract.
- (Chantakru et al., 2001) S. Chantakru, W.A. Kuziel, N. Maeda und B.A. Croy. *A study on the density and distribution of uterine Natural Killer cells at mid pregnancy in mice genetically-ablated for CCR2, CCR5 and the CCR5 receptor ligand, MIP-1 alpha*. *Journal of reproductive immunology*, Ausgabe 49, Nr. 1, Seiten 33–47, Januar 2001.
- (Chaouat et al., 1995) G. Chaouat, A. Assal Meliani, J. Martal, R. Raghupathy, J.F. Elliott, T. Mosmann und T.G. Wegmann. *IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau*. *Journal of immunology*, Ausgabe 154, Nr. 9, Seiten 4261–4268, Mai 1995. Abstract.
- (Chaouat et al., 1990) G. Chaouat, E. Menu, D.A. Clark, M. Dy, M. Minkowski und T.G. Wegmann. *Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy*. *Journal of Reproduction and Fertility*, Ausgabe 89, Seiten 447–458, 1990.
- (Chard, 1995) T. Chard. *Cytokines in implantation*. *Human reproduction update*, Ausgabe 1, Nr. 4, Seiten 385–396, Juli 1995. Abstract.
- (Chen et al., 1991) H.L. Chen, Y.P. Yang, X.L. Hu, K.K. Yelavarthi, J.L. Fishback und J.S. Hunt. *Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation*. *The American journal of pathology*, Ausgabe 139, Nr. 2, Seiten 327–335, August 1991.

A. Literaturverzeichnis

- (Chobotova et al., 2002) K. Chobotova, M.E. Muchmore, J. Carver, H.J. Yoo, S. Manek, W.J. Gullick, D.H. Barlow und H.J. Mardon. *The mitogenic potential of heparin-binding epidermal growth factor in the human endometrium is mediated by the epidermal growth factor receptor and is modulated by tumor necrosis factor-alpha*. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, Ausgabe 87, Nr. 12, Seiten 5769–5777, Dezember 2002.
- (Christiaens et al., 2008) I. Christiaens, D.B. Zaragoza, L. Guilbert, S.A. Robertson, B.F. Mitchell und D.M. Olson. *Inflammatory processes in preterm and term parturition*. *Journal of reproductive immunology*, Ausgabe 79, Seiten 50–57, 2008.
- (Christman et al., 1998) J.W. Christman, L.H. Lancaster und T.S. Blackwell. *Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy*. *Intensive care medicine*, Ausgabe 24, Nr. 11, Seiten 1131–1138, November 1998.
- (Christopherson et al., 2002) K.W. Christopherson, J.J. Campbell, J.B. Travers und R.A. Hromas. *Low-molecular-weight heparins inhibit CCL21-induced T cell adhesion and migration*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Ausgabe 302, Nr. 1, Seiten 290–295, Juli 2002.
- (Clark et al., 1998) D.A. Clark, G. Chaouat, P.C. Arck, H.W. Mittrucker und G.A. Levy. *Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]*. *Journal of Immunology*, Ausgabe 160, Nr. 2, Seiten 545–549, Januar 1998.
- (Clowes und Karnowsky, 1977) A.W. Clowes und M.J. Karnowsky. *Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries*. *Nature*, Ausgabe 265, Nr. 5595, Seiten 625–625, Februar 1977.
- (Cohen et al., 1996) J. Cohen, F. Ghezzi, R. Romero, A. Ghidini, M. Mazor, J.E. Tolosa, L.F. Gancalves und R. Gomez. *GRO alpha in the fetomaternal and amniotic fluid compartments during pregnancy and parturition*. *American journal of reproductive immunology*, Ausgabe 35, Nr. 1, Seiten 23–29, Januar 1996.
- (Conti et al., 1999) P. Conti, R.C. Barbacane und M. Reale. *Chemokines in inflammatory states*. *Allergy and asthma proceedings*, Ausgabe 20, Nr. 4, Seiten 205–208, Juli-August 1999. Abstract.
- (Cooper et al., 2001) M.A. Cooper, T.A. Fehniger und M.A. Caligiuri. *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends in immunology*, Ausgabe 22, Nr. 11, Seiten 633–640, November 2001.
- (Corn et al., 2003) R.A. Corn, M.A. Aronica, F. Zhang, Y. Tong, S.A. Stanley, S.R. Kim, L. Stephenson, B. Enerson, S. McCarthy, A. Mora und M. Boothby. *T cell-intrinsic requirement for NF-kappa B induction in postdifferentiation INF-gamma production and clonal expansion in Th1 response*. *Journal of immunology*, Ausgabe 171, Nr. 4, Seiten 1816–1824, August 2003.
- (Curry et al., 1973) N. Curry, E.J. Bandana und B. Pirofsky. *Heparin sensitivity. Report of a case*. *Archives of internal medicine*, Ausgabe 132, Nr. 5, Seiten 744–754, November 1973.
- (Davie et al., 1991) E.W. Davie, K. Fujikawa und W. Kisiel. *The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation*. *Biochemistry*, Ausgabe 30, Nr. 43, Seiten 10363–10370, Oktober 1991.

- (Deepak et al., 2007) S. Deepak, K. Kottapalli, R. Rakwal, G. Oros, K. Rangappa, H. Iwashashi, Y. Masuo und G. Agrawal. *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. *Current genomics*, Ausgabe 8, Nr. 4, Seiten 234–251, Juni 2007.
- (Denison et al., 1998a) F.C. Denison, R.W. Kelly, A.A. Calder und S.C. Riley. *Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term*. *Human Reproduction*, Ausgabe 13, Nr. 12, Seiten 3560–3565, Dezember 1998a. Abstract.
- (Denison et al., 1998b) F.C. Denison, S.C. Riley, N.C. Wathen, T. Chard, A.A. Calder und R.W. Kelly. *Differential concentrations of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 within the fluid compartments present during the first trimester of pregnancy*. *Human Reproduction*, Ausgabe 13, Nr. 8, Seiten 2292–2295, August 1998b. Abstract.
- (Devergne et al., 1994) O. Devergne, A. Marfaing-Koka, T.J. Schall, M.B. Leger-Ravet, M. Sadick, M. Peuchmaur, M.C. Crevon, K.J. Kim, T.T. Schall, T. Kim, P. Galanau und D. Emilie. *Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells*. *The journal of experimental medicine*, Ausgabe 179, Nr. 5, Seiten 1689–1694, Mai 1994.
- (Diamanti et al., 2013) P. Diamanti, C.V. Cox, J.P. Moppett und A. Blair. *Parthenolide eliminates leukemia-initiating cell populations and improves survival in xenografts of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, Ausgabe 121, Nr. 8, Seiten 1384–1393, Februar 2013.
- (Dunn et al., 2002) C. L. Dunn, H. O. D. Critchley und R. W. Kelly. *IL-15 Regulation in Human Endometrial Stromal Cells*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Ausgabe 87, Nr. 4, Seiten 1898–1901, April 2002.
- (Eisermann et al., 1988) J. Eisermann, M.J. Gast, J. Pineda, R.R. Odem und J.L. Collins. *Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery*. *Fertility and Sterility*, Ausgabe 50, Nr. 4, Seiten 573–579, Oktober 1988.
- (EMA, 2016) European Medicines Agency EMA. *Xarelto (Rivaroxaban) - About*. 2016. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000944/human_med_001155.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Last update: 14.10.2016, Rev. 29.05.2017.
- (Fahey und Wira, 2002) J.V. Fahey und C.R. Wira. *Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture*. *Journal of infectious disease*, Ausgabe 185, Nr. 11, Seiten 1606–1613, 2002.
- (Fawzy et al., 2008) M. Fawzy, T. Shokeir, M. El-Tatongy, O. Warda, A.-A. A. El-Refaiey und A. Mosbah. *Treatment options and pregnancy outcome in women with idiopathic recurrent miscarriage: a randomized placebo-controlled study*. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Ausgabe 278, Seiten 33–38, 2008.
- (Fernandez et al., 1986) F. Fernandez, P. N’guyen, J. van Ryn, F.A. Oforu, J. Hirsh und M.R. Buchanan. *Hemorrhagic doses of heparin and other glycosaminoglycans induce a platelet defect*. *Thrombosis reserach*, Ausgabe 43, Nr. 4, Seiten 491–495, August 1986.

A. Literaturverzeichnis

- (Fluhr et al., 2008) H. Fluhr, S. Carli, M. Deperschmidt, D. Wallwiener, M. Zygmunt und P. Licht. *Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells. Fertility and Sterility*, Ausgabe 90, Nr. 2, Seiten 1384–1389, Oktober 2008.
- (Fluhr et al., 2006) H. Fluhr, S. Krenzer, M. Deperschmidt, M. Zwirner, D. Wallwiener und P. Licht. *Human chorionic gonadotropin inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells. Fertility and Sterility*, Ausgabe 86, Nr. 1, Seiten 236–238, Juli 2006.
- (Fluhr et al., 2010) H. Fluhr, J. Spratte, J. Erhardt, F. Steinmüller, P. Licht und M. Zygmunt. *Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells. Fertility and Sterility*, Ausgabe 93, Nr. 8, Seiten 2582–2587, Mai 2010.
- (Fluhr et al., 2011a) H. Fluhr, J. Spratte, S. Heidrich, J. Ehrhardt, F. Steinmüller und M. Zygmunt. *Heparin inhibits interferon- γ signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon- γ . Fertility and Sterility*, Ausgabe 95, Nr. 4, Seiten 1272–1277, März 2011a.
- (Fluhr et al., 2011b) H. Fluhr, J. Spratte, S. Heidrich, J. Erhardt, A. Greinacher und M. Zygmunt. *The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 17, Nr. 6, Seiten 354–359, Juni 2011b.
- (Fortunato et al., 1995) S.J. Fortunato, R. Menon und K.F. Swan. *Amniochorion: a source of interleukin-8. American Journal of Reproductive Immunology*, Ausgabe 34, Nr. 3, Seiten 156–162, September 1995. Abstract.
- (Fritchley et al., 2000) S.J. Fritchley, J.A. Kirby und S. Ali. *The antagonism of interferon-gamma (INF-gamma) by heparin: examination of the blockade of class II MHC antigen and heat shock protein-70 expression. Clinical and experimental immunology*, Ausgabe 120, Nr. 2, Seiten 247–252, Mai 2000.
- (Fryer et al., 1997) A. Fryer, Y.C. Huang, G. Rao, D. Jacoby, E. Mancilla, R. Whorton, C.A. Piantadosi, T. Kennedy und J. Hoidal. *Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacological activity in the lung. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Ausgabe 282, Nr. 1, Seiten 208–219, 1997.
- (García-Velasco und Arici, 1999) J.A. García-Velasco und A. Arici. *Chemokines and human reproduction. Fertility and Sterility*, Ausgabe 71, Nr. 6, Seiten 983–993, Juni 1999.
- (Garrido-Gimenez und Alijotas-Reig, 2015) C. Garrido-Gimenez und J. Alijotas-Reig. *Recurrent miscarriages: causes, evaluation and management. Postgraduate Medical Journal*, Ausgabe 91, Nr. 1073, Seiten 151–162, March 2015.
- (Ginsberg et al., 1990) J.S. Ginsberg, G. Kowalchuk, J. Hirsh, P. Brill-Edwards, R. Burrows, G. Coates und C. Webber. *Heparin effect on bone density. Thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 64, Nr. 2, Seiten 286–289, Oktober 1990.
- (Gnainsky et al., 2010) Y. Gnainsky, I. Granot, P.B. Also, A. Barash, Y. Or, E. Schechtman, G. Mor und N. Dekel. *Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. Fertility and Sterility*, Ausgabe 94, Nr. 6, Seiten 2030–2036, November 2010.

- (Golds et al., 1989) E.E. Golds, P. Mason und P. Nyirkos. *Inflammatory cytokines induce synthesis and secretion of gro protein and a neutrophil chemotactic factor but not beta 2-microglobulin in human synovial cells and fibroblasts. The Biochemical Journal*, Ausgabe 259, Nr. 2, Seiten 585–588, April 1989.
- (Gray et al., 2008) E. Gray, B. Mulloy und T.W. Barrowcliffe. *Heparin and low-molecular-weight heparin. Thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 99, Nr. 5, Seiten 807–818, Mai 2008.
- (Greinacher et al., 1995) A. Greinacher, S. Alban, V. Dummel, G. Franz und C. Mueller-Eckhardt. *Characterization of the structural requirements for a carbohydrate based anticoagulant with a reduced risk of inducing the immunological type of heparin-associated thrombocytopenia. Thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 74, Nr. 3, Seiten 886–892, September 1995.
- (Greinacher et al., 1994) A. Greinacher, B. Pötzsch, J. Amiral, V. Dummel, A. Eichner und C. Mueller-Eckhardt. *Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. Thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 71, Nr. 2, Seiten 247–251, Februar 1994.
- (Haddad et al., 1997) E.K. Haddad, A.J. Duclos, W.S. Lapp und M.G. Baines. *Early embryo loss is associated with the prior expression of macrophage activation markers in the decidua. Journal of Immunology*, Ausgabe 158, Nr. 10, Seiten 4886–4892, Mai 1997. Abstract.
- (Hadfield et al., 2011) K.A. Hadfield, S.A. McCracken, A.W. Ashton, T.G. Nguyen und J.M. Morris. *Regulated suppression of NF- κ B throughout pregnancy maintains a favourable cytokine environment necessary for pregnancy success. Journal of reproductive immunology*, Ausgabe 89, Nr. 1, Seiten 1–9, April 2011. Abstract.
- (Haider und Knöfler, 2009) S. Haider und M. Knöfler. *Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. Placenta*, Ausgabe 30, Seiten 111–123, 2009.
- (Hatakeyama et al., 2004) M. Hatakeyama, T. Imaizumi, W. Tamo, K. Yamashita, H. Yoshida, I. Fukuda und K. Satoh. *Heparin inhibits INF-gamma-induced fractalkine/C3CL1 expression in human endothelial cells. Inflammation*, Ausgabe 28, Nr. 1, Seiten 7–13, Februar 2004.
- (Hecht et al., 2004) I. Hecht, R. Hershkovich, S. Shvitiel, T. Lapidot, I.R. Cohen, O. Lider und L. Cahalon. *Heparin-disaccharide affects T cells: inhibition of NF-kappaB activation, cell migration, and modulation of intracellular signaling. Journal of leukocyte biology*, Ausgabe 75, Nr. 6, Seiten 1139–1146, Juni 2004. Abstract.
- (Hewamana et al., 2008) S. Hewamana, S. Alghazal, T.T. Lin, M. Clement, C. Jenkins, M.L. Guzman, C.T. Jordan, S. Neelakantan, P.A. Crooks, A.K. Burnett, G. Pratt, C. Feagan, C. Rowntree, P. Brennan und C. Pepper. *The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. Blood*, Ausgabe 111, Nr. 9, Seiten 4681–4689, Mai 2008.
- (Hills et al., 2006) F.A. Hills, V.M. Abrahams, B. González-Timón, J. Francis, B. Cloke, L. Hinkson, R. Rai, G. Mor, L. Regan, M. Sullivan, E.W. Lam und J.J. Brosens. *Heparin prevents programmed cell death in human trophoblast. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 12, Nr. 4, Seiten 237–243, April 2006.

A. Literaturverzeichnis

- (Hirsh, 1991) J. Hirsh. *Heparin. The New England Journal of Medicine*, Ausgabe 324, Nr. 22, Seiten 1565–1574, 1991.
- (Hirsh und Raschke, 2004) J. Hirsh und R. Raschke. *Heparin and low-molecular-weight heparin: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. Chest*, Ausgabe 126, Seiten 188S–203S, September 2004. Abstract.
- (Hochart et al., 2006) H. Hochart, P.V. Jenkins, O.P. Smith und B. White. *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*, Ausgabe 133, Nr. 1, Seiten 62–67, April 2006.
- (Hoesel und Schmid, 2013) B. Hoesel und J.A. Schmid. *The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. Molecular Cancer*, Ausgabe 12, Nr. 86, Seite •, August 2013.
- (Hornung et al., 2001) D. Hornung, F. Bentzien, D. Wallwiener, L. Kiesel und R.N. Taylor. *Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 7, Nr. 2, Seiten 163–168, 2001.
- (Hornung et al., 1997) D. Hornung, I.P. Ryan, V.A. Chao, J.L. Vigne, E.D. Schriock und R.N. Taylor. *Immunolocalization and Regulation of the Chemokine RANTES in Human Endometrial and Endometriosis Tissues and Cells. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Ausgabe 82, Nr. 5, Seiten 1621–1628, 1997.
- (Huber et al., 2007) A.V. Huber, L. Saleh, J. Prast, P. Haslinger und M. Knöfler. *Human chorionic gonadotrophin attenuates NF-kappaB activation and cytokine expression of endometriotic stromal cells. Molecular human reproduction*, Ausgabe 13, Nr. 8, Seiten 595–604, August 2007.
- (Hung et al., 2004) T.H. Hung, D.S. Charnock-Jones, J.N. Skepper und G.J. Burton. *Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. The American journal of pathology*, Ausgabe 164, Nr. 3, Seiten 1049–1061, März 2004.
- (Hunt et al., 1992) J.S. Hunt, H.L. Chen, X.L. Hu und S. Tabibzadeh. *Tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleid acid and protein in human endometrium. Biology of reproduction*, Ausgabe 47, Nr. 1, Seiten 141–147, Juli 1992. Abstract.
- (Iborra et al., 2005) A. Iborra, J.R. Palacio und P. Martinez. *Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. Chemical immunology and allergy*, Ausgabe 88, Seiten 150–162, 2005.
- (Jacobsson et al., 2003) B. Jacobsson, R.M. Holst, U.B. Wennerholm, B. Andersson, H. Lilja und H. Hagberg. *Monocyte chemotactic-protein-1 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. American journal of obstetrics and gynecology*, Ausgabe 189, Nr. 4, Seiten 1161–1167, Oktober 2003.
- (Jenkins et al., 2000) C. Jenkins, J. Roberts, R. Wilson, M.A. MacLean, J. Shilito und J.J. Walker. *Evidence of a T_H 1 type response associated with recurrent miscarriage. Fertility and Sterility*, Ausgabe 73, Nr. 6, Seiten 1206–1208, Juni 2000.

- (Johann et al., 1995) S. Johann, C. Zoller, S. Haas, G. Blümel, M. Lipp und R. Förster. *Sulfated polysaccharide anticoagulants suppress natural killer cell activity in vitro. Thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 74, Nr. 4, Seiten 998–1002, Oktober 1995.
- (Jokhi et al., 1994) P.P. Jokhi, A. King, A.M. Sharkey, S.K. Smith und Y.W. Loke. *Screening for cytokine messenger ribonucleid acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Journal of immunology*, Ausgabe 153, Nr. 10, Seiten 4427–4435, November 1994. Abstract.
- (Jolicoeur et al., 1998) C. Jolicoeur, M. Boutouli, R. Drouin, I. Paradis, A. Lemay und A. Akoum. *Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 in the endometrium of women with endometriosis. American journal of pathology*, Ausgabe 152, Nr. 1, Seiten 125–133, Januar 1998.
- (Jones et al., 1997) R.L. Jones, R.W. Kelly und H.O. Critchley. *Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. Human Reproduction*, Ausgabe 12, Nr. 6, Seiten 1300–1306, Juni 1997. Abstract.
- (Jong et al., 2014) P.G. Jong, S. Kaandorp, M. Di Nisio, M. Goddijn und S. Middeldorp. *Aspirin and/or heparin for women with unexplained recurrent miscarriage with or without inherited thrombophilia [Review]. The Cochrane database of systematic reviews*, Ausgabe 7, Juli 2014.
- (Jung et al., 1995) H.C. Jung, L. Eckmann, S.K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska und M.F. Kagnoff. *A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. The Journal of clinical investigation*, Ausgabe 95, Nr. 1, Seiten 55–65, Januar 1995.
- (Kameyoshi et al., 1992) Y. Kameyoshi, A. Dörschner, A.I. Mallet, E. Christophers und J.M. Schröder. *Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. The journal of experimental medicine*, Ausgabe 176, Nr. 2, Seiten 587–592, August 1992.
- (Karin und Ben-Neriah, 2000) M. Karin und Y. Ben-Neriah. *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF κ B activity. Annual review of immunology*, Ausgabe 18, Seiten 621–663, 2000.
- (Karin und Lin, 2002) M. Karin und A. Lin. *NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nature immunology*, Ausgabe 3, Nr. 3, Seiten 221–227, März 2002.
- (Kawano et al., 2011) Y. Kawano, Y. Furukawa, Y. Kawano, K. Nasu und H. Narahara. *Thrombin-induced chemokine production in endometrial stromal cells. Human Reproduction*, Ausgabe 26, Nr. 2, Seiten 407–413, Februar 2011.
- (Kayisli et al., 2002) U.A. Kayisli, N.G. Mahutte und A. Arici. *Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. American journal of reproductive immunology*, Ausgabe 47, Nr. 4, Seiten 213–221, April 2002.
- (Khorram et al., 1993) O. Khorram, R.N. Taylor, I.P. Ryan, T.J. Schall und D.V. Landers. *Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. American journal of obstetrics and gynecology*, Ausgabe 169, Nr. 6, Seiten 1545–1549, Dezember 1993. Abstract.
- (King, 2000) A. King. *Uterine leukocytes and decidualization. Human Reproduction Update*, Ausgabe 6, Nr. 1, Seiten 28–36, 2000.

A. Literaturverzeichnis

- (King et al., 2000) A. King, D.S. Allan, M. Bowen, S.J. Powis, S. Joseph, S. Verma, S.E. Hiby, A.J. McMichael, Y.W. Loke und V.M. Braud. *HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. European journal of immunology*, Ausgabe 30, Seiten 1623–1631, 2000.
- (King et al., 1998) A. King, T. Burrows, S. Verma, S. Hiby und Y.W. Loke. *Human uterine lymphocytes. Human Reproduction Update*, Ausgabe 5, Nr. 5, Seiten 480–485, September-Oktober 1998. Abstract.
- (King et al., 1995) A. King, P.P. Jokhi, S.K. Smith, A.M. Sharkey und Y.W. Loke. *Screening for cytokine messenger ribonucleid acids in human villous and extravillous trophoblasts using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Cytokine*, Ausgabe 7, Nr. 4, Seiten 364–371, Mai 1995. Abstract.
- (King et al., 1989) A. King, V. Wellings, L. Gardner und Y.W. Loke. *Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. Human Immunology*, Ausgabe 24, Nr. 3, Seiten 195–205, March 1989.
- (Knackstedt et al., 2003) M.K. Knackstedt, A.C. Zenclussen, K. Hertwig, E. Hagen, J.W. Dudenhausen, D.A. Clark und P.C. Arck. *Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. American journal of reproductive immunology*, Ausgabe 49, Nr. 4, Seiten 210–220, April 2003. Abstract.
- (Koch et al., 1992) A.E. Koch, P.J. Polverini, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, L.A. DiPietro, V.M. Elner, S.G. Elner und R.M. Strieter. *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science*, Ausgabe 258, Seiten 1798–1801, Dezember 1992. Abstract.
- (Kutteh, 1996) W.H. Kutteh. *Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is uperior to low-dose aspirin alone. American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Ausgabe 174, Nr. 5, Seiten 1584–1589, May 1996. Abstract.
- (Kwak-Kim et al., 2003) J. Kwak-Kim, H. Chung-Bang, S. Ng, E. Ntrivalas, C. Mangubat, K. Beaman, A. Beer und A. Gilman-Sachs. *Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. Human Reproduction*, Ausgabe 18, Nr. 4, Seiten 767–773, 2003.
- (Laird et al., 1997) S.M. Laird, E.M. Tuckerman, C.F. Dalton, B.C. Dunphy, T.C. Li und X. Zhang. *The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings na dproduction by cells in culture. Human Reproduction*, Ausgabe 12, Nr. 3, Seiten 569–574, 1997.
- (Laskin et al., 2009) C.A. Laskin, K.A. Spitzer, C.A. Clark, M.R. Crowther, J.S. Ginsberg, G.A. Hawker, J.C. Kingdom, J. Barrett und M. Gent. *Low molecular weight heparin and aspirin for recurrent pregnancy loss: results from the randomized, controlled HepASA Trial. The journal of rheumatology*, Ausgabe 36, Nr. 2, Seiten 279–287, Februar 2009. Abstract.
- (Lee et al., 2007) J.H. Lee, J. Lee, G.H. Seo, C.H. Kim und Y.S. Ahn. *Heparin inhibits NF-kappaB activation and increases cell death in cerebral endothelial cells after oxygen-glucose deprivation. Journal of molecular neuroscience*, Ausgabe 32, Nr. 2, Seiten 145–154, 2007.

- (Letourneur et al., 1995) D. Letourneur, B.L. Caleb und J.J. Castellot Jr. *Heparin binding, internalization, and metabolism in vascular smooth muscle cells:I and II. Journal of cellular physiology*, Ausgabe 165, Nr. 3, Seiten 676–695, Dezember 1995.
- (Lever et al., 2000) R. Lever, J.R. Hoult und C.P. Page. *The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. British journal of pharmacology*, Ausgabe 129, Nr. 3, Seiten 533–540, Februar 2000.
- (Levine und Hirsh, 1986) M.N. Levine und J. Hirsh. *Hemorrhagic complications of anticoagulant therapy. Seminars in thrombosis and hemostasis*, Ausgabe 12, Nr. 1, Seiten 39–57, Januar 1986.
- (Löffler et al., 2007) G. Löffler, P.E. Petrides und P.C. Heinrich. *Biochemie und Pathobiochemie*, Kapitel Blutstillung, Seiten 979–987. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 8. Edition, 2007.
- (Li et al., 2012) M.Q. Li, X.Z. Luo, Y.H. Meng, J. Mei, X.Y. Zhu, L.P. Jin und D.J. Li. *CX-CL8 enhances proliferation and growth and reduces apoptosis in endometrial stromal cells in an autocrine manner via a CXCR 1-triggered PTEN/AKT signal pathway. Human Reproduction*, Ausgabe 27, Nr. 7, Seiten 2107–2116, 2012.
- (Li et al., 2001) X.F. Li, D.S. Charnock-Jones, E. Zhang, S. Hiby, S. Malik, K. Day, D. Licence, J.M. Bowen, L. Gardner, A. King, Y.W. Loke und S.K. Smith. *Angiogenic growth factor mRNAs in uterine natural killer cells. The journal of clinical endocrinology and metabolism*, Ausgabe 86, Nr. 4, Seiten 1823–1834, April 2001.
- (Lim et al., 2000) K.J. Lim, O.A. Odukoya, R.A. Ajjan, T.C. Li, A.P. Weetman und I.D. Cooke. *The role of T-helper cytokines in human reproduction. Fertility and Sterility*, Ausgabe 73, Nr. 1, Seiten 136–142, Januar 2000.
- (Lin et al., 2001) C.C. Lin, M.H. Shyr, C.S. Chien, C.C. Wang, C.T. Chiu, L.D. Hsiao und C.M. Yang. *Mechanism of thrombin-induced MAPK activation associated with cell proliferation in human cultured tracheal smooth muscle cells. Cellular signaling*, Ausgabe 13, Nr. 4, Seiten 257–267, April 2001.
- (Lin und Gu, 2005) J. Lin und Y. Gu. *Effect of monocyte chemoattractant protein-1 and estradiol on the secretion of vascular endothelial growth factor in endometrial stromal cells in vitro. Fertility and Sterility*, Ausgabe 84, Nr. 6, Seiten 1793–1796, Dezember 2005.
- (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015) R. Lüllmann-Rauch und E. Asan. *Taschenlehrbuch Histologie*, Kapitel Weibliche Geschlechtsorgane - Uterus, Seiten 555–561. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 5. Edition, 2015.
- (Locksley et al., 2001) R.M. Locksley, N. Killeen und M.J. Lenardo. *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell*, Ausgabe 104, Nr. 4, Seiten 487–501, Februar 2001.
- (Lockwood et al., 2002) C.J. Lockwood, G. Krikun, A.B. Koo, S. Kadner und F. Schatz. *Differential effects of thrombin and hypoxia on endometrial stromal and glandular epithelial cell vascular endothelial growth factor expression. The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Ausgabe 87, Nr. 9, Seiten 4280–4286, September 2002.

A. Literaturverzeichnis

- (Loetscher et al., 1994) P. Loetscher, M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini und B. Moser. *Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. FASEB journal*, Ausgabe 8, Nr. 13, Seiten 1055–1060, Oktober 1994. Abstract.
- (Lukacs et al., 1995) N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, R. Allen, H.L. Evanoff, C.L. Shaklee, J.S. Sherman, M.D. Burdick und R.M. Strieter. *Stimulus and cell-specific expression of C-X-C and C-C chemokines by pulmonary stromal cell populations. The American journal of physiology*, Ausgabe 268, Seiten L856–L861, Mai 1995.
- (Malek et al., 1998) S. Malek, T. Huxford und G. Ghosh. *I κ B α functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF- κ B. The Journal of biological chemistry*, Ausgabe 273, Nr. 39, Seiten 25427–25435, September 1998.
- (Manduteanu et al., 2002) I. Manduteanu, M. Voinea, M. Capraru, E. Dragomir und M. Simionescu. *A novel attribute of enoxaparin: inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules. Pharmacology*, Ausgabe 65, Nr. 1, Seiten 32–37, Mai 2002.
- (Mann et al., 2003) K.G. Mann, K. Brummel und S. Butenas. *What is all that thrombin for? Journal of thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 1, Nr. 7, Seiten 1504–1514, Juli 2003.
- (Marcfarlane et al., 2001) S.R. Marcfarlane, M.J. Seatter, T. Kanke, G.D. Hunter und R. Plevin. *Proteinase-activated receptors. Pharmacological review*, Ausgabe 53, Nr. 2, Seiten 245–282, Juni 2001.
- (Marshall, 1995) C.J. Marshall. *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell*, Ausgabe 80, Nr. 2, Seiten 179–185, Januar 1995.
- (Matta et al., 2007) P. Matta, C.J. Lockwood, F. Schatz, G. Krikun, M. Rahman, L. Buchwalder und E.R. Norwitz. *Thrombin regulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in human first trimester and term decidual cells. American journal of obstetrics and gynecology*, Ausgabe 196, Nr. 3, Seiten 268.e1–e8, März 2007.
- (McCracken et al., 2007) S.A. McCracken, K. Hadfield, Z. Rahimi, E.D. Gallery und J.M. Morris. *NF-kappaB-regulated suppression of t-bet in t cells represses th1 immune responses in pregnancy. European Journal of Immunology*, Ausgabe 37, Seiten 1386–1396, 2007.
- (McLean, 1916) J. McLean. *The thromboplastic action of cephalin. American Journal of Physiology*, Ausgabe 41, Seiten 250–257, 1916.
- (Menon et al., 2002) R. Menon, S.J. Lombardi und S.J. Fortunato. *TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. Journal of assisted reproduction and genetics*, Ausgabe 19, Nr. 4, Seiten 201–204, April 2002.
- (Mestecky et al., 2005) J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.R. McGhee und L. Mayer. *Mucosal Immunology*, Kapitel Endocrine regulation of the mucosal system in the female reproductive tract, Seiten 1661–1676. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, 3. Edition, 2005. Autoren des Kapitels: C. Wira, M.A. Crane-Godreau und K. Grant.

- (Meter et al., 2005) R.A. Meter, C.R. Wira und J.V. Fahey. *Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by human uterine epithelium directs monocyte migration in culture*. *Fertility and Sterility*, Ausgabe 84, Nr. 1, Seiten 191–201, Juli 2005.
- (Milne et al., 2008) C.D. Milne, S.A. Corfe und C.J. Paige. *Heparan sulfate and heparin enhance ERK phosphorylation and mediate preBCR-dependent events during B lymphopoiesis*. *Journal of immunology*, Ausgabe 180, Nr. 5, Seiten 2839–2847, März 2008.
- (Mingari et al., 1997) M.C. Mingari, C. Vitale, C. Cantoni, R. Bellomo, M. Ponte, F. Schiavetti, S. Bertone, A. Moretta und L. Moretta. *Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor*. *European Journal of Immunology*, Ausgabe 27, Seiten 1374–1380, 1997.
- (Mire-Sluis und Thorpe, 1998) A.R. Mire-Sluis und R. Thorpe. *Cytokines*, Kapitel Structural, regulatory, and functional studies of the GRO gene and protein, Seiten 96–116. Academic Press, San Diego, 4 Edition, 1998.
- (Mülhardt, 2013) C. Mülhardt. *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*, Kapitel Die Polymerase-Kettenreaktion, Seiten 82–85, 103–108. Springer Spektrum, Heidelberg, 7. Edition, 2013.
- (Moffett und Loke, 2006) A. Moffett und C. Loke. *Immunology of placentation in eutherian mammals*. *Nature reviews - Immunology*, Ausgabe 6, Nr. 8, Seiten 584–594, August 2006.
- (Moffett-King, 2002) A. Moffett-King. *Natural killer cells and pregnancy*. *Nature reviews - Immunology*, Ausgabe 2, Nr. 9, Seiten 656–663, September 2002.
- (Moser et al., 1990) B. Moser, I. Clark-Lewis, R. Zwahlen und M. Baggiolini. *Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity*. *The Journal of experimental medicine*, Ausgabe 171, Nr. 5, Seiten 1797–1802, Mai 1990.
- (Mosmann und Coffman, 1989) T.R. Mosmann und R.L. Coffman. *TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties*. *Annual Review of Immunology*, Ausgabe 7, Seiten 145–173, 1989.
- (Mueller et al., 2003) M.D. Mueller, L. Mazzucchelli, C. Buri, D.I. Lebovic, E. Dreher und R.N. Taylor. *Epithelial neutrophil-activating peptide 78 concentrations are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis*. *Fertility and Sterility*, Ausgabe 79, Nr. 1, Seiten 815–820, März 2003.
- (Murphy et al., 2012a) K. Murphy, C.A. Janeway, P. Travers und M. Walport. *Janeway's immunobiology*, Kapitel Autoimmunity and Transplantation - The fetus is an allograft that is tolerated repeatedly, Seiten 661–663. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, Abingdon, 8. Edition, 2012a.
- (Murphy et al., 2012b) K. Murphy, C.A. Janeway, P. Travers und M. Walport. *Janeway's immunobiology*, Kapitel Induces innate responses to infection - Chemokines released by macrophages and dendritic cells recruit effector cells to sites of infection, Seiten 102–103, 782–783. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, Abingdon, 8. Edition, 2012b.

A. Literaturverzeichnis

- (Mutschler et al., 2008) E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth und M. Schäfer-Korting. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, Kapitel Hämostase (Blutstillung), Seiten 504–506, 513–518. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 9. Edition, 2008.
- (Nasu et al., 2001a) K. Nasu, K. Arima, K. Kai, K. Fujisawa, M. Nishida und I. Miyakawa. *Expression of epithelial neutrophil-activating peptide 78 in cultured human endometrial stromal cells. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 7, Nr. 5, Seiten 453–458, 2001a.
- (Nasu et al., 2001b) K. Nasu, K. Fujisawa, K. Arima, K. Kai, T. Sugano und I. Miyakawa. *Expression and regulation of growth-regulated oncogene α in human endometrial stromal cells. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 7, Nr. 8, Seiten 741–746, 2001b.
- (Nasu et al., 1998) K. Nasu, N. Matsui, H. Narahara, Y. Tanaka und I. Miyakawa. *Effects of interferon-gamma on cytokine production by endometrial stromal cells. Human Reproduction*, Ausgabe 13, Nr. 9, Seiten 2598–2601, September 1998. Abstract.
- (Nelson und Greer, 2008) S.M. Nelson und I.A. Greer. *The potential role of heparin in assisted conception. Human Reproduction Update*, Ausgabe 14, Nr. 6, Seiten 623–645, 2008.
- (Oral et al., 1997) E. Oral, E. Seli, M.O. Bahtiyar, E.E. Jones und A. Arici. *Growth-regulated alpha expression in human preovulatory follicles and ovarian cells. American Journal of Reproductive Immunology*, Ausgabe 38, Seiten 19–25, 1997.
- (Oral et al., 1996) E. Oral, E. Seli, M.O. Bahtiyar, D.L. Olive und A. Arici. *Growth-regulated alpha expression in the peritoneal environment with endometriosis. Obstetrics and Gynecology*, Ausgabe 88, Nr. 6, Seiten 1050–1056, Dezember 1996. Abstract.
- (Ostensen, 1999) M. Ostensen. *Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Annals of the New York Academy of Sciences*, Ausgabe 876, Seiten 131–144, Juni 1999.
- (Perzborn et al., 2005) E. Perzborn, J. Strassburger, A-Wilmen, J. Pohlmann, S. Roehrig, K.H. Schlemmer und A. Straub. *In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor. Journal of thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 3, Nr. 3, Seiten 514–521, März 2005.
- (Philippeaux und Piguët, 1993) M.M. Philippeaux und P.F. Piguët. *Expression of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in the endometrial mucosa during the menstrual cycle. The American journal of pathology*, Ausgabe 143, Nr. 2, Seiten 480–486, August 1993.
- (Piccinni, 2005) M.P. Piccinni. *Chemical immunology and allergy*, Ausgabe 89, Kapitel Immunology of pregnancy - T Cells in Pregnancy, Seiten 3–9. Karger, Basel, 2005.
- (Piccinni et al., 1998) M.P. Piccinni, L. Beloni, C. Livi, E. Maggi, G. Scarselli und S. Romagnani. *Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. Nature medicine*, Ausgabe 4, Nr. 9, Seiten 1020–1024, September 1998.

- (Raghupathy et al., 1999) R. Raghupathy, M. Makhseed, F. Azizieh, N. Hassan, M. Al-Azemi und E. Al-Shamali. *Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. Cellular Immunology*, Ausgabe 196, Nr. 2, Seiten 122–130, September 1999. Abstract.
- (Rai et al., 1997) R. Rai, H. Cohen, M. Dave und L. Regan. *Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antophospholipid antibodies). The British Medical Journal*, Ausgabe 314, Seiten 253–257, 1997.
- (Rao et al., 2010) N.V. Rao, B. Ragyle, X. Xu, P.R. Reynolds, J.M. Walenga, M. Prechel, G.D. Prestwich, R.B. Mac Arthur, B.B. Walters, J.R. Hoidal und T.P. Kennedy. *Low anticoagulant heparin targets multiple sites of inflammation, suppresses heparin-induced thrombocytopenia, and inhibits interaction of RAGE with its ligands. American journal of physiology. Cell physiology*, Ausgabe 299, Nr. 1, Seiten C97–110, 2010.
- (Rath und Thaler, 2013) W. Rath und C.J. Thaler. *Hereditäre Thrombophilien und Plazenta-medierte Schwangerschaftskomplikationen im zweiten und dritten Trimenon. Hämostaseologie*, Ausgabe 33, Nr. 1, Seiten 21–36, 2013.
- (Rathanaswami et al., 1993) P. Rathanaswami, M. Hachicha, M. Sadick, T.J. Schall und S.R. McColl. *Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokine. The journal of biological chemistry*, Ausgabe 268, Nr. 8, Seiten 5834–5839, März 1993.
- (Reches et al., 1979) A. Reches, A. Eldor und Y. Salomon. *The effects of dextrane sulfate, heparin and PGE1 on adenylate cyclase activity and aggregation of human platelets. Thrombosis Research*, Ausgabe 16, Nr. 1-2, Seiten 107–116, 1979.
- (Renz-Polster und Krautzig, 2013) H. Renz-Polster und S. Krautzig. *Basislehrbuch Innere Medizin*, Kapitel Physiologie der Blutstillung, Seiten 304–307. Urban & Fischer Verlag, München, 5. Edition, 2013.
- (Ryan et al., 1995) I.P. Ryan, J.F. Tseng, E.D. Schriock, O. Khorram, D.V. Landers und R.N. Taylor. *Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertility and Sterility*, Ausgabe 63, Nr. 4, Seiten 929–932, April 1995. Abstract.
- (Sacks et al., 2001) G.P. Sacks, L.M. Clover, D.R. Bainbridge, C.W. Redman und I.L. Sargent. *Flow cytometric measurement of intracellular Th1 and Th2 cytokine production by human villous and extravillous cytotrophoblast. Placenta*, Ausgabe 22, Nr. 6, Seiten 550–559, Juli 2001. Abstract.
- (Sadler, 2008) T. W. Sadler. *Medizinische Embryologie*, Kapitel Der Uterus und die Implantation, Seiten 60–62. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 11. Edition, 2008.
- (Schall et al., 1990) T.J. Schall, K. Bacon, K.J. Toy und D.V. Goeddel. *Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature*, Ausgabe 347, Nr. 6294, Seiten 669–671, Oktober 1990.
- (Schmidt und Lang, 2007) R. F. Schmidt und F. Lang. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Kapitel Reproduktion - Regulation der Gonadenfunktion bei der Frau, Seite 510. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 30. Edition, 2007.

A. Literaturverzeichnis

- (Schröder et al., 1990a) J.M. Schröder, N.L.M. Persoon und E. Christophers. *Lipopolysaccharide-stimulated human monocytes secrete, apart from neutrophil-activating peptide 1/interleukin-8, a second neutrophil-activating protein. The Journal of experimental medicine*, Ausgabe 171, Nr. 4, Seiten 1091–1100, April 1990a.
- (Schröder et al., 1990b) J.M. Schröder, M. Sticherling, H.H. Henneicke, W.C. Preissner und E. Christophers. *IL-1 alpha or tumor necrosis factor-alpha stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts. Journal of immunology*, Ausgabe 144, Nr. 6, Seiten 2223–2232, März 1990b.
- (Schütt und Bröker, 2011) C. Schütt und B. Bröker. *Grundwissen Immunologie*, Kapitel Was gehört zum Immunsystem?, Seiten 2–6, 63–70. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3 Edition, 2011.
- (Scipio et al., 1977) R.G. Di Scipio, M.A. Hermodson und E.W. Davie. *Activation of human factor X by a protease from Russell's viper venom. Biochemistry*, Ausgabe 16, Nr. 24, Seiten 5253–5260, November 1977.
- (Seli et al., 2001) E. Seli, B. Selam, G. Mor, U.A. Kavisli, T. Pehlivan und A. Arici. *Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. Menopause*, Ausgabe 8, Nr. 4, Seiten 296–301, Juli-August 2001. Abstract.
- (Sennström et al., 1997) M.K.B. Sennström, A. Brauner, Y. Lu, L.M.M. Granström und A.L. Malmström und G.E. Ekman. *Interleukin-8 is a mediator of the final cervical ripening in humans. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, Ausgabe 74, Nr. 1, Seiten 89–92, Juli 1997.
- (Shiroishi et al., 2006) M. Shiroishi, K. Kuroki, T. Ose, L. Rasubala, I. Shiratori, H. Arase, K. Tsumoto, I. Kumagai, D. Kohda und K. Maenaka. *Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. The Journal of biological chemistry*, Ausgabe 281, Nr. 15, Seiten 10439–10447, April 2006. Abstract.
- (Smith et al., 2005) D.F. Smith, E. Galkina, K. Ley und Y. Huo. *GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. American journal of physiology - heart and circulatory physiology*, Ausgabe 289, Nr. 5, Seiten H1976–H1984, November 2005.
- (Spratte et al., 2015a) J. Spratte, A. Oemus, M. Zygmunt und H. Fluhr. *Interferon- γ differentially modulates the impact of tumor necrosis factor- α on human endometrial stromal cells. Reproductive Biology*, Ausgabe 15, Seiten 146–153, Juli 2015a.
- (Spratte et al., 2015b) J. Spratte, M. Schönborn, N. Treder, F. Bornkessel, M. Zygmunt und H. Fluhr. *Heparin modulates chemokines in human endometrial stromal cells by interaction with tumor necrosis factor α and thrombin. Fertility and Sterility*, Ausgabe 103, Nr. 5, Seiten 1363–1369, Mai 2015b.
- (Spratte et al., 2013) J. Spratte, H. Meyer zu Schwabedissen, N. Endlich, M. Zygmunt und H. Fluhr. *Heparin inhibits TNF- α signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF- κ B. Human Reproduction*, Ausgabe 19, Nr. 4, Seite 227.236, 2013.

- (Starkey et al., 1988) P.M. Starkey, I.L. Sargent und C.W.G. Redman. *Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry*. *Immunology*, Ausgabe 65, Seiten 129–135, 1988.
- (Stewart et al., 1992) C.L. Stewart, P. Kaspar, L.J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Köntgen und S.J. Abbondanzo. *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. *Nature*, Ausgabe 359, Nr. 6390, Seiten 76–79, September 1992. Abstract.
- (Strauß et al., 2004) B. Strauß, K. Beyer, K. Henning, I. Hoppe und W. Starker. *Ungewollte Kinderlosigkeit*, Ausgabe 20 von *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Robert Koch Institut, April 2004.
- (Strieter et al., 1990) R.M. Strieter, S.W. Chensue, M.A. Basha, T.J. Standiford, J.P. Lynch, M. Baggiolini und S.L. Kunkel. *Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and interleukin-1 beta*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, Ausgabe 2, Nr. 4, Seiten 321–326, April 1990. Abstract.
- (Strieter et al., 1992) R.M. Strieter, S.L. Kunkel, M.D. Burdick, P.M. Lincoln und A. Walz. *The detection of a novel neutrophil-activating peptide (ENA-78) using a sensitive ELISA*. *Immunological Investigations*, Ausgabe 21, Nr. 6, Seiten 589–596, Oktober 1992.
- (Strieter et al., 1989) R.M. Strieter, S.L. Kunkel, H.J. Showell, D.G. Remick, S.H. Phan, P.A. Ward und R.M. Marks. *Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS and IL-1beta*. *Science*, Ausgabe 243, Nr. 4897, Seiten 1467–1469, März 1989.
- (Sunkara et al., 2016) T. Sunkara, E. Ofori, V. Zarubin, M.E. Caughey, V. Gaduputi und M. Reddy. *Perioperative management of direct oral anticoagulants (DOACs): a systemic review*. *Health services insights*, Ausgabe 9, Nr. S1, Seiten 25–36, 2016.
- (Szabo et al., 2000) S.J. Szabo, S.T. Kim, G.L. Costa, X Zhang, C.G. Fathman und L.H. Glimcher. *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. *Cell*, Ausgabe 100, Nr. 6, Seiten 655–669, März 2000.
- (Tabibzadeh und Sun, 1992) S. Tabibzadeh und X.Z. Sun. *Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle*. *Human Reproduction*, Ausgabe 7, Nr. 9, Seiten 1214–1221, Oktober 1992. Abstract.
- (Tabizadeh, 1994) S. Tabizadeh. *Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis*. *Human reproduction*, Ausgabe 9, Nr. 5, Seiten 947–967, Mai 1994. Abstract.
- (Thourani et al., 2000) V.H. Thourani, S.S. Brar, T.P. Kennedy, L.R. Thornton, J.A. Watts, R.S. Ronson, Z.Q. Zhao, A.L. Sturrock, J.R. Hoidal und J. Vinten-Johansen. *Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Ausgabe 278, Nr. 6, Seiten H2084–H2093, Juni 2000.
- (Tomassetti et al., 2006) C. Tomassetti, C. Meuleman, A. Pexters, A. Mihalyi, C. Kyama, P. Simsa und T.M. D’Hooghe. *Endometriosis, recurrent miscarriage and implantation failure: is there an immunological link?* *Reproductive BioMedicine Online*, Ausgabe 13, Nr. 1, Seiten 58–64, Mai 2006.

A. Literaturverzeichnis

- (Traenckner et al., 1995) E.B. Traenckner, H.L. Pahl, T. Henkel, K.N. Schmidt, S. Wilk und P.A. Baeuerle. *Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. The EMBO journal*, Ausgabe 14, Nr. 12, Seiten 2876–2883, Juni 1995.
- (Trejo et al., 1996) J. Trejo, A.J. Connolly und S.R. Coughlin. *The cloned thrombin receptor is necessary and sufficient for activation of mitogen-activated protein kinase and mitogenesis in mouse lung fibroblasts. The Journal of biological chemistry*, Ausgabe 271, Nr. 35, Seiten 21536–21541, August 1996.
- (Tuschil et al., 1992) A. Tuschil, C. Lam, A. Haslberger und I. Lindley. *Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. The Journal of investigative dermatology*, Ausgabe 99, Nr. 3, Seiten 294–298, September 1992. Abstract.
- (Uguccioni et al., 1995) M. Uguccioni, M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald und M. Baggiolini. *Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. European journal of immunology*, Ausgabe 25, Nr. 1, Seiten 64–68, Januar 1995.
- (Urman et al., 2009) B. Urman, B. Ata, K. Yakin, C. Alatas, S. Aksoy, R. Mercan und B. Balaban. *Luteal phase empirical low molecular weight heparin administration in patients with failed ICSI embryo transfer cycles: a randomized open-labeled pilot trial. Human Reproduction*, Ausgabe 24, Nr. 7, Seiten 1640–1647, Juli 2009.
- (Vince et al., 1992) G. Vince, S. Shorter, P. Starkey, J. Humphreys, L. Clover, T. Wilkins, I. Sargent und C. Redman. *Localization of tumour necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. Clinical and experimental immunology*, Ausgabe 88, Nr. 1, Seiten 174–180, April 1992.
- (Vincent et al., 1998) T. Vincent, R. Rai, L. Regan und H. Cohen. *Increased thrombin generation in women with recurrent miscarriage. Lancet*, Ausgabe 352, Nr. 9122, Seite 116, 1998.
- (Vitoratos et al., 2006) N. Vitoratos, C. Papadias, E. Economou, E. Makrakis, C. Panoulis und G. Creatsas. *Elevated circulating IL-1 β and TNF-alpha, and unaltered IL-6 in first-trimester pregnancies complicated by threatened abortion with an adverse outcome. Mediators of Inflammation*, 2006. Online veröffentlicht 7. Mai 2006.
- (Vollmar et al., 2013) A. Vollmar, I. Zündorf und T. Dingermann. *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe*, Seiten 3–8, 34–37. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2. Edition, 2013.
- (Waldmann und Tagaya, 1999) T.A. Waldmann und Y. Tagaya. *The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. Annual review of immunology*, Ausgabe 17, Nr. 19–49, 1999.
- (Walker et al., 2003) M. C. Walker, S.E. Ferguson und V.M. Allen. *Heparin for pregnant women with acquired or inherited thrombophilias. Cochrane Database of Systematic Reviews*, April 2003.

- (Walz et al., 1991) A. Walz, R. Burgener, B. Car, M. Baggiolini, S.L. Kunkel und R.M. Strieter. *Structure and Neutrophil-activating Properties of a Novel Inflammatory Peptide (ENA-78) with Homology to Interleukin-8. The Journal of experimental medicine*, Ausgabe 174, Nr. 1, Seiten 1355–1362, Dezember 1991.
- (Walz et al., 1997) A. Walz, P. Schmutz, C. Mueller und S. Schnyder-Candrian. *Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. Journal of leukocyte biology*, Ausgabe 62, Nr. 5, Seiten 604–611, November 1997. Abstract.
- (Wang et al., 2002) H. Wang, J.J. Ubl, R. Stricker und G. Reiser. *Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. American journal of physiology - Cell physiology*, Ausgabe 283, Nr. 5, Seiten C1351–C1364, November 2002.
- (Wang et al., 2008) L. Wang, F. Du und X. Wang. *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. Cell*, Ausgabe 133, Nr. 4, Seiten 693–703, Mai 2008.
- (Warkentin und Kelton, 1989) T.E. Warkentin und J.G. Kelton. *Heparin-induced thrombocytopenia. Annual review of medicine*, Ausgabe 40, Seiten 31–44, 1989.
- (Wegmann et al., 1993) T.G. Wegmann, H. Lin, L. Guilbert und T.R. Mosmann. *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunology Today*, Ausgabe 14, Nr. 7, Seiten 353–356, Juli 1993.
- (Weiler et al., 1992) J.M. Weiler, R.E. Edens, R.J. Linhardt und D.P. Kapelanski. *Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo. Journal of immunology*, Ausgabe 148, Nr. 10, Seiten 3210–3215, Mai 1992.
- (Weitz, 2010) J.I. Weitz. *New oral anticoagulants in development. Thrombosis and haemostasis*, Ausgabe 103, Nr. 1, Seiten 62–70, Januar 2010.
- (Weyerstahl und Stauber, 2013) T. Weyerstahl und M. Stauber. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Kapitel Gynäkologische Endokrinologie - Weibliches Hormonsystem, Seiten 87–99. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 4. Edition, 2013.
- (Winger und Reed, 2008) E.E. Winger und J.L. Reed. *Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortions. American journal of reproductive immunology*, Ausgabe 60, Nr. 1, Seiten 8–16, Juli 2008.
- (Wippermann, 2014) C. Wippermann. *Kinderlose Frauen und Männer*. Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend, Berlin, April 2014.
- (von Wolff et al., 1999) M. von Wolff, I. Classen-Linke, D. Heid, C.A. Krusche, K. Beier-Hellwig, C. Karl und H.M. Beier. *Tumour necrosis factor-alpha in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. Molecular Human Reproduction*, Ausgabe 5, Nr. 2, Seiten 146–152, Februar 1999. Abstract.
- (Wulczyn et al., 1996) F.G. Wulczyn, D. Krappmann und C. Scheidereit. *The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. Journal of molecular medicine*, Ausgabe 74, Nr. 12, Seiten 749–769, Dezember 1996.

A. Literaturverzeichnis

- (Wuyts et al., 1994) A. Wuyts, P. Proost, W. Put, J.P. Lenaerts und J. van Damme. *Leukocyte recruitment by monocyte chemotactic proteins (MCPs) secreted by human phagocytes*. *Journal of immunological methods*, Ausgabe 174, Nr. 1-2, Seiten 237–247, September 1994.
- (Yamagishi et al., 1984) R. Yamagishi, M. Niwa, S. Kondo, N. Sakuragawa und T. Koide. *Purification and biological property of heparin cofactor II: activation of heparin cofactor II and antithrombin III by dextran sulfate and various glycosaminoglycans*. *Thrombosis Research*, Ausgabe 36, Nr. 6, Seiten 633–642, 1984.
- (Yang et al., 2001) J. Yang, Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z. Liu und B. Su. *The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation*. *Nature immunology*, Ausgabe 2, Nr. 7, Seiten 620–624, Juli 2001.
- (Yang et al., 1993) Y. Yang, K.K. Yelavarthi, H.L. Chen, J.L. Pace, P.F. Terranova und J.S. Hunt. *Molecular, biochemical, and functional characteristics of tumor necrosis factor-alpha produced by human placental cytotrophoblastic cells*. *Journal of immunology*, Ausgabe 150, Nr. 12, Seiten 5614–5624, Juni 1993.
- (Yoshimura et al., 1987) T. Yoshimura, K. Matsushima, J.J. Oppenheim und E.J. Leonard. *Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin-1*. *The journal of immunology*, Ausgabe 139, Nr. 3, Seiten 788–793, August 1987.
- (Young, 2008) E. Young. *The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds*. *Thrombosis Research*, Ausgabe 122, Seiten 743–752, 2008.
- (Young et al., 1997) E. Young, T.J. Podor, T. Venner und J. Hirsh. *Induction of the acute-phase reaction increases heparin-binding proteins in plasma*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Ausgabe 17, Nr. 8, Seiten 1568–1574, August 1997.
- (Young et al., 1999) E. Young, T. Venner, J. Ribau, S. Shaughnessy, J. Hirsh und T.J. Podor. *The binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin to thrombin-activated human endothelial cells*. *Thrombosis research*, Ausgabe 96, Nr. 5, Seiten 373–381, Dezember 1999.
- (Yue et al., 1994) T.L. Yue, X. Wang, C.P. Sung, B. Olson, P.J. McKenna, J.L. Gu und G.Z. Feuerstein. *Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells*. *Circulation Research*, Ausgabe 75, Nr. 1, Seiten 1–7, 1994.
- (Yui et al., 1994) J. Yui, M. Garcia-Lloret, T.G. Wegmann und L.J. Guilbert. *Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblast*. *Placenta*, Ausgabe 15, Nr. 8, Seiten 819–835, Dezember 1994. Abstract.
- (Zeerleder et al., 2002) S. Zeerleder, T. Mauron, B. Lämmle und W.A. Wuillemin. *Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests*. *Thrombosis Research*, Ausgabe 105, Nr. 5, Seiten 441–446, März 2002.

B. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	ausgeschriebener Begriff
Ag	Antigen
ANOVA	Analysis of variance
APS	Antiphospholipidsyndrom
AT III	Antithrombin III
bzw.	beziehungsweise
CA	Fangantikörper
cDNA	complementary DNA
DA	Detektionsantikörper
dd H ₂ O	bi-distilliertes Wasser
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphaten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEC	Endometrial Epithelial Cell
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	mit 17 β -Estradiol und Progesteron behandelte ESC (= dezidualisiert)
EPO	Erythropoetin

B. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	ausgeschriebener Begriff
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
ESC	Endometrial Stromal Cell
FCS(d)	Fetal Calf Serum (depletiert)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HA	habituelle Aborte
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HLA	human leucocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
i.d.R.	in der Regel
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP-1	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1
IL	Interleukin
INF	Interferon
IVF	In-vitro Fertilisation
kDa	Kilo-Dalton
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors
Ko	Kontrollgruppe der ESC, undifferenziert
LGL-Zellen	large granular lymphocytes
LH	luteinisierendes Hormon
LIF	leukemia inhibitory factor
LILR	leukocyte immunoglobulin-like receptors
LMWH	Low Molecular Weight Heparin
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase

Abkürzung	ausgeschriebener Begriff
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODSH	2-O, 3-O desulfatiertes Heparin
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIGF	Placental Growth Factor
PRL	Prolaktin
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T-bet	T-box expressed in T-cells
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
UFH	unfraktioniertes Heparin
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFC	Vascular Endothelial Growth Factor C
z.B.	zum Beispiel

C. Publikationsliste

Spratte J., Schönborn M., **Treder N.**, Bornkessel F., Zygmunt M., Fluhr H. *Heparin modulates chemokines in human endometrial stromal cells by interaction with tumor necrosis factor α and thrombin.* Fertility and sterility, Ausgabe 103, Nr. 5, Seiten 1363-1369, Mai 2015.

D. Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Marek Zygmunt. Er ermöglichte mir unter seiner Leitung im Forschungslabor der Frauenklinik zu promovieren und somit für mich wertvolle Einblicke in die Welt der Forschung und des wissenschaftlichen Arbeitens zu erhalten.

In besonderer Weise möchte ich mich bei Frau Dr. med. Julia Spratte und Herrn Prof. Dr. med. Herbert Fluhr bedanken. Ich danke euch für die Heranführung an dieses Thema und an das wissenschaftliche Arbeiten an sich, für eure so vielfältige Unterstützung zu jeder Zeit, für anregende Gespräche und Diskussionen.

Dank gilt auch dem Personal in den gynäkologischen OPs und den Ärzt*innen im Institut für Pathologie, die mir bei der Gewinnung der endometrialen Zellen halfen.

Stephanie Heidrich und Jens Erhardt, euch danke ich vielmals für eure geduldige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente, für eure Hilfe, wenn eines der Experimente zu scheitern drohte und dafür, dass es dank euch möglich war in freundschaftlicher Atmosphäre und mit musikalischer Untermalung viele angenehme Stunden im Labor zu verbringen.

Danken möchte ich zudem Anne Tischler und Frauke Bornkessel. Auch dank euch hatte ich eine schöne und spaßige Zeit im Labor.

Tiefster Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für ihre immerwährende liebevolle Unterstützung, ihren Beistand und ihr Vertrauen in mich.

Großer Dank geht an Cedric Sehart, der mich ein langes Stück des Weges bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet hat, mich geduldig an L^AT_EX heranföhrte und mir bei der Lösung jedes noch so kleinen Problems zur Seite stand.

Meinen Mitbewohner*innen in Greifswald und nun in Münster, euch danke ich dafür, dass ihr mich auch nach langen Tagen im Labor und in der Bibliothek immer klaglos

D. Danksagung

ertragen habt und mit dazu beigetragen habt, dass ich einen Ort hatte, an den ich nach solchen Tagen gerne zurückkehrte.

Bina Emslander, Fabia Mix, Doris Dolezil, Marilena Günther, Johanna Worm, Stefan Weber, meinen liebsten Blockis und all meinen anderen Freund*innen möchte ich ganz besonders herzlich danken. Eure Freundschaft bedeutet mir unglaublich viel und bereichert mein Leben ungemein. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mir zuhört und mich aufmuntert in schönen und in schwierigen Zeiten.

E. Symbolverzeichnis

E.1. allgemeine Symbole

Symbol	ausgeschriebener Begriff
10°C	Grad Celsius
m ²	Quadratmeter
%	Prozent
CO ₂	tiefstehende Zahl
T _H	tiefstehender Buchstabe
™	Trademark
®	Registered
©	kleines Registered
≤	kleiner gleich
≥	größer gleich
≠	ungleich
≐	entspricht
„Anführungsstriche“	Anführungsstriche

E.2. griechische Buchstaben

griechischer Buchstabe	ausgeschriebener Begriff
α	alpha
β	beta

E. Symbolverzeichnis

griechischer Buchstabe	ausgeschriebener Begriff
γ	gamma
δ	delta
μ μ	mü
κ	kappa

E.3. Konzentrationsangaben

Konzentration	ausgeschriebener Begriff
$\mu\text{g/ml}$	microgramm pro milliliter
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	microgramm pro microliter
$\mu\text{l/ml}$	microliter pro milliliter
mg/ml	milligramm pro milliliter
ng/ml	nanogramm pro milliliter
$\text{ng}/\mu\text{l}$	nanogramm pro microliter
IU/ml	international Units pro ml
$\text{IU}/\mu\text{l}$	international Units pro microliter