

Martin Friedrich Schmidt
Dr. med.

Wirkung von Östrogenen, Gestagenen und Antigestagenen auf die Expression von Integrinen in humanen Endometriumzellen in vitro

Geboren am 12.11.1971
Reifeprüfung am 18.06.1991
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis SS 1998
Physikum am 18.08.1993 an der Universität zu Köln
Klinisches Studium in Köln und Heidelberg
Praktisches Jahr in Mannheim
Staatsexamen am 05.05.1998 am Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Rabe

Unter dem Begriff „Integrine“ wird eine Familie von Adhäsionsmolekülen zusammengefaßt, die als Transmembran-Rezeptoren der Extrazellulärmatr ix und als Signaltransduktoren an Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatr ix-Interaktionen beteiligt sind. In vivo wurde in Endometriumzellen eine vom Zeitpunkt im Menstruationszyklus abhängige Expression der Integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ und der Integrin-Untereinheit $\beta 3$ beschrieben. Integrine sollen an molekularen Mechanismen der Adhäsion endometrialer Zellen, bei der Implantation und bei der Embryogenese beteiligt sein. In vivo korreliert das Auftreten von Endometriose mit einem Expressionsdefekt von $\beta 3$ -Integrin im eutopen Endometrium erkrankter Frauen. Adenokarzinomzellen des Endometriums zeigen in vivo ebenfalls Expressionsdefekte von Integrinen. Die Faktoren, die im Endometrium zu einer physiologischen Regulation oder aber zu einer abnormen Expression von Integrinen führen, sind nicht bekannt. Antigestagene stören als kompetitive Progesteronrezeptor-Antagonisten steroidvermittelte Stoffwechselleistungen des Endometriums. Sie besitzen kontrazeptive und abortive Eigenschaften.

In dieser Studie sollte unter kontrollierten Bedingungen in vitro untersucht werden, ob kultivierte humane Endometriumzellen in der Lage sind, in vivo nachgewiesene Integrine zu exprimieren. Ferner sollte die Frage geklärt werden, ob Östrogene, Gestagene und Antigestagene unterschiedlichen Wirkungstyps die Expression von Integrinen in humanen Endometriumzellen modulieren. In Endometriumzellen von Frauen mit Endometriose und an Zellen einer Adenokarzinom-Zelllinie sollte untersucht werden, ob die Behandlung dieser Zellen mit Steroidhormonen anders als in physiologischen Endometriumzellen zu einer aberrierenden Integrinexpression führt.

Endometriale Biopsien von gesunden Frauen (n=18) und von Frauen mit Endometriose (n=7) wurden enzymatisch aufgeschlossen und unter serumfreien Kulturbedingungen mit einem Östrogen (DES), einem Gestagen (R5020), mit Antigestagenen (Ru486) und Kombinationen dieser Hormone behandelt. Adenokarzinomzellen (Ishikawa-Zelllinie) wurden in gleicher Weise kultiviert und behandelt (n=4). Zusätzlich wurde eine mögliche Zeit- und Dosisabhängigkeit der Hormonwirkung bzw. die Wirkung des Antigestagens Zk98229 alternativ zu Ru486 auf die Integrinexpression untersucht. Kontrollen wurden lediglich mit Ethanol behandelt. Spezifische Antikörper gegen die Integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ und gegen die Integrin-Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 3$ wurden zur immunzytochemischen Färbung von Integrinen der

kultivierten Endometriumzellen verwendet (ABC-Methode). Die Ermittlung der Farbintensitäten von Stroma- und Epithelzellen erfolgte semiquantitativ über einen lichtmikroskopischen Vergleich mit einer Referenzfärbung (Zytokeratinfärbung), die selektiv Endometrium-Epithelzellen markiert. Dabei wurden der Expression der Integrine entsprechend ihrer Intensität in Stroma- bzw. Epithelzellen ganze Zahlen zwischen 0 und 3 zugeordnet.

In unbehandelten Kulturen von gesunden Frauen war die Färbung von $\alpha 2\beta 1$ in Epithelzellen signifikant stärker als in Stromazellen. $\alpha 5\beta 1$ wurde nur sehr schwach, und fast ausschließlich in Stromazellen exprimiert. Die Integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ und die Untereinheit $\beta 1$ wurden in Epithel- und Stromazellen gleich stark exprimiert. Die Intensität dieser Färbungen entsprach etwa der Intensität der Referenzfärbung. Die $\beta 3$ -Untereinheit wurde schwach in Epithelzellen und signifikant schwächer in Stromazellen nachgewiesen. Die Expression von $\alpha v\beta 3$ war von allen untersuchten Integrinen am geringsten und in Epithel- und Stromazellen etwa gleich intensiv. Die Färbungen aller untersuchten Integrine in Kulturen von Frauen mit Endometriose glichen in Bezug auf Farbintensität und Zellspezifität denen gesunder Frauen. Die Expression von $\alpha 2\beta 1$ in Ishikawazellen war um den Faktor fünf schwächer als in primär kultivierten Zellen. $\beta 3$ war in Ishikawazellen gar nicht nachweisbar. Die Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ wurden in Ishikawazellen in gleicher Intensität wie in primär kultivierten Zellen gefunden. In keiner der Zellkulturen wurde die Expression der untersuchten Integrine durch die Behandlung mit Steroidhormonen beeinflusst. Auch die Antigestagene unterschiedlichen Wirktyps nahmen keinen Einfluß auf die Integrinexpression. Die Steroidbehandlung mit variierten Konzentrationen und Inkubationszeiten blieb ebenfalls ohne Effekt auf die Integrinexpression in entsprechenden Kulturen.

In dieser Studie wurde erstmals gezeigt, daß Primärkulturen physiologischer Endometriumzellen Integrine ähnlich wie in vivo exprimieren können. Die von Ex-Vivo-Befunden abgeleitete Vermutung, daß Östrogene und Gestagene unmittelbar die Expression bestimmter Integrine im Verlauf des Menstruationszyklus modulieren, ließ sich unter kontrollierten Bedingungen in vitro nicht nachvollziehen. Integrine, die in vivo im Endometrium gesunder Frauen nur unter Progesteroneinfluß exprimiert werden, waren in vitro unabhängig von Gestagenen und sogar nach Behandlung mit Antigestagenen konstitutiv nachweisbar. Typ-I- und Typ-II-Antigestagene unterschieden sich bezüglich ihrer Wirkung auf die Integrinexpression nicht. Der in vivo festgestellte Expressionsdefekt von $\beta 3$ im Endometrium von Frauen mit Endometriose wird im Zusammenhang mit einer pathologischen Adhäsion retrograd menstruierender Endometriumzellen am Peritoneum diskutiert. In vitro konnte ein $\beta 3$ -Defekt trotz Behandlung mit unterschiedlichen Steroiden im Vergleich zu physiologischen Endometriumzellen nicht festgestellt werden. Dies schließt jedoch nicht aus, daß bei Endometriose in vivo im Endometrium wirkende Substanzen nichtsteroidaler Art (z.B. Wachstumsfaktoren wie TGF- β , Entzündungsmediatoren), die möglicherweise in vitro nicht vorkamen, zu einer Herabregulierung von $\beta 3$ führen können. In Kultursystemen zukünftiger Untersuchungen der Expression von Integrinen sollten neben Steroidhormonen derartige Substanzen berücksichtigt werden. Der in vitro beobachtete, konstitutive Defekt von $\beta 3$ in Ishikawa-Zellen impliziert, daß die In-Vitro-Nachweisbarkeit von $\beta 3$ in Endometriumzellen bei Endometriose nicht auf ein methodisches Artefakt zurückzuführen ist.

Es kann abschließend festgestellt werden, daß Endometriumzellen in vitro in der Lage sind verschiedene Integrine stabil und zellspezifisch ähnlich wie in vivo zu exprimieren. Ein unmittelbarer Effekt von Östrogenen, Gestagenen und Antigestagenen auf die Expression von Integrinen in vitro wurde ausgeschlossen. Dies läßt auf integrinsupprimierende, nichtsteroidale

Faktoren schließen, die in vivo möglicherweise im Zusammenwirken mit Steroiden zu einer Herabregulierung dynamisch exprimierter Integrine in bestimmten Phasen des normalen Menstruationszyklus führen, jedoch im angewendeten Kultursystem entweder wirkungslos oder nicht existent waren. Der bei Endometriose in vivo beobachtete $\beta 3$ -Expressionsdefekt im Endometriumepithel wird vermutlich durch im Rahmen der Erkrankung erworbene, integrinsupprimierende, nichtsteroidale Faktoren bedingt und scheint weniger ein bei Endometriose konstitutiv vorkommendes, möglicherweise angeborenes Phänomen zu sein. Die von Antigestagenen ausgelösten molekularen Mechanismen, die zur Kontrazeption oder zum Abort führen, beruhen entsprechend der Ergebnisse dieser Studie wahrscheinlich nicht auf einer unmittelbaren Störung der Expression von Integrinen im Endometrium. Eine aberrierende Integrinexpression in Adenokarzinomzellen des Endometriums scheint nicht die Folge eines unterschiedlichen Eingreifens von Steroidhormonen in die Expression von Integrinen zu sein.